

**Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo**

**Tatiana Santos Aguilár**

**Influência do meio de cultura na expressão de fator de coagulação  
VIII recombinante por linhagem celular humana.**

**São Paulo**

**2013**

Tatiana Santos Aguilar

Influência do meio de cultura na expressão de fator de coagulação VIII recombinante por linhagem celular humana.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Processos Industriais.

Data da aprovação \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

---

Prof. Dra. Elisabeth F. Pires Augusto  
(Orientadora)  
Inst. de Ciência e Tecnologia - UNIFESP

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dra. Elisabeth F. Pires Augusto (Orientadora)  
Instituto de Ciência e Tecnologia – UNIFESP

Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares (Membro)  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

Profa. Dra. Soraia Attie Calil Jorge (Membro)  
Instituto Butantan

Tatiana Santos Aguilar

Influência do meio de cultura na expressão de fator de coagulação VIII recombinante por linhagem celular humana.

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Processos Industriais.

Área de concentração: Desenvolvimento e Otimização de Processos Industriais

Orientadora: Prof. Dra. Elisabeth F. Pires Augusto

São Paulo

Abril/2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pelo Departamento de Acervo e Informação Tecnológica – DAIT

do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT

**A283i**    **Aguilar, Tatiana Santos**

Influência do meio de cultura na expressão de fator de coagulação VIII recombinante por linhagem celular humana. / Tatiana Santos Aguilar. São Paulo, 2013.  
87p.

Dissertação (Mestrado em Processos Industriais) - Instituto de Pesquisas  
Tecnológicas do Estado de São Paulo. Área de concentração: Desenvolvimento e  
Otimização de Processos Industriais.

Orientador: Profa. Dra. Elisabeth F. Pires Augusto

1. Linhagem celular humana 2. Fator de coagulação VIII 3. Cultura sem soro 4.  
Cultura em suspensão 5. Tese I. Augusto, Elisabeth F. Pires, orient. II. IPT.  
Coordenadoria de Ensino Tecnológico III. Título

13-42

CDU 576(043)

A minha princesinha Marina, razão da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu bom Deus, pela presença e força no cumprimento de mais uma etapa.

Aos meus pais Adão e Glória, aos meus irmãos Stênio e Kelle, pelo amor e apoio incondicional.

Ao Junior, pelo amor, incentivo e dedicação em todos os momentos.

A minha orientadora professora Dra. Elisabeth de Fatima Pires Augusto, pela confiança, dedicação, paciência e grande contribuição na realização deste trabalho.

A amiga Cássia Ramaciotti, pelo apoio e pela grande contribuição em momentos importantes deste trabalho.

A todos os colegas do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo, Gabriela, Oliveira, Beth, Valter, Alice, Antonio e em especial ao Renato, pela constante colaboração.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O cultivo de células animais tem apresentado expressiva expansão nos últimos anos, sendo uma etapa fundamental de muitos bioprocessos. A cultura em suspensão é o método mais adequado para aumento de escala devido as características de manipulação, menor custo, demanda de menor espaço, além de facilidade no monitoramento. O Soro Fetal Bovino é um dos principais agentes protetores contra o cisalhamento do meio de cultura, mais é uma fonte de contaminação. Entretanto, a literatura é escassa em relação a adaptação das culturas em suspensão e a meios isentos de soro fetal bovino. O objetivo deste estudo foi adaptar uma linhagem celular humana (SKHep), transfectada para a expressão do fator de coagulação VIII recombinante humano (rFVIII), a meios de cultivo sem soro e à condição de cultivo em suspensão.

Os ensaios foram realizados em frasco T e em Spinner de 100 mL, após alguns resultados positivos, realizaram-se ensaios cinéticos, em frascos Spinner de 250 mL de volume útil. Vários meios de cultura foram utilizados, a fim de selecionar a melhor opção para a adaptação da célula ao crescimento em suspensão e ausência de soro. No processo de adaptação à suspensão foi utilizado o Meio DMEM com 10%SFB, para os ensaios em frasco T, spinner e spinner mais microcarregador. Para a retirada do soro foram utilizados meios quimicamente definidos (HyCD, Sigma Fusion), livres de soro (HySF, Sigma 302) e livres de componente animal (Sigma ACF). Alguns meios foram suplementados com aditivos extras, como o Pluronic® F68 0,1% (p/v), o  $\beta$ mercaptoetanol 2  $\mu$ g/mL e o anti-grumos. Além dos aditivos extras, foram utilizadas três estratégias para a retirada do soro, de forma lenta e gradativa, lenta e com pausas e em degrau. As grandezas cinéticas características foram analisadas,  $Y_{LAC/GLC}$ ,  $Y_{NH_4/X}$ ,  $Y_{rFVIII/X}$ ,  $Y_{X/GLC}$ , o  $\mu_{x/Max}$ . Com todas as análises realizadas conclui-se que a linhagem foi adaptada ao crescimento em suspensão com soro, também foi possível adaptar as células para crescimento apenas ao meio de cultura comercial isento de soro e quimicamente definido (SH30556.01/ CDM4CHOTM, Hyclone). Entretanto, o processo de adaptação das células implicou na perda total da capacidade de expressar o rFVIII.

**Palavras-Chave:** fator de coagulação VIII; célula humana; SKHep; meio sem soro; adaptação.

## ABSTRACT

### Influence of culture medium on the expression of coagulation factor VIII by recombinant human cell line.

The cultivation of animal cells has shown significant expansion in recent years, a key step in many bioprocesses. The suspension culture is the most appropriate method for scaling up because the handling characteristics, lower cost, lower demand for space, and ease of monitoring. The Fetal Bovine Serum is a primary protective agents against shear culture medium plus a source of contamination. However, the literature is sparse regarding the adaptation of the suspension cultures free media and fetal bovine serum. The aim of this study was to adapt a human cell line (SKHep) transfected for expression of coagulation factor VIII recombinant human (rFVIII), a serum-free culture media and culture condition in suspension.

Assays were performed in T and in Spinner flask of 100 ml, after some positive results, kinetic assays were performed in Spinner bottles of 250 ml net volume. Various culture media have been used in order to select the best option for adapting cell growth in suspension and absence of serum. In the process of adapting the suspension was used DMEM medium with 10% FCS for tests in T flask, spinner and more microcarrier spinner. For the removal of serum media were chemically defined (HyCD, Sigma Fusion), serum free (HySF, Sigma 302) and animal component free (Sigma ACF). Some media were supplemented with extra additives such as Pluronic® F68 0.1% (w / v),  $\beta$ mercaptoethanol 2 ug / ml and anti-lumps. Besides the extra additives were used three strategies to remove the whey, slowly and gradually, slowly and with pauses and stepped. The magnitudes kinetic characteristics were analyzed,  $Y_{LAC/GLC}$ ,  $Y_{NH_4/X}$ ,  $Y_{rFVIII/X}$ ,  $Y_{X/GLC}$ ,  $o \mu_{x/Max}$ . In all analyzes it was concluded that the strain was adapted to growth in suspension in serum, it was also possible to adapt the cells to growth only to the commercial culture medium serum-free, chemically defined (SH30556.01 / CDM4CHOTM, Hyclone). However, the adaptation process of the cells resulted in the total loss of the ability to express rFVIII.

**Keywords:** coagulation factor VIII; human cell; SKHep, serum-free medium; adaptation.



## Lista de Ilustrações

Figura 3.1. Esquema da cascata da coagulação (Franco, 2001).	29
Figura 3.2. Representação esquemática da estrutura do domínio do FVIII e os anticorpos monoclonais reconhecendo diferentes epitopos (Purohit et al., 2003).	35
Figura 5.1. Resultados do ensaio TF8_10, realizado em frasco T.	54
Figura 5.2. Resultados do ensaio Tati_03, realizado em frasco spinner com microcarregadores.	57
Figura 5.3. Adaptação da linhagem celular ao cultivo em suspensão.	60
Figura 5.4. Resultados do ensaio Tati_04, realizado, com células adaptadas a suspensão (SkHep-FVIII DMEM Sp), em spinner.	61
Figura 5.5. Resultados do uso de células SkHep_FVIII DMEM Sp com suplementos anti grumos.	64
Figura 5.6. Resultados do uso de células SkHep_FVIII DMEM Sp, no Meio 5 (Adapt 8; tabela 4.1).	67
Figura 5.7. Resultados do uso de células SkHep_FVIII DMEM Sp, em Meio 8 (Adapt 12, Tabela 4.1).	69
Figura 5.8. Resultados do uso de células SkHep_FVIII DMEM Sp, em Meio 6 , na condição Adapt 10 (Tabela 4.1).	70
Figura 5.9. Resultados do uso de células SkHep_FVIII DMEM Sp, em Meio 9, na condição Adapt 13 (Tabela 4.1).	72
Figura 5.10. Resultados do uso de células SkHep_FVIII DMEM Sp, em Meio 10, na condição Adapt 14 (Tabela 4.1).	73
Figura 5.11. Resultados do ensaio Tati_01, realizado com a linhagem SkHep – FVIII HyCD, no Meio 5 (HyCD quimicamente definido), em spinner.	74

## **Lista de Tabelas**

Tabela 4.1. Tabela resumo das formulações de meio de cultura isentas de SFB e das estratégias para adaptação da SKHep-FVIII a esses meios e à condição de crescimento suspensão testadas neste estudo.	39
Tabela 4.2 Quadro de ensaios realizados para estudos cinéticos do crescimento e do metabolismo da SKHep-FVIII.	42
Tabela 5.1 Dados cinéticos relativos ao cultivo em meios com SFB e isentos de SFB	56
Tabela 5.2. Quadro resumo das adaptações a meios de cultura isentos de SFB.	65

## Lista de Abreviaturas e Siglas

BPF: Boas Práticas de Fabricação

Cel: Células

ELISA: do inglês *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*

GLC: Concentração de glicose (g/L)

GLN: Concentração de glutamina (g/L)

LAC: Concentração de lactato (g/L)

NH<sub>4</sub>: Concentração de amônio (mg/L)

pH: Potencial Hidrogênio Iônico

PLU: Concentração de Pluronic® F68

SFB: Soro Fetal Bovino

$\Pi_X$ : Produtividade em células

$\Pi_P$ : Produtividade em produto

X: Concentração de células viáveis (cel/mL)

$Y_{X/GLC}$ : Fator de conversão de glicose a célula (cel/g)

$Y_{LAC/GLC}$ : Fator de conversão de glicose a lactato (g/g)

$Y_{NH_4/X}$ : Fator de formação de amônio por unidade de célula (mg/10<sup>6</sup> cel)

$Y_{rFVIII/X}$ : Fator de produção de rFVIII por unidade de célula gerada.

### Símbolos gregos

$\mu$ : Velocidade específica de crescimento (h<sup>-1</sup>)

$\mu_{max}$ : Máxima velocidade específica de crescimento (h<sup>-1</sup>)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
3.1 Considerações Gerais sobre o cultivo de Células Animais	19
3.2 Meios de Cultura	22
3.3 Adaptação Celular	26
3.4 Fator de coagulação FVIII	28
3.5 Análise de rFVIII produzido	33
3.5.1 Medidas da atividade biológica	33
3.5.2 Medida da quantidade total de rFVIII produzido	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
4.1 Linhagens celulares	37
4.2 Meio de Cultura	37
4.2.1 Formulação básica (com SFB)	37
4.2.1.1 <i>Formulação aberta</i>	37
4.2.2 Formulações isentas de SFB	37
4.2.2.1 <i>Meios quimicamente definidos</i>	38
4.2.2.2 <i>Meios livres de soro</i>	38
4.2.2.3 <i>Meios livres de componente animal</i>	38
4.3 Preparo do inóculo	40
4.4 Sistemas de cultivo	40
4.5 Descrição dos ensaios	41
4.5.1 Cinética de crescimento SKHep-FVIII aderente em meio com soro.	41
4.5.2 Adaptação da linhagem ao crescimento em suspensão	41

4.5.3 Adaptação a meios de cultura isentos de soro	44
4.6 Tratamento de amostra	45
4.7 Métodos analíticos	46
4.7.1 Concentração celular	46
4.7.2 Viabilidade celular	46
4.7.3. Confluência	46
4.7.4 Determinação da concentração de glicose	46
4.7.5 Determinação da concentração de ácido láctico	47
4.7.6 Determinação da concentração de amônio	47
4.7.7 Análise de produção de FVIII	48
4.7.8. Medida de pH	49
4.8 Tratamento dos dados	49
4.8.1 Determinação da velocidade específica de crescimento	49
4.8.2 Determinação do Tempo de geração	50
4.8.3 Determinação dos Fatores de conversão	50
4.8.4 Produtividades em células e em produto	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
5.1 Estudos em meio de cultivo contendo SFB	52
5.2 Adaptação das células a meio sem soro	58
5.2.1 Adaptação das células ao cultivo em suspensão em meio com soro	59
5.2.2 Cinética de crescimento em suspensão	59
5.2.3 Influência de suplementos anti-grumos	63
5.2.4 Adaptação a meio isento de soro	63
5.2.4.1. Adaptação ao meio HyCD	66
5.2.4.2 Adaptação em meio ACF	66
5.2.4.3 Adaptação em meio HySF	68
5.2.2.4 Adaptação em meio 302	71

5.2.2.5 Adaptação em meio Sigma Fusion	71
5.2.3 Cinética de crescimento da célula em meio livre de soro	74
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>78</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A coagulação do sangue é um processo complexo no qual o sangue forma coágulos sólidos que são utilizados para cobrir a parede de um vaso sanguíneo danificado parando assim a hemorragia e ajudando na recuperação deste vaso danificado. A coagulação pode ser dividida em duas etapas: a hemostasia primária e a secundária. Na hemostasia primária ocorrem alterações vasculares, contração das camadas musculares subendoteliais e ativação do endotélio. Na hemostasia secundária é onde se encontram os fatores de coagulação, todos eles proteínas complexas que fornecem especificidade e eficiência cinética para as várias reações enzimáticas da coagulação do sangue (cascata de coagulação) (Rang *et al.*, 2001).

Tanto na via extrínseca quanto na via intrínseca da cascata de coagulação, os fatores de coagulação desempenham papéis importantes. A maioria consiste em formas inativas de enzimas proteolíticas, com exceção dos fatores V e VIII que são glicoproteínas e do fator XIII que é uma transglutaminase que, quando ativadas provocam reações sucessivas (por isso cascata). (Carlos; Freitas, 2007).

A incapacidade para ativar a cascata de coagulação e controlar sangramentos são características de um quadro de Hemofilia, nome dado a diversas doenças genéticas hereditárias. A Hemofilia é um distúrbio autoimune raro que podem causar a diminuição da atividade dos fatores de coagulação do plasma sanguíneo, de modo que comprometem a coagulação sanguínea. O fator VIII de coagulação sanguínea é uma dessas proteínas complexas. A deficiência da atividade deste fator está relacionada a uma doença hereditária, hemofilia A, ligada ao cromossomo X, que ocorre em 1 a cada 5000 nascimentos, sendo necessária a reposição do mesmo, para o seu controle. O fator VIII ainda funciona como co-fator do fator IX, cuja deficiência está relacionada à hemofilia B. A hemofilia A é a mais comum, ocorrendo em 80 % dos casos (Lowe, 2001).

No Brasil, estima-se a existência de 7.000 hemofílicos, que demandariam, em condições ideais, 420 milhões de Unidades Internacionais (UI) do fator VIII, por ano, para seu tratamento adequado (70.000 UI/paciente/ano).

Nos últimos 40 anos, o tratamento da hemofilia evoluiu muito. Basicamente, ele consiste na reposição do fator anti-hemofílico, ou seja, o paciente com hemofilia do tipo A recebe a molécula do fator VIII, do qual é deficitário, o que normaliza o processo de coagulação. A reposição só começou a ser usada por volta de 1965,

quando se desenvolveu o crioprecipitado (concentrado precipitado a frio do fator VIII). Os fatores de coagulação podem ser obtidos a partir do plasma sanguíneo, ou através de proteínas recombinantes obtidas de linhagens celulares de mamíferos, humanas ou de animais transgênicos.

A primeira opção de produção desse medicamento de reposição foi a obtenção de plasma. Nas décadas de 70 e 80, apesar da alta eficácia, ficou evidente que os concentrados derivados de plasma apresentavam riscos significativos de transmissão de viroses, tais como HIV, hepatite B e hepatite C. Os hemofílicos foram especialmente infectados pelo vírus da AIDS e da hepatite C. Além do risco de transmissão de doenças, o FVIII de plasma tem o problema da sazonalidade (Picanco *et al.*, 2007).

Até 1993, os produtos licenciados para o tratamento da hemofilia eram advindos, quase que exclusivamente, de plasma humano. O desenvolvimento da biologia molecular e suas aplicações no campo da biotecnologia trouxeram como alternativas a utilização de FVIII recombinante (rFVIII) (Jiang *et al.*, 2002). Entre as opções de fontes de obtenção das moléculas de coagulação sanguínea, as formas recombinantes representam a tecnologia do futuro e tendem a substituir a produção tradicional dos fatores a partir do plasma humano.

Segundo Pipe (2008), o uso de proteínas recombinantes para a hemofilia começou no início dos anos 80 com a clonagem e, a subsequente, expressão de proteínas funcionais para os fatores VIII e IX. Em 1984, o sequenciamento do gene codificador para o FVIII e a produção do mesmo em culturas de células de mamíferos constituíram marcos milenares na evolução do tratamento da hemofilia. Estes avanços abriram caminho para a produção industrial de concentrados de fatores coagulantes, sem o recurso da utilização do sangue humano e permitiram antever a possibilidade da terapia gênica. Em 1987, o primeiro paciente recebeu o FVIII recombinante e depois de cinco anos o produto estava disponível para uso clínico.

Dados da organização Mundial da Saúde mostram que a hemofilia atinge 350 mil pessoas no mundo. O Ministério da Saúde Brasileiro disponibiliza 45 mil IU por ano de fatores de coagulação para cada paciente. Entretanto, a quantidade adequada seria 70 mil IU/paciente/ano. O Brasil gasta anualmente US\$ 100 milhões com a importação de hemoderivados, entre eles, as unidades de fatores de coagulação distribuídas pelos hemocentros. O Brasil importa 100% do produto e



fornece aos pacientes a terapia com maiores riscos (derivados de plasma) (Resende; Silva, 2009). Várias são as empresas envolvidas no desenvolvimento de produtos contendo FVIII: Pfizer (ReFacto®), Bayer (Kogenate® e Kogenate FS®) e a Baxter (Recombinate® e Advate®).

O Hemocentro de Ribeirão Preto vem trabalhando no desenvolvimento de linhagens de células humanas modificadas há 11 anos. As linhagens desenvolvidas por esse grupo de pesquisadores estão sendo utilizadas no projeto financiado pela Finep, ao qual este trabalho está vinculado.

Entretanto, linhagens com elevada capacidade de expressão não garantem sozinhas um bom desempenho de produção. O investimento em engenharia de processos, principalmente para proteínas terapêuticas, é essencial, tendo em vista as exigências regulatórias para aprovação. Robustez, reprodutibilidade e garantias quanto à qualidade, pureza e segurança são imprescindíveis. Do ponto de vista da indústria, a simplicidade e uma produtividade elevada, minimiza investimentos em equipamentos e áreas BPF (Boas Práticas de Fabricação) nas quais são necessárias. Desta forma, o estudo propõe adaptar uma linhagem a suspensão, para facilitar o escalonamento futuro do processo e adaptar a linhagem a meios de cultura isentos de soro fetal bovino, pois é uma exigência dos órgãos de regulamentação FDA, ANVISA. É por esse motivo que foi proposto o projeto Finep cujo objetivo central é desenvolver processos produtivos para a obtenção dos fatores FVIII e FIX em escala de biorreator.

Dentre as células desenvolvidas pelo grupo do Hemocentro de Ribeirão Preto, utilizou-se a linhagem celular SKHep-FVIIIdeIB-GFP-CMV (denominada SKHep-FVIII) uma célula com capacidade de expressão do FVIII bastante promissora (Picanço *et al.*, 2007). A equipe do IPT iniciou os estudos relativos ao processo de produção do fator de coagulação rFVIII e o presente trabalho concentrou-se na adaptação da linhagem celular SKHep-FVIII à condição de cultivo em suspensão e aos meios de cultura isentos de soro fetal bovino (SFB). Essas condições são consideradas as mais adequadas para o escalonamento futuro do processo.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é adaptar uma linhagem celular humana (SKHep), transfectada para a expressão do fator de coagulação VIII recombinante humano (rFVIII), a meios de cultivo sem soro e à condição de cultivo em suspensão.

### Objetivos específicos:

- a) Caracterizar o crescimento, o metabolismo e a produção de rFVIII na linhagem em questão em sistemas de cultivo aderentes (frasco T e microcarregador);
- b) Adaptar a célula Skhep-FVIIIdeIB-GFP-CMV (SKHep-FVIII) ao cultivo em suspensão;
- c) Adaptar a célula SKHep-FVIII a meios de cultura isentos de soro fetal bovino;
- d) Avaliar a influência do meio de cultura sem soro sobre o crescimento, o metabolismo e a produção de rFVIII;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Considerações Gerais sobre o cultivo de Células Animais

O cultivo de células animais tem apresentado expressiva expansão nos últimos anos, sendo uma etapa fundamental de muitos bioprocessos. O desenvolvimento de procedimentos de caracterização, padronização e manutenção de linhagens celulares diversas, bem como de métodos de manipulação e cultivo celular possibilitou o desenvolvimento da tecnologia do cultivo destas células em laboratório e em escalas semi-industriais e industriais.

As técnicas de cultivo com células animais se distinguem dos demais processos envolvendo microrganismos por utilizarem organismos derivados de tecido humano ou animal, adaptados para o crescimento *in vitro*. Apesar das técnicas envolvidas em ambos os processos serem semelhantes, as células animais possuem determinadas características importantes: apresentam um crescimento mais lento; as células são mais frágeis; as necessidades nutricionais são mais complexas; e, em alguns casos, necessitam de suporte para adesão e crescimento (Augusto; Oliveira, 2001).

As culturas de células animais podem ser classificadas em culturas primárias e linhagens celulares estabelecidas, de acordo com sua origem e biologia. No cultivo de células animais primárias, os tecidos extraídos diretamente de órgãos de animais sob condições assépticas são transferidos para um meio de crescimento contendo soro e pequenas quantidades de antibióticos. Essa cultura primária de células é geralmente heterogênea e possui uma baixa taxa de crescimento, mas representa bem o tipo de tecido do qual foi derivada (Augusto; Oliveira, 2001).

As amostras de tecidos animais são sempre heterogêneas, pois a origem das células constituintes é diferente. Com as subculturas em meios específicos que podem inibir ou favorecer o crescimento celular, as células tornam-se mais homogêneas, pois são agitadas em cada transferência e tendem a se tornar uma cultura mais robusta e homogênea. Dessa forma, a cultura pode ser propagada, caracterizada e armazenada, proporcionando uma faixa muito mais larga de possibilidades experimentais.

O cultivo de células animais também apresenta algumas limitações como a complexidade, a obtenção de pequenas quantidades de produto e a instabilidade na expressão de crescimento (Freshney, 2005).

Além disso, ao contrário de alguns microrganismos, as células animais não ocorrem naturalmente de forma isolada e, conseqüentemente, não são capazes de sustentar sua existência independente sem um ambiente complexo simulando o plasma sanguíneo ou um fluido intersticial. Isto implica, então, em um nível de habilidade e entendimento para compreender as necessidades do sistema e diagnosticar problemas.

Desta forma, como estes sistemas apresentam alto grau de complexidade é importante que os estudos para a obtenção de bioprodutos de interesse pelo cultivo de células animais sejam realizados de maneira criteriosa, visando elevadas produtividades e/ou concentração, baixo custo e simplicidade operacional.

As células animais podem ser dependentes ou não de suporte para crescimento. As que dependem de suporte são chamadas de células aderentes. Tais células crescem em monocamadas, apresentando inibição por contato e tendo geralmente seu crescimento limitado pela superfície disponível do suporte. Células não dependentes de suporte desenvolvem-se em suspensão sem a necessidade de estarem aderidas a uma superfície. Mesmo as células aderentes, também podem ser adaptadas a cultivos em suspensão (Moraes *et al.*, 2008).

Quando é possível escolher a forma de manufatura, a cultura em suspensão é o método mais adequado para aumento de escala devido as características de manipulação, menor custo, demanda de menor espaço, além de permitir o monitoramento do crescimento celular e a facilidade do controle dos parâmetros de cultivo (Freshney, 2005).

As fases de crescimento celular podem ser divididas em fase lag, fase exponencial (exp), ou logarítmica (log), fase estacionária e fase de declínio.

Quando presente, a fase lag ocorre logo em seguida a inoculação das células. É um período de adaptação, onde as células não se dividem, ou o fazem em baixas taxas específicas. A duração dessa fase depende das condições do inóculo e sua concentração inicial.

A fase exponencial é um período onde as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e

se duplicando. Durante essa fase, as células estão em seu melhor estado fisiológico e, portanto, ideais para os estudos de fisiologia.

Na fase estacionária, os nutrientes estão escasseando e os produtos tóxicos estão tornando-se mais abundantes. Nesta etapa não há um crescimento líquido da população, ou seja, o número de células que se divide é equivalente ao número de células que morrem. Pode haver aumento relativo na síntese de proteínas especializadas em vez de proteínas estruturais, além da modificação da constituição e da carga da superfície celular (Freshney, 2005).

Após a fase estacionária, apresenta-se a fase de declínio, na qual a maioria das células está em processo de morte, embora outras ainda estejam se dividindo. A morte celular pode ser desencadeada por dois mecanismos distintos: necrose e apoptose.

A necrose é considerada como uma morte acidental, consistindo de um processo não fisiológico, no qual são observadas mudanças na morfologia e função mitocondrial e na habilidade da membrana plasmática de regular a pressão osmótica no interior da célula. Inicialmente, ocorre um aumento no volume citoplasmático por conta da entrada de líquido na célula, seguido pela ruptura da membrana e de organelas intracelulares permitindo, assim, o extravasamento de lisossomos e material citoplasmático, finalizando com a fragmentação aleatória do núcleo (Al-Rubeai, 1998).

A apoptose, um mecanismo de morte programada da célula, também é caracterizada por uma série de alterações morfológicas, que levam a um processo de autodestruição celular, resultando no empacotamento do conteúdo celular em vesículas (corpos apoptóticos) que, quando *in vivo*, serão fagocitados por células especializadas. No entanto, em cultura, o processo apoptótico acaba migrando para o que pode ser chamado de necrose secundária, no qual, devido a ausência de células fagocíticas profissionais, a célula apoptótica e os corpos apoptóticos acabam extravasando o seu conteúdo, tal como ocorre na necrose (Al-Rubeai, 1998).

A determinação da curva de crescimento é importante para a avaliação das características específicas de uma cultura celular. O comportamento e a bioquímica celular alteram-se significativamente em cada fase da curva. Conhecendo-se o ciclo de crescimento da cada linhagem celular, pode-se prever a concentração de inóculo mais adequada, a duração prevista dos experimentos e os intervalos mais

apropriados para amostragem, ou adição de reagentes a serem testados (Moraes *et al.*, 2008).

### 3.2 Meios de Cultura

O meio de cultura é o fator mais importante no cultivo de células animais. Sua função é proporcionar pH e osmolalidade apropriados para a sobrevivência e multiplicação da célula, além de fornecer todas as substâncias químicas requeridas para o anabolismo e catabolismo celular, as quais não podem ser sintetizadas. Algumas destas substâncias podem ser fornecidas por um meio de cultura constituído de substâncias de baixa massa molar, geralmente conhecido como meio basal. Porém, a maioria dos meios basais não consegue proporcionar um bom crescimento, sendo uma prática muito comum a suplementação do meio de cultura com aditivos mais complexos e quimicamente indefinidos como o soro sanguíneo.

O meio de cultivo deve conter nutrientes essenciais para a síntese de novas células, substratos para a realização do metabolismo celular, além de compostos que desempenhem funções fisiológicas, catalíticas ou que atuem como co-fatores. Assim, é necessário que o meio possua, entre outras substâncias específicas para determinadas linhagens celulares, sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, lipídeos, ácidos orgânicos, proteínas, hormônios, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, micronutrientes (íons orgânicos e minerais) e água (Moraes *et al.*, 2008).

O pH adequado para o desenvolvimento da maioria das células de mamíferos é de cerca de 7,4, e não deve cair a um valor abaixo de 7,0 durante o cultivo. Um pH menor que 6,8 é geralmente inibidor do crescimento celular (Freshney, 2005). Assim, utilizam-se agentes tamponantes, como o HEPES, Bicarbonato de sódio e ar enriquecido com 5% de CO<sub>2</sub> para auxiliar no tamponamento do meio.

Os sais inorgânicos são importantes na manutenção do balanço iônico e da pressão osmótica (Echalier, 1997). Os lipídios são considerados essenciais no crescimento celular, como constituintes de membranas e podem ser empregados no transporte de compostos lipossolúveis, como vitaminas, para as células. Os açúcares são uma importante fonte de energia, sendo que a principal é a glicose, a qual também é utilizada na formação do esqueleto carbônico das células.

As células, em geral, obtêm sua energia de reações de oxidação-redução, sendo a glicose a principal fonte para esta reação. Quando os níveis de glicose são suficientes, o metabolismo segue as vias glicolíticas e das pentoses para formar gliceraldeído-3-fosfato (G3F). A conversão de G3F a piruvato depende da disponibilidade da coenzima NAD<sup>+</sup> citoplasmática oxidada e, portanto, é necessária uma constante oxidação de NADH para gerar NAD<sup>+</sup> e manter a glicólise em funcionamento. NADH não oxidado é metabolizado pela enzima lactato desidrogenase (LDH), convertendo piruvato a ácido láctico que, em altos níveis, pode ser tóxico para as células. Este é um processo de perda de energia que leva ao final do metabolismo (Freshney, 2005).

Os aminoácidos são necessários para a constituição de proteínas e o crescimento celular. O tipo de aminoácido utilizado pelas células e sua eficiência de consumo dependem de cada linhagem celular. Aminoácidos como glutamina, glutamato, aspartato, serina, arginina e metionina também são utilizados para produção de energia (Ikonomou *et al.*, 2003). De acordo com Drews e colaboradores (1995), aminoácidos como histidina, lisina, treonina, glicina, valina, leucina, fenilalanina, tirosina, triptofano e isoleucina, que são consumidos durante a fase de crescimento celular são incorporados em proteínas celulares e a oxidação dos mesmos para a produção de energia é insignificante.

Em geral, as concentrações de glicose e de aminoácidos podem ser fatores limitantes do crescimento celular. A falta destes nutrientes no cultivo pode ocasionar a interrupção do crescimento, ou até a morte celular. Os principais subprodutos do catabolismo, a amônia e lactato, por sua vez, podem ser fatores inibidores do crescimento.

O soro, outro importante componente do meio de cultura, é, fundamentalmente, um complexo de proteínas ideais para a nutrição celular, a adesão e o crescimento de linhagens dependentes de suporte, e a proteção biológica e mecânica em sistemas agitados e aerados. Esse componente estimula o transporte de glicose, de fosfato e de aminoácidos e aumenta a permeabilidade das membranas. Entretanto, sua utilização no meio pode causar dificuldade na recuperação e purificação de bioprodutos, devido à presença de proteínas, fatores de crescimento, e outros componentes, alguns dos quais não definidos. Além disso, o soro é uma fonte de contaminação por parasitas, bactérias, fungos, micoplasmas e vírus, e pode carrear materiais tóxicos e inibidores (como imunoglobulinas). Sua

composição e, portanto, sua eficácia como suplemento nutricional são diretamente dependentes do “histórico de vida” do animal de origem, transformando esse componente num fator de grande variabilidade para o processo. Frequentemente é o componente de maior custo no meio de cultura, podendo atingir valores da ordem de 80% do custo total do meio (Augusto; Oliveira, 2001; Moraes et al., 2008).

O soro fetal bovino é um dos principais agentes protetores contra o cisalhamento do meio de cultura. Desta forma, ao se formular um meio livre de soro é necessário utilizar outros componentes que possam exercer esta função. Dentre os mais utilizados, pode-se destacar alguns polímeros, como o Pluronic® F68, metilcelulose e polietilenoglicol.

O Pluronic® F68, um surfactante não-iônico, é o mais utilizado para o cultivo de células de insetos e de mamíferos (Palomares; Gonzalez; Ramirez, 2000). O Pluronic® F68 tem massa molar de 8,4 kDa e apresenta concentração micelar crítica (CMC) de aproximadamente 9,2 g/L. Seu uso resulta em maior sobrevivência e concentração celular, particularmente em cultivos nos quais as células estão sujeitas a efeitos hidrodinâmicos deletérios. Contudo, o uso deste composto ainda tem caráter empírico e seu mecanismo de ação é ainda debatido (Palomares; Gonzalez; Ramirez, 2000).

Em culturas aeradas, a presença do Pluronic® F68 minimiza a ligação das células às bolhas, diminuindo os danos celulares que ocorrem quando aquelas são carregadas até a superfície. Outros mecanismos propostos também incluem a estabilização da camada de espuma formada na região superior do reator e uma drenagem mais lenta do filme durante a ruptura da bolha. Este surfactante também tem efeito em culturas não aeradas, nas quais o dano celular ocorre devido aos vórtices formados, e a suplementação com Pluronic® F68 reduz a tendência das células aderirem à nova superfície (van der Pol; Tramper, 1998; Palomares; Gonzalez; Ramirez, 2000).

O efeito protetor deste surfactante pode também estar relacionado à sua associação bioquímica à membrana celular, proporcionando sua estabilização. Experimentos mostram que, em presença de Pluronic® F68, a viabilidade de hibridomas não é afetada por aumentos na frequência da agitação (Chisti, 2000). O Pluronic® F68 também tem a capacidade de reduzir a fluidez da membrana plasmática, e isto também pode estar relacionado a um possível mecanismo de proteção (Chisti, 2000).



O *yeastolate* tem sido utilizado principalmente como fonte de vitaminas, além de fornecer também carboidratos e aminoácidos (Ikonomou *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2008). É obtido por autólise de leveduras e é submetido a um processo de filtração para a remoção de proteínas com alta massa molar. A forma de atuação deste composto não é bem conhecida, entretanto, sua utilização é associada a resultados favoráveis do ponto de vista de crescimento celular.

Outra alternativa ao emprego do soro fetal bovino é o extrato de levedura, pois ele atua como fonte de vitamina, além de fornecer também polissacarídeos e aminoácidos (Ikonomou *et al.*, 2003). A forma de atuação deste composto não é totalmente conhecida, entretanto sua utilização é associada a resultados favoráveis do ponto de vista de crescimento celular.

O extrato de leite também é outro suplemento utilizado no processo de retirada do soro. Apesar do leite ser de origem animal, a diversidade de compostos presentes neste aditivo é significativamente menor que a do soro, porém a suplementação de meios de cultura com leite, colostro e extratos de soro tem sido realizada por alguns grupos de pesquisa para o cultivo de células animais (Ramirez *et al.*, 1990).

Outro suplemento de meio de cultura bastante importante para o crescimento celular na ausência do soro fetal bovino são os lipídios, constituintes importantes das células. Um concentrado lipídico utilizado para o cultivo de células animais geralmente é composto por Pluronic® F68, Tween 80, ácidos graxos, tocoferol, e colesterol. A concentração de lipídios na maioria dos meios livres de soro para o cultivo de células de mamíferos está geralmente na faixa de 10 a 100 µg/ L (Shen *et al.*, 2004).

A utilização de hidrolisados de plantas tem sido intensificada devido aos problemas oriundos da suplementação com compostos de origem animal, com a publicação de vários artigos e patentes (Ikonomou *et al.*, 2003). Heidemann e colaboradores (2000) avaliaram a utilização de extrato de planta no cultivo de células. Hidrolisados de soja e de arroz foram testados no crescimento das células de mamífero BHK- 21 produzindo uma proteína terapêutica. Os resultados mostraram que a qualidade do produto e os padrões de glicosilação não foram afetados pela presença deste hidrolisado no meio de cultura, e a produtividade aumentou cerca de 20 a 30%, apesar dos hidrolisados não apresentarem efeito de proteção contra a degradação proteolítica.

O  $\beta$ -mercaptoetanol também pode ser utilizado como aditivo ao meio de cultura no processo de adaptação celular. O mecanismo de ação deste suplemento não é totalmente conhecido, porém de acordo com Huiyong, e colaboradores (2010), o  $\beta$ -mercaptoetanol tem um efeito protetor da célula, pois ele atua como um antioxidante e ajuda na manutenção celular. Já Ashu Kumar e colaboradores (2012), relata uma melhora na expressão de proteínas com o uso do  $\beta$ -mercaptoetanol durante o processo de purificação.

### 3.3 Adaptação Celular

A adaptação a uma suspensão isenta de soro é geralmente realizada utilizando linhagens de células que já tenham sido modificadas para a expressão da proteína desejada, através de tecnologias recombinantes ou tecnologias baseadas em fusão celular.

A transição para uma cultura de células de alta densidade de suspensão livre de soro pode conduzir a mudanças no desempenho do crescimento de células e as características estruturais das proteínas secretadas. Algum declínio no desempenho de crescimento (diminuição da taxa de crescimento ou a viabilidade celular) após a retirada do soro tem sido relatada. Esta resposta a alterações nas condições de cultura é aparentemente devido a uma perturbação de eventos associados com a progressão do ciclo celular e uma entrada na fase estacionária (Butler *et al.*, 1998).

As características de crescimento gerais de desempenho das linhagens de células resultantes, bem como a integridade estrutural e funcional de proteínas expressas, devem ser cuidadosamente monitorados ao longo do processo de adaptação.

De acordo com Costa e colaboradores (2013), a redução do soro no processo de adaptação pode ocasionar desvios nos resultados de glicosilação esperados para a linhagem, isto acontece devido a variações na concentração celular e na viabilidade celular obtida nestas fases, e à mudança natural do modo de crescimento de células durante a adaptação, de aderente a suspensão.

A identificação de uma formulação de meio adequada livre de soro, assim como as condições de cultivo das linhagens de interesse, devem ser determinadas empiricamente ou por informação obtida a partir da literatura.

A fim de minimizar qualquer impacto negativo do processo de adaptação celular (taxa de crescimento, a viabilidade celular, e produtividade celular), um processo de adaptação deve funcionar da seguinte maneira (Sinacore; Drapeau e Adamson, 1999):

- a) Na primeira fase se adapta as células de cultura em suspensão;
- b) Na segunda fase ocorre a adaptação em meios livres de soro;
- c) Na terceira adaptá-se às condições de alta densidade de células.

No início de cada fase de adaptação, é importante assegurar que as células estão crescendo exponencialmente no momento do repique.

As linhagens devem ser criopreservadas em vários momentos durante o processo de adaptação para fornecer proteção adicional contra perda catastrófica de linhagens.

De acordo com Sinacore, Drapeau e Adamson (1999), a primeira fase do processo de adaptação começa com culturas em monocamada de células (T 75 ou T 150 frascos de cultura ou pratos), utilizando soro fetal bovino.

A cultura celular é repicada a uma frequência apropriada para a célula de mamífero em questão (geralmente a cada 3-4 dias) por tripsinização. Em cada ciclo de passagem, a monocamada de célula é lavada duas vezes com solução de fosfato tamponada estéril (livre de cations divalentes) e são então coberto com um volume mínimo de tripsina a 0,25%. As culturas são incubadas a 37 ° C durante 5-10min e na solução de tripsina é colocado de 5-10mL de SFB suplementado com meio de crescimento. A suspensão de células é então utilizada como inóculo de outra cultura em monocamada ou para iniciar uma cultura em suspensão.

Culturas em suspensão em frasco spinner são agitadas magneticamente e mantidas numa incubadora sob as mesmas condições de temperatura e umidade (ideal para culturas em monocamada). A cada 2-3 dias, a densidade de células viáveis da cultura é determinada e ajustada para (1 a 3 x 10<sup>5</sup>cél/mL). Se o crescimento for insuficiente para permitir a diluição por um factor de pelo menos 4:1, as células devem ser centrifugadas e suavemente ressuspensas em meio fresco.

A taxa de crescimento e a viabilidade celular da cultura devem ser cuidadosamente monitorizadas durante as primeiras semanas de cultura.

Uma vez que o desempenho de crescimento da cultura de suspensão tenha estabilizado, a cultura estará pronta para prosseguir para a etapa de redução do soro - fase de eliminação do processo de adaptação.

Esta consiste em uma série de passos em que a concentração de soro é sucessivamente reduzida. Enquanto a concentração de soro é superior a 1% (v/v), cada passo é tipicamente uma redução de 50% (v/v) na quantidade de soro presente no meio na etapa antecedente, mas quando a concentração de soro for reduzida para 1% (v/v) ou menos, o próximo passo é a substituição completa do meio de cultivo por meio isento de soro.

Em alguns casos, contudo, verificou-se que um passo inicial consistindo de uma redução 80-100% na concentração de soro pode ser bem sucedido para culturas de células CHO. Se uma etapa leva a uma crise de crescimento grave, a cultura resultante deve ser submetida a um passo menor (Sinacore; Drapeau ; Adamson ,1999)

As células podem muitas vezes adaptar-se à condições de alta densidade de células, através do desenvolvimento de tolerância a substâncias que inibem o crescimento e que são liberados pelas células. Dois exemplos de tais substâncias são o ácido láctico e o amônio. Tolerância a essas substâncias pode ser desenvolvida por adição de meio fresco em concentrações progressivamente maiores durante o programa de adaptação (Butler *et al.*, 1998).

### 3.4 Fator de coagulação VIII (FVIII)

A cascata de coagulação pode ser dividida em dois mecanismos: a via *intrínseca* e a *via extrínseca*. Estas duas vias convergem para a ativação do fator X na *via comum*, o que leva, à formação de fibrina insolúvel (Figura 3.1). A via extrínseca é iniciada com lesão do tecido e liberação de tromboplastina tecidual. Nesta via a formação do ativador extrínseco se dá quando o fator III (lipoproteína) é liberado pelos tecidos que estão em torno do vaso sanguíneo, de modo que a função proteica deste fator ativa o fator VII na presença de cálcio e o fator X ativa o fator V que vai agir com a fração lipídica do fator III. A via intrínseca é iniciada pela

exposição do sangue a uma superfície negativamente carregada. Nesta via a formação do ativador intrínseco se dá quando o fator XII se ativa espontaneamente no momento em que entra em contato com as bordas da lesão vascular. Uma vez ativado ele dá origem a uma reação em cascata que consiste na ativação do fator XI na presença do cálcio. O fator XI ativará o fator IX que ativará o fator VIII que ativará o fator X que ativará o fator V. Esse fator V reagirá com fosfolipídios liberados pelas plaquetas, originando desta forma o ativador intrínseco. Ambas as vias tem grande importância e acabam se juntando para formação do coágulo de fibrina (Berne *et al.*, 1991).

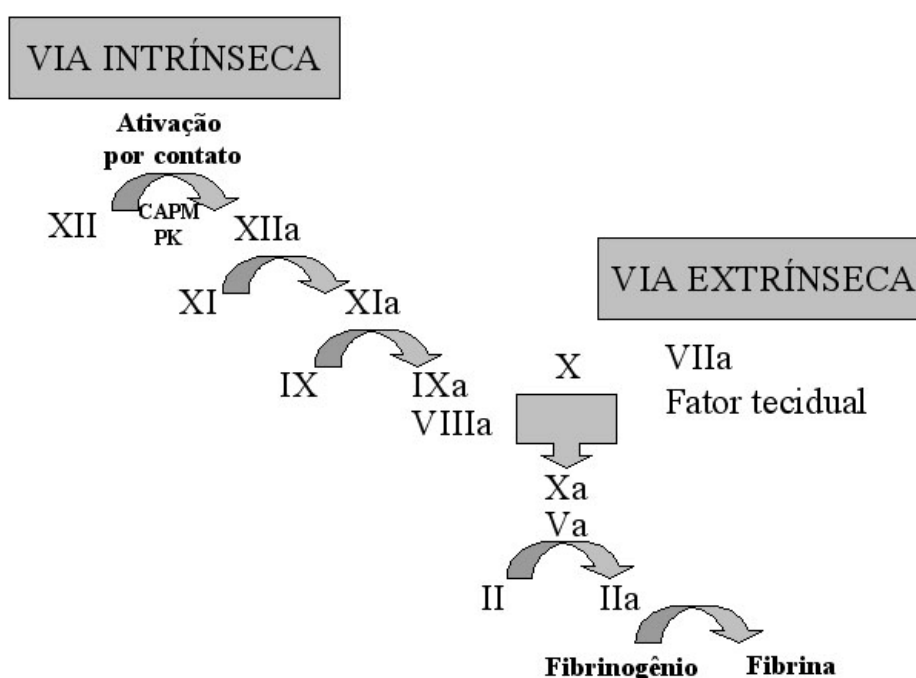


Figura 3.1- Esquema da cascata da coagulação (Franco, 2001)

Entre as opções de fontes de obtenção das moléculas de coagulação sanguínea, as formas recombinantes representam a tecnologia do futuro e tendem a substituir a produção tradicional dos fatores a partir do plasma humano (Key; Negrier, 2007).

O fator de coagulação VIII (FVIII) é uma glicoproteína plasmática complexa, que participa como um cofator essencial na ativação proteolítica do fator X pela ativação do fator IX, dentro da via de coagulação do sangue. A deficiência da atividade deste fator está relacionada a uma doença hereditária, a Hemofilia A, ligada ao cromossomo X, que ocorre em 1 a cada 5.000 nascimentos masculinos,

em todo o mundo, sendo necessária a reposição do mesmo, para o seu controle. Estatísticas mostram que, nos Estados Unidos, cerca de 80% dos pacientes com hemofilia possuem a do tipo A (Miao *et al.*, 2004).

Os fatores de coagulação podem ser obtidos a partir do plasma sanguíneo ou através de proteínas recombinantes obtidas de linhagens celulares de mamíferos, humanas ou de animais transgênicos.

Até o início dos anos 90, o tratamento da hemofilia A utilizava principalmente FVIII derivado de plasma. Os principais problemas com a utilização desse tipo de produtos eram a possibilidade de contaminação e a indisponibilidade de quantidade suficiente do produto para tratamento dos pacientes (Miao *et al.*, 2004).

Segundo Pipe (2008), o uso de proteínas recombinantes para a hemofilia começou no início dos anos 80 com a clonagem e a subsequente expressão de proteínas funcionais para os fatores VIII e IX. Em 1984, o sequenciamento do gene codificador para o FVIII e a produção do fator em culturas de células de mamíferos, constituem marcos milenares na evolução do tratamento da hemofilia. Estes avanços abriram caminho para a produção industrial de concentrados de fatores coagulantes, sem o recurso da utilização do sangue humano e permitiram antever a possibilidade da terapia gênica.

Em março de 1987, o primeiro paciente com hemofilia recebeu FVIII recombinante (rFVIII) e aproximadamente cinco anos depois o produto estava disponível para uso clínico.

Desde então, novos produtos têm sido introduzidos no mercado, dispondo-se, atualmente, de concentrados de 3ª geração, que são isentos de qualquer proteína de origem humana ou animal. Em suma, a disponibilidade de produtos eficazes e seguros, tornou possível o tratamento domiciliar.

A molécula do FVIII é grande e é uma das mais complexas proteínas terapêuticas desenvolvidas por tecnologia recombinante. A atividade da molécula é dependente da presença de vários domínios distintos e é sensível à degradação tanto química quanto física. Estudos estruturais e funcionais da molécula demonstraram que são necessárias extensivas modificações pós-tradução para que sua atividade coagulante possa ser efetiva.

Assim, segundo Pipe (2008), sua complexidade requer que ela seja produzida num sistema de expressão de células de mamíferos. Células CHO e BHK têm mostrado serem eficientes sistemas de expressão dessa proteína. Ambas

apresentam altos níveis de expressão, com capacidade de realizar as modificações pós-tradução necessárias, incluindo carboidratos complexos, e são adaptadas a cultivos em maiores escalas, o que facilita a sua produção comercial. Experiências com células CHO demonstraram que estas possuem baixa atividade proteolítica, característica importante para a produção do rFVIII intacto (Adamson, 1994).

A expressão de rFVIII em linhagens celulares humanas também é citada na literatura (Herlitschka *et al.*, 1998, Picanço *et al.*, 2007, Campos-da-Paz *et al.*, 2008, Rosenberg *et al.*, 2000). Herlitschka e colaboradores (1998) apresentam dados de linhagens celulares produtoras de FVIII, cultivadas em diferentes temperaturas (28, 33 e 37°C): o clone domínio deletado da SK-HEP-1 (ATCC HTB 52) e o clone da 293 (ATCC CRL 1573). Ambos os clones apresentaram maior atividade de rFVIII quando cultivados à 28°C, sendo que a melhor temperatura de crescimento para a linhagem 293 foi de 33°C. Clones da SK-HEP-1 apresentaram a 28°C níveis de atividade (3100 mUI/10<sup>6</sup> cel/24h) cerca de 4 vezes maior quando comparados aos obtidos a 37 °C. Na comparação das linhagens: SK-HEP-1 (fígado humano), 293 (rim humano) e CHO, são citados valores de 0,1-0,5, 100-200, 100-3500 mUI/10<sup>6</sup>cel/24h, respectivamente. A concentração de FVIII no plasma é pequena, de aproximadamente 100 ng/mL ( Herlitschka et al.,1998).

O processo de produção em grande escala completou 20 anos de otimização em 2007. Os princípios básicos de produção são semelhantes entre os produtos comerciais de fator de coagulação recombinante: um banco de células *máster*, um banco de células de trabalho (derivadas do banco *máster*) são crescidas sucessivamente em frascos de volume crescente e inoculam um biorreator de aço inox de milhares de litros. Ao alcançar uma densidade celular ótima, o meio passa por uma série de etapas de purificação que incluem restrição física, cromatografia de imunoafinidade e troca iônica, pasteurização, uma etapa de nanofiltração ou detergente-solvente com alguns preparados comerciais. Removendo todos os componentes do meio, resíduos da célula hospedeira e até mesmo fator de von Willebrand recombinante (rFvW) e uma redução de volume de 7000 litros para 1 litro de rFVIII altamente puro. Albumina bovina ou humana era um estabilizante necessário nas tecnologias de produção iniciais. As etapas finais consistiam em preenchimento de frascos e liofilização (Pipe, 2008).

Todos os produtos comerciais de FVIII são hoje liofilizados devido à sua baixa estabilidade *in vitro* no estado líquido. Muitos fatores foram identificados como

limitando a estabilidade *in vitro* do FVIII, incluindo temperatura, presença de íons metálicos, sais, lipídeos, outros excipientes das formulações, adsorção na superfície, pH, agitação, exposição à luz, processo de liofilização, congelamento e condições de estocagem (Wang; Wang; Kelner, 2003).

Várias são as empresas envolvidas no desenvolvimento e comercialização de produtos contendo FVIII: *Wyeth/Genetics Institute of Cambridge* (ReFacto®), Bayer (Kogenate® e Kogenate FS®), Baxter (Recombinate®, Advate®), Genentech Inc., Merck, Monsanto Company, *Novo Nordisk Health Care AG*, *Octogene GmbH*, *Biogen Inc.*, entre outras.

Segundo Erikson (2001), a produção do ReFacto® pela *Wyeth/Genetics Institute of Cambridge - MA* utiliza a tecnologia de DNA recombinante e um processo de perfusão para cultivo celular. A linhagem celular foi obtida a partir da inserção do gene codificante para FVIII com domínio B deletado do FVIII em células CHO.

O processo de desenvolvimento da linhagem celular envolveu a adaptação de células CHO contendo múltiplas cópias do gene DDrFVIII de forma que pudessem crescer em suspensão e em biorreatores agitados. O meio de cultivo é totalmente definido e contém somente dois componentes protéicos de origem biológica: albumina humana produzida por fabricantes licenciados para processos de cultivo de células e insulina recombinante. A produção parte de células cultivadas em frascos a baixa densidade. Após um crescimento em batelada, a cultura é realimentada com meio fresco e as células diluídas a baixa densidade. O ciclo se repete sucessivamente em frascos de volumes crescentes até inocular o biorreator. Alcançado o volume adequado, o meio fresco deixa de ser fornecido em batelada para ser fornecido de modo contínuo por perfusão.

Soukharev e colaboradores (2002) citam que a terceira geração do produto da *Wyeth/Genetics Institute of Cambridge* (ReFacto AF) é também expressa em células CHO, com banco máster de células livre de soro fetal bovino e albumina humana. O processo fermentativo requer uma única proteína que é derivada de insulina humana recombinante de *Escherichia coli*. Testes clínicos indicam a superioridade deste produto de terceira geração sobre os anteriores.

Em 1984, a Bayer licenciou a tecnologia para a produção de rFVIII da Genentech. Nos quatro anos seguintes investimentos em P&D resultaram na definição do processo de fabricação e permitiu a produção de quantidades suficientes para iniciar os testes clínicos.



### 3.5 Análise de rFVIII produzido

#### 3.5.1 Medidas da atividade biológica

Desde o início das terapias para tratamento da hemofilia, as medidas analíticas dos FVIII e FIX, tanto em amostras de pacientes quanto em materiais terapêuticos, têm sido cruciais para o desenvolvimento, controle e otimização dos tratamentos. Em particular a disponibilidade de concentrados provenientes de uma grande variedade de fontes necessitam de uma padronização das medidas de atividade do FVIII em diversos produtos. A potência dos produtos de FVIII são medidas em unidades internacionais (UI), que são definidas por um padrão internacional relevante (IS), estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Uma UI/mL equivale a 100% de atividade do fator e corresponde à quantidade existente, em média, no plasma sanguíneo humano (Barrowcliffe, 2002).

O FVIII é um pro-cofator (glicoproteína) e não uma enzima, então a determinação é indireta, sendo medida a sua atividade como co-fator na ativação do fator X pelo fator IXa (Figura 3.1). O produto dessa ativação, o fator Xa, pode ser medido diretamente pelo método cromogênico ou de maneira indireta pela geração da fibrina pela trombina, formada pela cascata de coagulação (teste de um ou dois estágios denominado de Tempo da Tromboplastina Parcialmente ativada - TTPa). (Barrowcliffe, Raut; Hubbard., 1998; Mikaelsson; Oswaldsson; Jankowski., 2001).

No método de coagulação de um estágio, ou no Inglês activated Partial Thromboplastin Time (aPTT), é necessária a utilização de plasma deficiente em FVIII como substrato. O método de dois estágios é dividido em duas etapas. Na primeira a ativação dos fatores, V e X, está relacionada com a atividade do FVIII da amostra. Na segunda etapa, protrombina e fibrinogênio são adicionados e o tempo de coagulação é medido. O princípio do método cromogênico é similar ao método da coagulação de dois estágios no que diz respeito à etapa de incubação para a geração do fator X ativado e por não necessitar do plasma deficiente para diluir amostra. A quantidade de fator X ativado é medida numa segunda etapa pela quebra do peptídeo cromogênico do substrato e a liberação da p-nitroanilina, sendo assim medido espectrofotometricamente através da mudança da cor (Mikaelsson; Oswaldsson; Jankowski, 2001).

O método de coagulação de um estágio sempre foi utilizado preferencialmente em triagens clínicas, devido à sua simplicidade e a facilidade para automação; já o de dois estágios foi utilizado pelos fabricantes devido à sua alta precisão e por não depender de um plasma deficiente. Em laboratórios clínicos, o método de um estágio ainda é utilizado para monitorar o nível de FVIII nas amostras dos pacientes, principalmente devido ao custo mais baixo (Mikaelsson; Oswaldsson; Jankowski., 2001).

Atualmente, apesar da utilização do método cromogênico estar bastante difundida, a maior parte dos fabricantes dos EUA ainda utiliza o método de coagulação de um estágio para medida de atividade biológica dos concentrados, enquanto que na Europa os fabricantes adotam o método cromogênico como padrão (Barrowcliffe, Raut; Hubbard., 1998; Barrowcliffe, 2003).

Desde 1994, o cromogênico é o método de referência para concentrados na Farmacopéia Européia, e também é o método de referência para a medida de concentrados de FVIII recomendado pela Sociedade Internacional de Trombose e Hemostase (ISTH) (Mikaelsson; Oswaldsson; Jankowski., 2001).

Mesmo com toda a preocupação por uma padronização nos métodos de determinação de atividade, ainda há muita discrepância entre os resultados obtidos pelo método cromogênico e o de coagulação de um estágio (Mikaelsson; Oswaldsson; Jankowski., 2001, Barrowcliffe, 1998). Em moléculas rFVIII b deletadas os valores de atividade biológica chegam a ser 50% menores quando obtidos pelo método de um estágio, se comparados aos obtidos pelo método cromogênico (Ingerslev et al., 2004; Mikaelsson; Oswaldsson; Sandberg, 1998; Hubbard et al., 2001).

Duas têm sido as estratégias para tentar diminuir estas diferenças. Uma delas é utilizar o método cromogênico na triagem clínica de pacientes que recebem rFVIII B-deletado, enquanto na segunda se têm buscado a introdução de um padrão específico para moléculas deletadas.

Entre 2003 e 2004 foram realizados estudos interlaboratoriais, nos quais foi empregado um padrão de referência específico para rFVIII B-deletado (ReFacto Laboratory Standard™).

Os resultados obtidos nestes estudos mostram que a utilização de um padrão produto-específico ajudou a diminuir a diferença entre os valores obtidos pelo

método de um estágio e o cromogênico, para valores menores que 10% (Ingerslev et al., 2004; Hubbard; Sands; Barrowcliffe, 2003).

Neste projeto serão feitas medidas da atividade biológica do FVIII tanto pelo método de coagulação de um estágio (TTPa), como pelo método cromogênico, visto que esses métodos são recorrentes em laboratórios de pesquisa envolvidos com a produção e estudo de rFVIII (Purohit et al., 2003; Yatuv; Dayan; Baru, 2006; Dooriss et al., 2009; *apud* Herlitschka et al., 1998; Neidhardt et al., 2005, LIND et al., 1995; Parker et al., 2004).

### 3.5.2 Medida da quantidade total de rFVIII produzido

Uma das maneiras muito utilizada para comparar a eficiência dos métodos de medida de atividade é a utilização do método ELISA para a quantificação do FVIII total. A metodologia ELISA é capaz de detectar a proteína na forma ativa como também na forma inativa, o que aliado às análises de medida de atividade biológica, o que poderia dar informações importantes, do ponto de vista do controle de processo, sobre a expressão da proteína.

Para o teste ELISA é importante que existam epítopos da proteína livres para que o anticorpo os reconheça. O FVIII é uma glicoproteína multi-domínios composta de uma cadeia pesada (domínios A1,A2 e B) e uma cadeia leve (A3-C1-C2) (Figura 3.2).

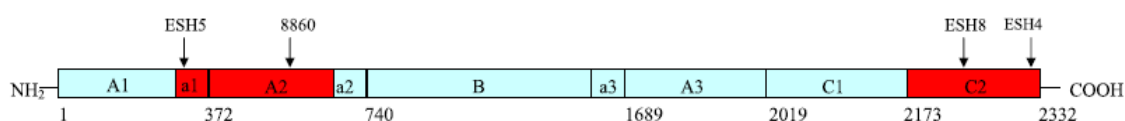


Figura 3.2. Representação esquemática da estrutura do domínio do FVIII e os anticorpos monoclonais reconhecendo diferentes epítopos (Purohit et al., 2003).

O teste ELISA com anticorpos específicos para cadeia leve e para cadeia pesada é muito empregado na quantificação de rFVIII total, principalmente nos estudos de moléculas que tiveram o domínio B-deletado (Purohit et al., 2003; McCormick et al., 2004; Burton et al., 1999; Miclea et al., 2007; Purohit et al., 2006; Neidhardt et al., 2005; Fang et al., 2001).

Os resultados obtidos por Mikaelsson, Oswaldsson e Jankowski (2001) demonstraram que existe uma boa concordância entre os dados obtidos por ELISA e o método cromogênico, enquanto que com o método de um estágio há uma maior variabilidade. Para obter resultados comparáveis em todas as metodologias analíticas é de fundamental importância a obtenção de um padrão produto-específico. Para moléculas b-deletadas o padrão utilizado é o ReFacto Laboratory Standard™, que é um produto específico para o produto ReFacto® da Baxter. Estão sendo feitos esforços para a obtenção deste padrão junto a Organização Mundial da Saúde. Uma alternativa para a obtenção de um padrão ainda mais específico para o produto, em estudo, seria purificar o produto obtido e usá-lo como padrão nas análises. A desvantagem é que o processo de purificação do produto ainda está em desenvolvimento.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Linhagens celulares

Os ensaios utilizaram a linhagem celular humana do fígado Skhep-FVIIIdeIB-GFP-CMV (SKHep-FVIII), que expressa o fator de coagulação VIII recombinante (rFVIII) B-deletado (Picanço et al. 2007). As células foram preservadas em nitrogênio líquido em meio de preservação constituído de 40% (v/v) de meio fresco, 10% (v/v) de dimetilsulfoxido (Merk, Brasil) e 50% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Hyclone, EUA). Como esta linhagem foi adaptada a diferentes meios de cultura e cada condição pode ter selecionado uma subpopulação de células, foram preparados diferentes bancos para cada uma dessas subpopulações, nos referidos meios de cultura.

### 4.2 Meio de cultura

#### 4.2.1 Formulação básica (com SFB)

##### 4.2.1.1 *Formulação aberta*

**Meio DMEM:** O meio DMEM (Sigma D7777) foi acrescido de glutamina (0,584 g/L, Sigma), de bicarbonato de sódio (3,7 g/L, Sigma) e de 10% (v/v) de soro fetal bovino - SFB (Hyclone), conforme orientações do fornecedor. Este meio foi utilizado para o objetivo de adaptação da linhagem ao cultivo em suspensão.

#### 4.2.2 Formulações isentas de SFB

Vários meios foram utilizados na tentativa de encontrar a melhor opção no processo de retirada do SFB. Alguns meios foram suplementados com aditivos extras visando favorecer a adaptação da linhagem em estudo. As características do meio, o sistema de cultivo utilizado, as estratégias de retirada do soro, juntamente

com os aditivos adicionados em cada tentativa de adaptação encontram-se na tabela 4.1. Maiores detalhes destas tentativas de adaptação estão descritas nos próximos itens.

#### *4.2.2.1 Meios Quimicamente definidos*

**Meio HyCD:** HyClone CDM4CHO<sup>TM</sup> (SH30556.01, Hyclone) o fornecedor recomenda-se o acréscimo de glutamina (0,584 g/L, Sigma) e de bicarbonato de sódio (3,7 g/L, Sigma), porém na tentativa de adaptação Adapt 8 foi adicionado além dos suplementos recomendados o Pluronic (1g/L, Sigma) e o  $\beta$ mercaptoetanol (2  $\mu$ g/mL).

**Meio Sigma Fusion:** SAFC Ex-Cell<sup>TM</sup> CD CHO (14365C, SAFC Bioscience) acrescido de glutamina (0,584 g/L, Sigma), sugerido pelo fornecedor.

#### *4.2.2.2 Meios Livres de Soro*

**Meio HySF:** HyClone SFM4CHO<sup>TM</sup> Utility Multi (SH30517.01, Hyclone). Meio acrescido de glutamina (0,584 g/L, Sigma), de bicarbonato de sódio (2,2 g/L, Sigma) e de Pluronic (1g/L, Sigma), conforme orientações do fornecedor.

**Meio EX-Cell 302:** SAFC Ex-Cell<sup>TM</sup> 302 CHO Serum-Free Medium (24326C, SAFC Bioscience) o fornecedor sugeriu a adição de glutamina (0,584 g/L, Sigma), de bicarbonato de sódio (2,6 g/L, Sigma) e de Pluronic (1g/L, Sigma).

#### *4.2.2.3 Meio livre de componente animal*

**Meio Sigma ACF:** SAFC Ex-Cell<sup>TM</sup> ACF CHO Medium (C9098, SAFC Bioscience) acrescido de glutamina (0,584 g/L, Sigma) e de bicarbonato de sódio (3,7 g/L, Sigma). Na adaptação Adapt 12, foi utilizado como suplemento extra o  $\beta$ mercaptoetanol (2  $\mu$ g/mL).



### 4.3 Preparo do inóculo

Os inóculos dos ensaios em spinner, foram preparados em spinners de 250 mL (Bellco Biotech. Inc., modelo 1965, EUA), com volumes de trabalhos de 30 mL.

Os spinners eram inoculados com  $2,0 \cdot 10^5$  cel/mL e incubados em estufa com em atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% (v/v) (3110, Thermo Forma), a 37°C sob agitação de 50 rpm (Bell multi-stir, Bellco Glass Inc., EUA). As células sempre estavam em fase de crescimento exponencial.

### 4.4 Sistemas de cultivo

Foram utilizados dois sistemas de cultivo, descritos abaixo:

- a) Frascos T (Corning), com 25, 75 ou 150 cm<sup>2</sup> de área; para a reativação das células e ensaios preliminares. Neste sistema, os frascos de cultura eram inoculados com  $1,0 \times 10^5$  cel/mL e a incubação era feita a 37 °C, em atmosfera a 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>, em estufa (3110, Thermo Forma). Esse sistema foi utilizado para a manutenção da linhagem, preparo de inóculo e ensaios preliminares.
- b) Frascos spinner de 100 e 250 mL (modelo 1965, Bellco Biotech. Inc., -EUA), munidos de 1 impelidor com 2 pás planas (5 x 2,5 cm), posicionadas a cerca de 5 mm do fundo. A agitação era controlada em 50 rpm por agitador magnético (Bell multi-stir, Bellco Glass Inc., EUA). Os spinners eram inoculados com  $2,0 \times 10^5$  cel/mL e a incubação era feita a 37°C, em atmosfera a 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>, em estufa (3110, Thermo Forma). Esse sistema foi utilizado para a manutenção da linhagem, o preparo de inóculo, nos ensaios de estudo cinéticos e nos vários testes de adaptação a meios livres de soro e à condição de crescimento em suspensão.



#### 4.5 Descrição dos ensaios:

##### 4.5.1 Cinética de crescimento da SKHep-FVIII aderentes em meio contendo soro.

Procurou-se caracterizar o crescimento, o metabolismo e a produção da linhagem em estudo, nas condições de suspensão mais ainda aderida, ou seja, em spinner, contendo microcarregador Cytodex 1 (GE HeathCare, Suécia), conforme descrito na tabela 4.2, de forma a aumentar a área disponível para o crescimento da célula e verificar o seu comportamento em outro sistema de cultivo. O meio utilizado foi o Meio 01 (Adapt 1), conforme tabela 4.1.

Antes da utilização no sistema o microcarregador foi hidratado com uma solução de PBS por 24 horas. No dia seguinte o mesmo é autoclavado para utilização no sistema spinner. Em estudos realizados pela doutoranda Cássia Andrade, verificou-se que a melhor condição de uso é a concentração de 3 g/L de microcarregador e um inóculo de três células por microcarregador. Dessa forma, o estudo foi conduzido utilizando esses valores. O spinner foi inoculado com um volume de 140 mL e com uma concentração inicial de células de  $3,5 \cdot 10^4$  cel/mL e controlou-se a temperatura em 37 °C, em atmosfera com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> e a agitação em 50 rpm. Amostras foram coletadas em intervalos de tempo regular para avaliação do crescimento e do metabolismo celular neste cultivo, conforme descrito no item 4.6.

##### 4.5.2 Adaptação da linhagem ao crescimento em suspensão

Em seguida, a linhagem foi adaptada para crescimento em suspensão, em sistema tipo spinner (Meio 1, Adap 3, Tabela 4.1). A adaptação seguiu o procedimento descrito abaixo:

**Tabela 4.2** Quadro de ensaios realizados para estudos cinéticos do crescimento e do metabolismo da SKHep-FVIII.

<b>Nome no Lab.</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Célula</b>	<b>Forma de crescimento</b>	<b>Sistema</b>	<b>V (mL)</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>X<sub>0</sub> (cel/mL)</b>
Tati_01	Cinética de crescimento, em meio isento de soro fetal	SKHep_FVIII HyCD	Suspensão	Spinner	140	Meio 5	2,00E+05
Tati_03	Cinética de crescimento em microcarregador, em meio com SFB	SKHep_FVIII	Aderida	Spinner + Microcarregador	140	Meio 1	3,50E+04
Tati_04	Cinética de crescimento em suspensão, em meio com SFB	SKHep_FVIII DMEM Sp	Suspensão	Spinner	140	Meio 1	2,00E+05

- a) Homogeneizava-se o meio de cultura presente no frasco spinner que contém células a serem repicadas;
- a) Realizava-se a transferência de todo o volume para um tubo de fundo cônico de volume compatível;
- b) Centrifugavam-se as células em suspensão (10 min, 25°C, 280 g);
- c) Descartava o sobrenadante, porém reservava-se 3 mL para serem adicionados ao novo spinner, o que correspondia a um uso de 10 % (v/v) de meio metabolizado no cultivo subsequente;
- d) Adicionava-se PBS ao tubo de fundo cônico; e ressuspendiam-se as células;
- e) Centrifugava-se novamente a suspensão (10 min, 25°C, 280 g);
- f) Descartava-se todo o sobrenadante;
- g) Procedia-se à individualização para separar as células presentes nos grumos utilizando-se tripsina (2 g/L de tripsina; 8 g/L de NaCl; 0,3 g/L de KCl; 1,14 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g/L EDTA-Na, reagentes Sigma);
- h) Realizava-se a inativação da tripsina, adicionando-se meio com 10% de soro fetal bovino (mínimo de 2:1, meio: tripsina);
- i) Retirava-se amostra para determinar a concentração e a viabilidade celular;
- j) Em um tubo de fundo cônico de volume compatível centrifugava-se o volume correspondente de suspensão de células a ser utilizado para iniciar novo cultivo. Esse volume deveria conter células suficientes para iniciar o novo cultivo com concentração de  $2,0 \times 10^5$  cel/mL;
- k) Descartava-se o sobrenadante e ressuspendiam-se as células com meio fresco;
- l) Retirava-se amostra de 1 mL para determinação da concentração inicial e a viabilidade celular;
- m) Incubava-se a cultura em estufa, a 37 °C, sob agitação de 50 rpm;
- n) O tempo de incubação variou para cada teste e era determinado mediante amostragens intermediárias. Procurou-se realizar os repiques com células em fase de crescimento exponencial.

Após a adaptação da linhagem ao cultivo em suspensão, realizou-se um ensaio para avaliar a cinética de crescimento e produção (Tati\_04), conforme tabela

4.2. Nesse ensaio, a concentração inicial de células foi de  $2.10^5$  cel/mL. A cinética foi realizada em spinner de 250 mL de volume, utilizando 140 mL de meio. O tratamento das amostras esta descrita no item 4.6.

#### 4.5.3 Adaptação a meios de cultura isentos de soro;

Os diferentes meios de cultura isentos de SFB foram estudados para verificar a possibilidade de substituir a formulação do Meio 01 para a produção de rFVIII. Além disso, foi avaliado o efeito da adição de diferentes suplementos, assim como as diferentes estratégias na retirada do SFB para adaptar a linhagem ao crescimento nessas condições. Todas as estratégias na tentativa de obter sucesso na adaptação estão descritas na tabela 4.1.

Para a realização dessas adaptações, utilizou-se o mesmo procedimento da adaptação da linhagem à suspensão, conforme descrito no item 4.5.2, lembrando que no item “m” do procedimento promovia-se uma alteração no meio fresco, com substituição de parte de seu volume por meio isento de SFB. As estratégias adotadas para retirada do soro são descritas a seguir:

- a) Em degrau, *i.e.*, com substituição total (100%) do meio contendo SFB por meio isento de SFB, no instante inicial da adaptação;
- b) Lenta e gradativa com retirada de aproximadamente 25% do volume de meio contendo SFB a cada subcultivo;
- c) Lenta e com pausas na diminuição do percentual de meio contendo SFB, *i.e.*, mantendo os diferentes percentuais de SFB por alguns repiques. Dessa forma, esperava-se que as células tivessem mais tempo para adaptação.

Após a adaptação da linhagem ao cultivo em suspensão isento de soro, realizou-se um ensaio para avaliar a cinética de crescimento e produção. Nesse ensaio, a concentração inicial de células foi de  $2.10^5$  cel/mL (ensaio Tati\_01, tabela 4.2). O meio utilizado foi o Meio 5 (tabela 4.1).

A cinética foi realizada em spinner de 250 mL de volume, utilizando 140 mL de meio. O tratamento das amostras esta descrita no item 4.6.

Quando se realizou esta cinética, a adaptação da SKHep-FVIII estava na 15<sup>o</sup> passagem no meio totalmente sem soro.

#### 4.6 Tratamento de amostra

Para todos os ensaios indicados na tabela 4.2, foram coletadas amostras em intervalos de tempo regulares. No caso dos ensaios realizados em frasco T, cada amostra era realizada em duplicata (2 frascos T), sendo coletada uma amostra de cada frasco; nos ensaios em spinner, retirava-se 6 mL de amostra do sistema.

Media-se, então, o valor do pH, separava-se uma parcela da amostra para determinação da concentração celular e da viabilidade e o restante era centrifugado a 280 g, por 10 min a temperatura ambiente. Duas alíquotas de 100 µL do sobrenadante eram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C (MDF-U53VC, Sanyo) para determinação posterior do produto rFVIII. O restante do sobrenadante era armazenado em freezer comum a -20 °C (Brastemp, Brasil) até o momento das análises para determinação do consumo de glicose e síntese de metabólitos (lactato e amônio).

No ensaio utilizando microcarregador a parcela da amostra separada (1 mL) para determinação da concentração celular e da viabilidade segue tratamento diferenciado.

Primeiro esperava-se o microcarregador depositar no fundo do tubo cônico e, com ajuda de uma micropipeta retirava-se 900 µL do sobrenadante, tomando-se o cuidado para não resuspender o microcarregador. Em seguida realizava-se a lavagem das células adicionando-se 900 µL de PBS e suspendiam-se as células com auxílio de uma micropipeta. Em seguida, centrifugava-se a suspensão (10 min, 25°C, 280 g), com auxílio de uma micropipeta retirava-se exatamente 900 µL de sobrenadante. Depois, adicionava-se 300 µL de tripsina 0,4% e incubava-se por 1 hora na estufa a 37°C. Finalmente, para inativar a tripsina, adicionava-se 600 µL de meio de cultura DMEM com 10% SFB, para então proceder à determinação da concentração e da viabilidade celular.

## 4.7 Métodos analíticos

### 4.7.1 Concentração celular

A concentração de células foi determinada estatisticamente, através de contagem em câmara de Neubauer (Freshney, 2005), utilizando microscópio ótico modelo Axyovert (Zeiss). As medidas foram sempre feitas em duplicata.

### 4.7.2 Viabilidade celular

A viabilidade foi avaliada utilizando-se o método de exclusão por corante azul de tripan. Neste método, adiciona-se uma solução de azul de tripan (Merck) 0,4% (p/v) em PBS à suspensão de células, na proporção 1:1 (amostra: azul de tripan). As células mortas não conseguem excluir este reagente do citoplasma e aparecem azuis (Freshney, 2005).

### 4.7.3 Confluência

A confluência é a medida da ocupação da superfície do frasco de cultivo (tipo T) pelas células aderidas, mediante observação da cultura ao frasco em microscópio ótico (Axyovert, Zeiss). O resultado era expresso em termos percentuais referindo-se à área do frasco ocupada pelas células.

### 4.7.4 Determinação da concentração de glicose

As amostras, armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , eram descongeladas à temperatura ambiente e desproteinizadas usando solução de ácido tricloroacético (TCA) na concentração de 240 g/L, numa proporção de 4:1 (volume de amostra: volume de TCA) e centrifugadas a 4.000 rpm (5810R, Eppendorf), por 20 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante era então filtrado em membrana de porosidade  $0,45\mu\text{m}$  (Millipore) antes da injeção na coluna cromatográfica.

Para determinação de glicose, utilizou-se o método de cromatografia líquida (HPLC), realizado em equipamento da marca Waters (EUA): bomba modelo W510 ou W600E, detector de índice de refração modelo W410 ou W2414, injetor automático modelo W717, programa para integração dos picos Millenium 3.20. O sistema de colunas cromatográficas era composto de uma pré-coluna Shodex SC-G e de coluna Shodex SC1011. A temperatura do forno da coluna empregada foi de 72°C e a do detector foi de 45°C. Como fase móvel da coluna foi utilizada uma solução de EDTA[Ca][Na]<sub>2</sub> na concentração de 0,187 g/L com vazão de 0,6 mL/min. O volume de injeção era de 10µL e o tempo de corrida de 45 minutos. A cada lote de amostras analisadas, foi feita uma curva de calibração a partir de diluição sucessiva de uma solução padrão de glicose (3,0 g/L) previamente preparada.

#### 4.7.5 Determinação da concentração de ácido láctico

As amostras foram desproteinizadas conforme descrito no item 4.7.4.

Para determinação da concentração de lactato utilizou-se também o método de cromatografia líquida (HPLC), realizado em equipamento da marca Waters (EUA): bomba modelo W510 ou W600E, detector de índice de refração modelo W410 ou W2414, injetor automático modelo W717, programa para integração dos picos Millenium 3.20. O sistema de colunas cromatográficas era composto de uma pré-coluna shodex SH-G e de coluna Shodex SH1011. A temperatura do forno da coluna empregada foi de 60 °C e a do detector, de 45 °C. Como fase móvel da coluna foi utilizada solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N com vazão de 1,0 mL/min. O volume de injeção era de 20µL e o tempo de corrida de 20 minutos. A cada lote de amostras analisadas, foi feita uma curva de calibração a partir de diluição sucessiva de uma solução padrão de lactato (3,0 g/L) previamente preparada.

#### 4.7.6 Determinação da concentração de amônio

Para a determinação de amônio foi utilizado um potenciômetro (Mettler, modelo 225) e um eletrodo específico (9512, Orion) que detecta variações de

milivoltagem quando ocorre a conversão de amônio em amônia, pela adição de NaOH.

Para isto, adicionava-se uma solução de NaOH 10M (Merck, Brasil) às amostras na proporção 1:100 (álcali : amostra). As curvas de calibração era feitas com soluções padrão de sulfato de amônio (Merck) nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 ppm. Amostras de referência produzidas no próprio laboratório eram utilizadas na validação das curvas de calibração.

#### 4.7.7 Análise de produção de rFVIII

A determinação da concentração de rFVIII nas amostras coletadas foi realizada por dois métodos distintos.

##### Método cromogênico

Esse teste de produção do rFVIII foi realizado pelo Hemocentro de Ribeirão Preto. O método cromogênico, de quantificação de rFVIII foi realizado pelo kit comercial COAMATIC, da Chromogenix, (Herlitschka *et al.*, 1998; Neidhardt *et al.*, 2005; Lind *et al.*, 1995, Kessler *et al.*, 2005). O fabricante do *kit* é a *Instrumentation Laboratory Company* e os códigos dos produtos utilizados são: 82409463 e 303410R0. Este *kit* permite a análise utilizando microplacas, o que leva a um rendimento maior com relação ao número de análises realizadas.

Na preparação do teste, realiza-se a reconstituição dos reagentes para a preparação da curva de calibração e adições na amostra. Uma alíquota da amostra de 25 µL é adicionada em 2000 µL da solução tampão. Depois se retira 200 µL da amostra diluída e incuba-se a 37°C por 4 min. Na cubeta contendo amostra, acrescenta-se 200 µL do fator reagente e incuba-se novamente a 37°C por mais 4 min. Finalmente, adiciona-se 200 µL do substrato. A cor é, então, lida fotometricamente a 405 nm.



### Método TTPa de 1 estágio

Essa análise foi realizada no IPT, empregando o Tempo da Tromboplastina Parcialmente ativada (TTPa) e utilizando o coagulômetro Start4 (Diagnostica Stago).

Uma alíquota de plasma deficiente (50  $\mu\text{L}$ ) em FVIII era aquecida a 37°C por 30-45 s. Diluições das amostras (50  $\mu\text{L}$ ) de sobrenadante dos cultivos eram adicionadas ao frasco anterior, seguidas da adição do reagente TTPa (50  $\mu\text{L}$ ) (STA-PTT A, Diagnostica Stago) e incubadas a 37°C, por 180 s. A coagulação foi iniciada pela adição de uma solução de  $\text{CaCl}_2$  20mM pré-aquecido a 37°C e o tempo de formação do coágulo foi medido. A curva padrão foi construída usando diluições de um *pool* de plasmas normais, tratado da forma descrita acima. Foram feitos dois controles (patológico e normal) que apresentaram a resposta esperada. A regressão linear do tempo de coagulação vs o logaritmo da atividade foi usado para interpolar os tempos de coagulação observados.

#### 4.7.8 Medida de pH

Esta medida era realizada por meio de eletrodo de pH (Metler Toledo, modelo 405, Brasil) calibrado com tampões de pH 4 e 7 (Merck, Brasil).

#### 4.8 Tratamento dos dados

##### 4.8.1 Determinação da máxima velocidade específica de crescimento

A velocidade específica de crescimento ( $\mu_X$ ) instantânea é definida pela equação:

$$\mu_X = \frac{1}{X_V} \cdot \frac{dX_V}{dt} \quad (1)$$

onde,  $X_v$  refere-se à concentração de células viáveis e  $t$  ao tempo do cultivo.

Durante a fase exponencial de crescimento o valor de  $(\mu_x)$  é máximo e constante  $(\mu_{X,Max})$ , podendo ser calculado como o coeficiente angular da reta obtida no gráfico:  $\ln X = f(t)$

#### 4.8.2 Determinação do Tempo de geração

O tempo de geração ou o tempo de duplicação da população é obtido na fase de crescimento exponencial através da equação:

$$t_G = \frac{\ln(2)}{\mu_{X,Max}} \quad (2)$$

#### 4.8.3 Determinação dos Fatores de conversão

Vários fatores de conversão de substratos a células e de substratos em subprodutos foram calculados nesse estudo.

O fator de conversão global de glicose à célula é a quantidade de células produzidas por unidade de glicose consumida e é definido pela Equação 3:

$$Y_{X/GLC} = \frac{X - X_0}{GLC_0 - GLC} \quad (3)$$

onde  $Y_{X/GLC}$  é o fator de conversão de glicose a célula (cel/g),  $X$  e  $X_0$  são as concentrações de células viáveis (cel/mL) nos instantes  $t$  e  $t_0$ , respectivamente, e  $GLC$  e  $GLC_0$  são as concentrações de glicose (g/L) nesses mesmos instantes.

Esses valores foram calculados para cada condição experimental durante a fase exponencial de crescimento como o coeficiente angular da curva  $X=f(GLC)$ .

De forma análoga, foram definidos o fator de conversão global de glicose à lactato (Equação 4), o fator de produção de amônio por unidade de célula gerada

(Equação 5) e o fator de produção de rFVIII por unidade de célula gerada (Equação 6).

$$Y_{LAC/GLC} = \frac{LAC - LAC_0}{GLC_0 - GLC} \quad (4)$$

$$Y_{NH_4^+/X} = \frac{NH_4^+ - NH_4^+_0}{X - X_0} \quad (5)$$

$$Y_{rFVIII/X} = \frac{rFVIII - (rFVIII)_0}{X - X_0} \quad (6)$$

Esses valores foram calculados para cada condição experimental, durante a fase exponencial de crescimento, como o coeficiente angular da curva  $LAC=f(GLC)$ , de  $NH_4^+=f(X)$  e  $rFVIII=f(X)$ , respectivamente.

#### 4.8.4 Produtividades em células e em produto

A produtividade em células é definida pela Equação 7:

$$P_X = \frac{X_{Fim} - X_0}{t_{Fim} - t_0} \quad (7)$$

onde  $\Pi_X$  é a produtividade em células (cel/mL.h),  $X_{Fim}$  e  $X_0$  são as concentrações de células viáveis (cel/mL) nos instantes  $t_{Fim}$  (tempo para máximo valor de  $X$ ) e  $t_0$  (instante inicial), respectivamente.

De forma análoga, a produtividade em produto é definida pela Equação 8:

$$P_{rFVIII} = \frac{rFVIII_{Fim} - rFVIII_0}{t_{Fim} - t_0} \quad (8)$$

onde  $\Pi_{rFVIII}$  é a produtividade em produto (UI/mL.h),  $rFVIII_{Fim}$  e  $rFVIII_0$  são as concentrações de fator VIII recombinante (UI/mL) nos instantes  $t_{Fim}$  (tempo para máximo valor de  $X$ ) e  $t_0$  (instante inicial), respectivamente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudos em meio de cultivo contendo SFB

Inicialmente, procurou-se caracterizar o crescimento, o metabolismo e a produção da linhagem em estudo, nas condições originais de cultura, *i.e.*, em Meio 01 (Adapt 1, Tabela 4.1). Os resultados cinéticos do ensaio realizado em microcarregador (T, descritos abaixo, foram comparados a uma condição de cultivo em frasco T, experimento realizado no trabalho de doutorando da aluna Cássia Andrade, integrante do projeto Finep/ Hemocentro/ IPT/ Butantan (Ensaio TF8\_10). Para facilitar a discussão, reproduz-se aqui os resultados desse experimento que pode ser considerado como uma condição de referência de crescimento, metabolismo básico e produção de rFVIII (Figura 5.1). A linhagem estudada apresentou um comportamento cinético semelhante ao de outras linhagens celulares de mamíferos dependentes de suporte:

- a) a máxima concentração celular foi de  $1,41 \cdot 10^6$  cel/mL. Esses valores estão de acordo com aqueles apresentados na literatura como típicos para cultivos com células animais:  $2 - 4 \cdot 10^6$  (Chico et al., 2008);
- b) a velocidade específica máxima ( $\mu_{X,MAX}$ ) foi de  $0,028 \text{ h}^{-1}$ , o que equivale a um tempo de geração de 24,8 h. A literatura apresenta como valores típicos para células animais  $0,2$  e  $0,4 \text{ h}^{-1}$  (Chico et al., 2008);
- c) há formação de subprodutos (lactato e amônio), em decorrência do consumo dos substratos (glicose e glutamina, respectivamente);
- d) há o re-consumo de lactato quando ocorre esgotamento da glicose, mas o mesmo comportamento não foi observado para o amônio.

O término da fase exponencial de crescimento, indicado como uma linha vertical na Figura 5.1, em geral, é um indicativo de uma condição de limitação (carência nutricional) ou de inibição (acúmulo de substância tóxica) do sistema. Há três hipóteses para o término da fase exponencial nesse caso:

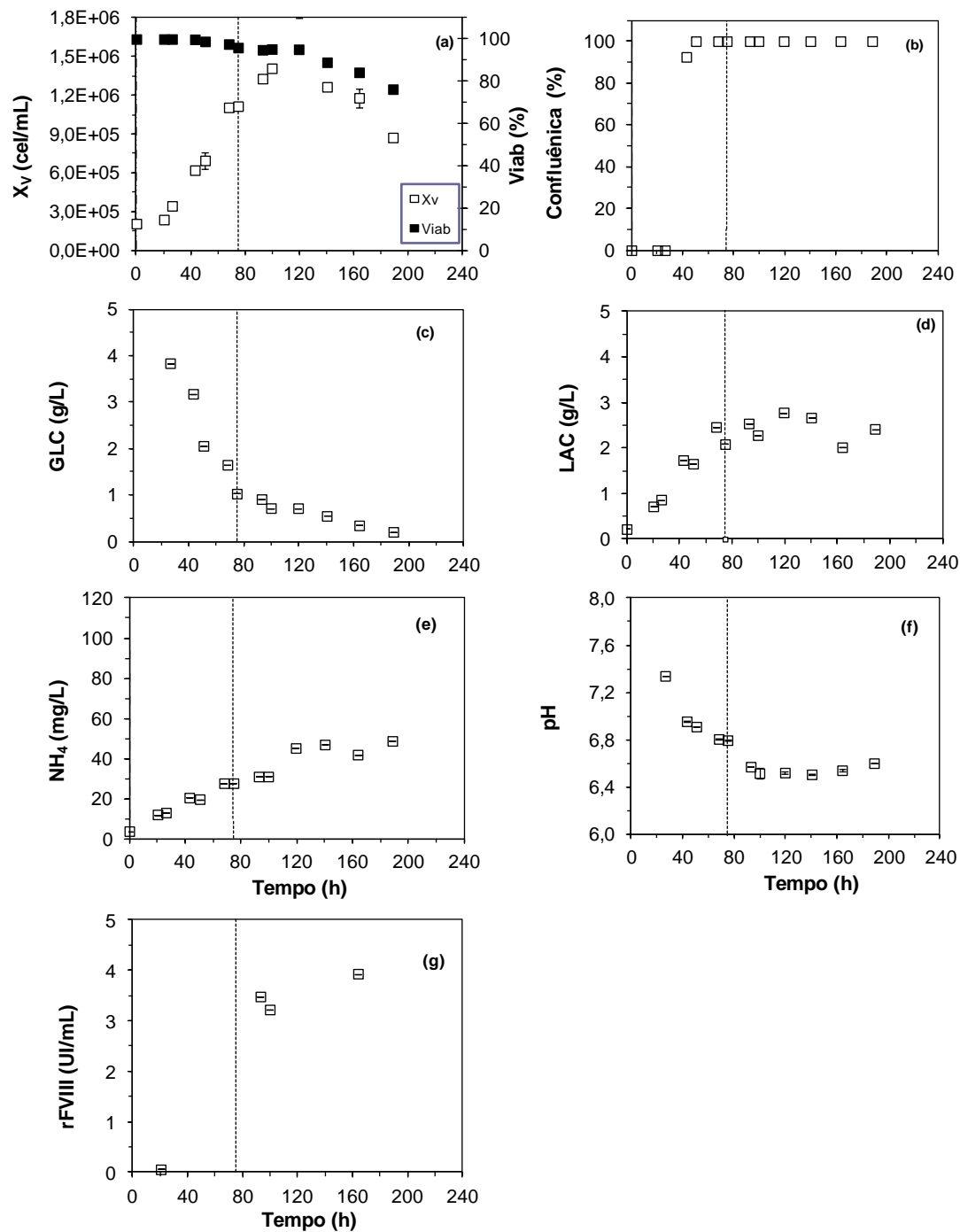
- a) falta de superfície para a adesão das células (confluência de 100%). Células dependentes de suporte podem apresentar “inibição por contato” quando há carência de superfície para adesão.

Vale ressaltar que o cultivo atingiu valor máximo de confluência com 50,5 h (Figura 5.1.b), *i.e.*, 24 h antes do término da fase exponencial de crescimento. O que se pode observar ao microscópio é que após a confluência total, o tapete celular sofre uma compactação adicional, dando a idéia de que um crescimento adicional ainda aconteceu;

- b) inibição por amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) ou lactato (LAC), que atingiram valores de aproximadamente 28 mg/L e 2,3 g/L, respectivamente, no final da exponencial.

O valor de concentração de amônio é inferior àquele apresentado na literatura como potencial causador de efeito inibitório sobre o crescimento celular: 36-72 mg/L (Gòdia; Cairó; 2006). Portanto, parece pouco provável que esteja ocorrendo um efeito inibitório neste caso. Entretanto, a concentração de lactato observada, encontra-se numa faixa tipicamente inibitória para células animais: superior a 1,8 g/L (Gòdia; Cairó; 2006). Logo, tal hipótese não pode ser descartada tão facilmente;

- c) limitação em glutamina (GLN) é outra hipótese, mas ainda não pode ser confirmada, pois necessita das análises desse aminoácido. Entretanto, como se observa um patamar de concentrações de amônio após o término da fase exponencial, e o amônio é formado principalmente como um subproduto do metabolismo de glutamina, acredita-se que a GLN tenha se esgotado;
- d) os valores de pH atingiram números da ordem de 6,8, condição certamente desfavorável ao crescimento celular. Esse é um ponto crítico que só poderia ser solucionado em um sistema que permitisse um controle automático da variável, como é o caso do uso de biorreatores;
- e) a disponibilidade de oxigênio, que não foi medida, mas que usualmente, torna-se limitante em sistema sem controle da variável;
- f) é possível, ainda, que ocorram vários efeitos simultaneamente.



**Figura 5.1.** Resultados do ensaio TF8\_10, realizado em frasco T, no Meio 1, condição Adapt 1 (dados de Cássia M.R. Andrade): a) Concentração celular e viabilidade; b) Confluência; c) Concentração de glicose; d) Concentração de lactato; e) Concentração de amônio; f) pH; g) Concentração de FVIII. A linha vertical indica o instante no qual ocorre o final da fase de crescimento exponencial.

A tabela 5.1 apresenta o resumo dos resultados desta cinética, inclusive com valores de concentração de fator VIII.

O experimento realizado em spinner com microcarregador, teve como objetivo aumentar a área de crescimento da célula, minimizando o efeito da inibição por contato, e verificar o seu comportamento em outro sistema de cultivo, sob condições de maior homogeneidade, mas igualmente de maior cisalhamento em decorrência da agitação. O meio utilizado foi o Meio 01.

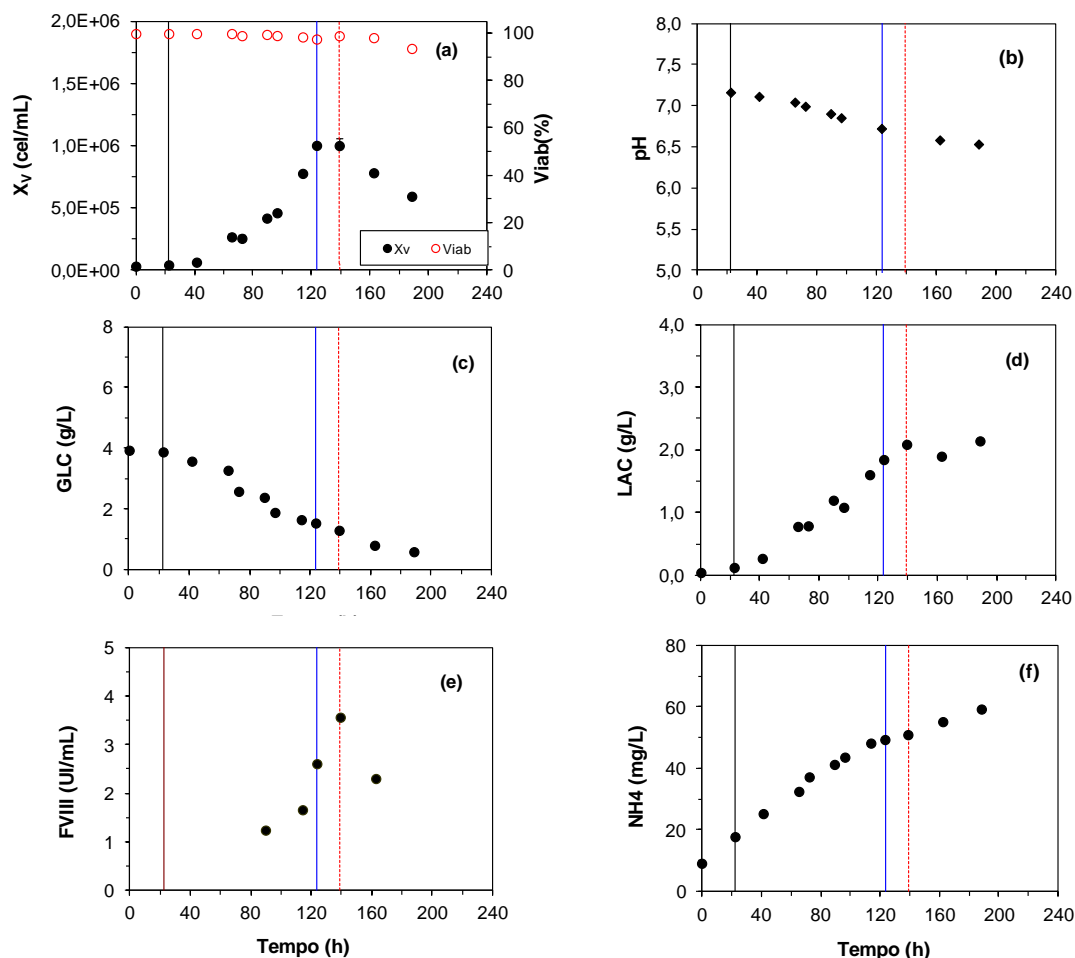
A Figura 5.2 resume os dados obtidos neste ensaio. O sistema em spinner com microcarregador (Tati\_03) apresentou um crescimento máximo 43% menor em relação à condição em frasco T (TF8\_10; Tabela 5.1). Para verificar se essa diferença pode ser atribuída a uma diferença na disponibilidade de área para a adesão das células, calculou-se a concentração específica ( $\text{cel}/\text{cm}^2$ ) a partir de informações do fabricante ( $4440 \text{ cm}^2$  por grama de microcarregador; GE, 2005), da concentração de microcarregadores utilizada ( $3 \text{ g/L}$ ), da concentração de células no final da exponencial ( $1,01 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$ ) e do volume do spinner ( $140 \text{ mL}$ ). O valor obtido para a concentração específica de células no final do cultivo foi de  $7,58 \cdot 10^4 \text{ cel}/\text{cm}^2$ . A mesma determinação pode ser feita para a condição de cultivo em frasco T ( $1,12 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$ ,  $6 \text{ mL/frasco}$ ;  $25 \text{ cm}^2/\text{fraco}$ ) e o valor obtido é  $2,69 \cdot 10^5 \text{ cel}/\text{cm}^2$ . O valor em frasco T é 3,6x maior que o observado para os microcarregadores, o que leva a crer que a causa do menor crescimento não foi a disponibilidade de área. As células tiveram uma eficiência muito menor no aproveitamento dessa área, no caso do microcarregador.

Uma explicação muito plausível é o fato do sistema com microcarregadores, um sistema agitado, apresentar maior cisalhamento do que o estático (frasco T). Esse fenômeno já foi observado por outros autores (MUKHOPADHYAY et al., 1993).

Observou-se, nesse caso, um crescimento exponencial até aproximadamente 123,5 h, valor este 1,7x maior que o observado para o frasco T (Tabela 5.1). Esse fato pode ser atribuído à menor concentração inicial de células no caso do spinner. Os valores de  $\mu_{X,\text{max}}$  são bastante parecidos nos dois ensaios (Tabela 5.1). No final da fase exponencial, não há carência de glicose (concentração de aprox.  $2 \text{ g/L}$ ; Figura 5.2c), mas os níveis de inibidores ou são iguais (caso do lactato; aprox.  $2 \text{ g/L}$ ) ou superiores (caso do amônio com aprox.  $50 \text{ mg/L}$ , Figura 5.2 f).







**Figura 5.2.** Resultados do ensaio Tati\_03, realizado em frasco spinner com microcarregadores, no Meio 1 (condição Adapt 1): a) Concentração celular e viabilidade; b) pH; c) Concentração de glicose; d) Concentração de lactato; e) Concentração de rFVIII; f) Concentração de amônio. Linha vertical azul indica o instante no qual ocorre o final da fase de crescimento exponencial; e a linha vertical vermelha indica o início da morte celular.

Novamente, o pseudo patamar de  $\text{NH}_4$  verificado no final da fase exponencial, parece indicar uma limitação em glutamina. Ainda nesse ponto do cultivo, ambos os subprodutos atingiram concentrações semelhantes àsquelas consideradas inibitórias para células animais (1,8g/L para lactato e 36 -72 mg/L; Gòdia; Carió, 2006).

As análises da influência do pH e do oxigênio dissolvido, feita na situação anterior (cultivo em frasco T), continuam válidas para o cultivo em microcarregador. A variável pH pode ser observada na Figura 5.2 b e que mostra valores mínimos na fase exponencial também de 6,7, logo passíveis de inibir o crescimento.

De forma semelhante, o metabolismo celular referente ao consumo de glicose também apresenta redução de 31% no valor do  $Y_{X/GLC}$ . A condição de estresse causada pelo maior cisalhamento, ou mesmo por inibições, pode responder por essa menor eficiência no aproveitamento do substrato. A mesma explicação pode ser usada para a resposta do sistema no que tange à formação de subprodutos: ambos os fatores referentes à formação de subprodutos sofreram aumento, de 27% no caso do  $Y_{GLC/LAC}$  e de 154% no caso do  $Y_{NH_4/X}$ . O metabolismo menos eficaz resultou num crescimento menor e em maior formação de subprodutos.

No que se refere à formação de rFVIII, pode-se observar uma redução de 47% no valor máximo na condição em microcarregador (Tati\_03; Tabela 5.1) em relação à condição estática (TF8\_10, Tabela 5.1). Como houve um maior crescimento celular no frasco T (Ensaio TF8\_10), calculou-se o fator de formação de rFVIII por unidade de célula gerada ( $Y_{rFVIII/X}$ ) para verificar se as diferenças poderiam ser atribuídas ao maior crescimento. Constatou-se que a menor produção de rFVIII no microcarregador não é decorrente do menor crescimento. A relação  $Y_{rFVIII/X}$  para esse último caso também sofreu redução, uma redução na verdade bastante drástica: o valor é 6,4x menor neste caso, quando comparado com ao resultado em frasco T (Tabela 5.1). A produtividade em produto ( $\Pi_{rFVIII}$ , tabela 5.1) também foi menor no cultivo com microcarregador : 70% menor que no caso do frasco T.

O desempenho insatisfatório do sistema com microcarregador, não deve, entretanto, excluir completamente essa estratégia. É importante lembrar que esse sistema é passível de uso em biorreator, no qual os controles podem, facilmente, minimizar vários dos problemas observados, ou intuídos aqui: valores baixos de pH, de oxigênio dissolvido e limitação de nutriente.

## 5.2 Adaptação das células a meio sem soro

De acordo com o Sinacore, Drapeau e Adamson (1999), a adaptação a uma suspensão isenta de soro é geralmente realizada utilizando-se linhagens de células que já tenham sido modificadas para a expressão da proteína desejada através de tecnologias recombinantes ou tecnologias baseadas em fusão celular. Nesse

processo, a primeira fase constitui em adaptar as células ao cultivo em suspensão e na segunda fase a meios livres de soro.

A adaptação em meios livres de soro não é algo simples, pois o soro é um importante componente do meio de cultura. É, fundamentalmente, um complexo de proteínas ideais para a nutrição celular, a adesão e o crescimento de linhagens dependentes de suporte, além de oferecer proteção biológica e mecânica em sistemas agitados e aerados. Nos itens subsequentes, serão apresentados os esforços envidados neste trabalho para atingir esse objetivo.

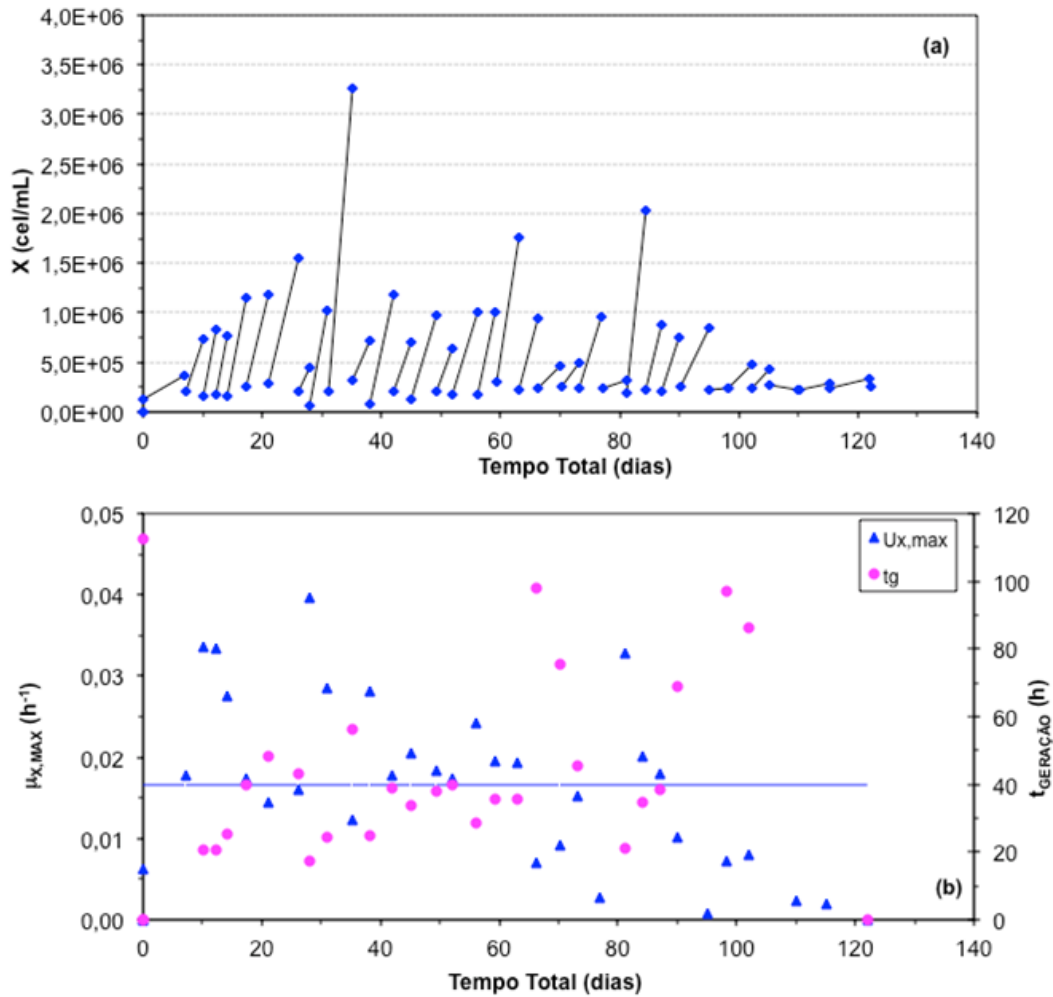
### 5.2.1 Adaptação das células ao cultivo em suspensão em meio com soro

Inicialmente, a linhagem celular foi adaptada para o crescimento em suspensão, em frasco spinner, por um período de aproximadamente 120 dias, empregando o mesmo Meio 01 (condição Adapt 2, Tabela 4.1). Os resultados podem ser observados na Figura 5.3. A Figura 5.3a mostra os perfis de crescimento, onde cada trecho linear representa um subcultivo, com seus valores inicial e final de concentração celular. A Figura 5.3b indica os valores de velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ) e de tempo de geração ( $t_{Ger}$ ), calculados a partir dos dados da Figura 5.3a, tendo como hipótese que o crescimento era exponencial no intervalo de tempo de cada subcultivo. O valor médio de  $\mu_{X,MAX}$  é  $0,017 \text{ h}^{-1}$ , valor 38% inferior ao apresentado pelas células quando cultivadas em frasco T (Ensaio TF8\_10, Tabela 5.1), condição de referência para este desenvolvimento; ou 30% inferior ao observado no spinner com microcarregador (Ensaio Tati\_03, Tabela 5.1). Essa redução na máxima velocidade específica de crescimento durante o processo de adaptação de células animais também foi observada por outros autores (Sinacore; Drapeau; Adamson, 1999).

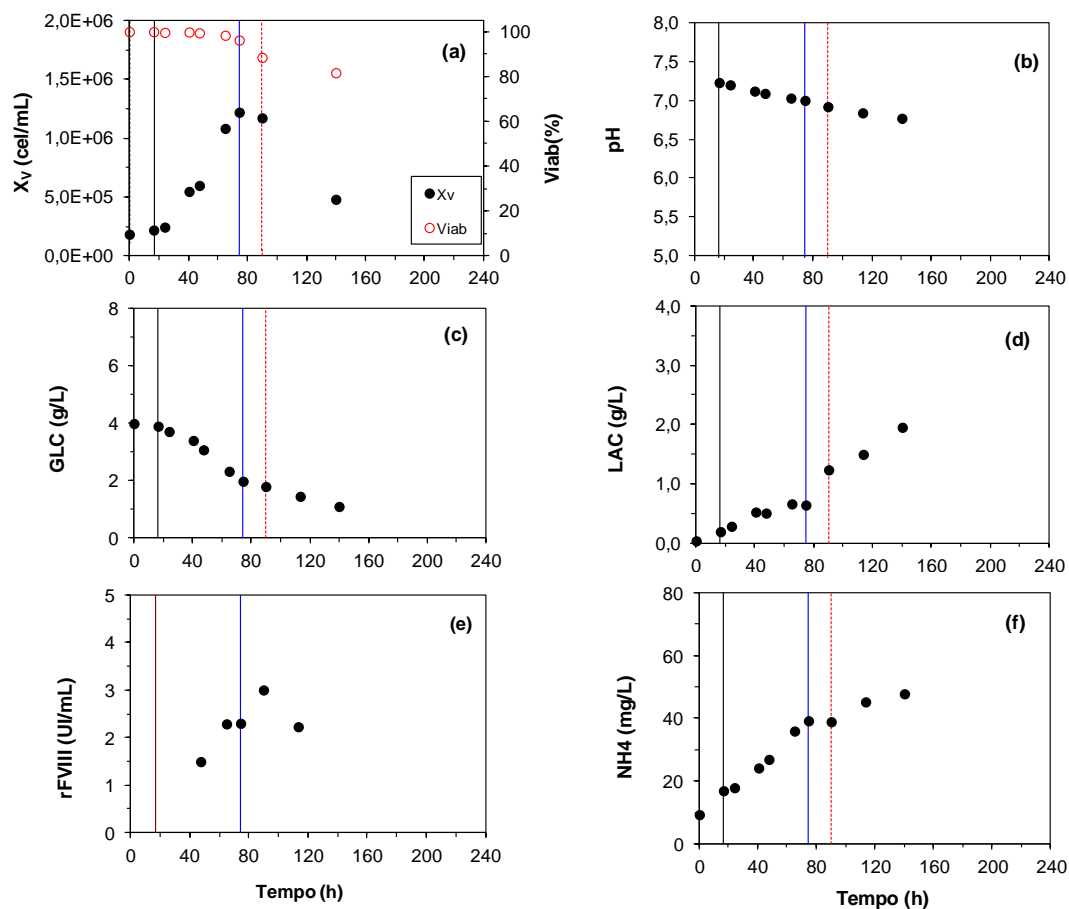
### 5.2.2 Cinética de crescimento em suspensão

Completada a adaptação da linhagem ao cultivo em suspensão, foi realizado um ensaio para determinar a cinética (Tati\_04, Tabela 4.2) característica de crescimento e de produção da linhagem, em Meio 01 (condição Adapt 2, Tabela

4.1), empregando frasco spinner como sistema de cultura. Esses resultados estão descritos na Figura 5.4.



**Figura 5.3.** Adaptação da linhagem celular ao cultivo em suspensão. (a) Concentração celular; (b) Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ) e tempo de geração ( $t_{Ger}$ ). A linha horizontal (azul) na Figura “b” indica o valor médio de  $\mu_{X,MAX}$ .



**Figura 5.4.** Resultados do ensaio Tati\_04, realizado, com células adaptadas a suspensão (SkHep-FVIII DMEM Sp), em spinner, com Meio 1 (condição Adapt 2): a) Concentração celular e viabilidade; b) pH; c) Concentração de glicose; d) Concentração de lactato; e) Concentração de rFVIII; f) Concentração de amônio. Linha vertical preta indica o final da fase lag; Linha vertical azul indica o instante no qual ocorre o final da fase de crescimento exponencial e; Linha vertical vermelha indica o início da morte celular.

Comparando-se os resultados da cinética Tati\_04 com a referência em frasco T (TF8\_10, vide Tabelas 5.1), notam-se valores menores de crescimento ( $\Delta X$ : 16%) e de produtividade em células ( $\pi_X$ ; 69%) na linhagem adaptada à suspensão. Inicialmente, poder-se-ia atribuir essa resposta à dificuldade da linhagem de crescer sem um suporte. No entanto, esse comportamento assemelha-se ao observado para a condição de cultivo em microcarregador (Tati\_03, Tabelas 5.1), que foi atribuída principalmente ao maior cisalhamento sob condição de agitação.

O metabolismo celular, mensurado como  $Y_{X/GLC}$ ,  $Y_{LAC/GLC}$  e  $Y_{NH_4/X}$ , apresentou comportamento bastante distinto, tanto em relação à cinética em frasco T, quanto

em spinner com microcarregador (Tabela 5.1). O valor de  $Y_{X/GLC}$  foi 64,5% maior que o observado no ensaio em frasco T (TF8\_10) e 2,4 x maior que aquele do ensaio em microcarregador (Tati\_03), portanto apresentou uma maior eficiência no aproveitamento do substrato em comparação com as demais condições de cultivo. Nesse cenário, parece menos óbvio que o menor crescimento possa ser explicado pelo maior cisalhamento sob agitação. Os demais fatores analisados ( $Y_{LAC/GLC}$  e  $Y_{X/NH_4}$ ) mostraram valores intermediários para a condição em suspensão, indicando uma maior formação de subprodutos do que no caso do cultivo em frasco T, porém menor que aquele verificado com microcarregadores.

O sistema apresentou crescimento exponencial até aproximadamente 74,5h (Tabela 5.1), tempo igual àquele da célula cultivada em frasco T. Os  $\mu_{X,MAX}$  foram parecidos nos três ensaios (TF8\_10, Tati\_04 e Tati\_03). Novamente, o término da final da fase de crescimento exponencial não está completamente elucidado, mas permanecem válidos os argumentos anteriores que relacionam o baixo valor de pH (aqui aprox. 7,0; Figura 5.4 b), limitação em oxigênio (suposição) e a limitação em GLN (sugerida pelo patamar de amônio, Figura 5.4 f). Há claramente disponibilidade de GLC (Figura 5.4c) e a formação de LAC e  $NH_4$  até esse instante é baixa (1g/L e 39 mg/L, respectivamente), enfraquecendo a possibilidade de uma inibição.

Do ponto de vista da síntese do produto de interesse, a célula adaptada à suspensão mostrou valores inferiores de concentração de rFVIII (76%), de produtividade em produto (33%) e de fator de formação de rFVIII por célula (8,6x), quando comparados ao sistema de frasco T. Todas essas grandezas foram igualmente menores que as observadas para o sistema com microcarregador (Tati\_03, Tabela 5.1).

É importante salientar que independente das respostas cinéticas e metabólicas observadas na condição de cultivo em suspensão a adaptação pode ser considerada um sucesso. Mais uma vez ressalta-se a necessidade de verificar o desempenho dessas células em um biorreator com controles ótimos das principais variáveis. Isso porque a condição de suspensão, certamente tem enormes vantagens do ponto de vista da ampliação de escala.

### 5.2.3 Influência de suplementos anti-grumos (*anti-clump*)

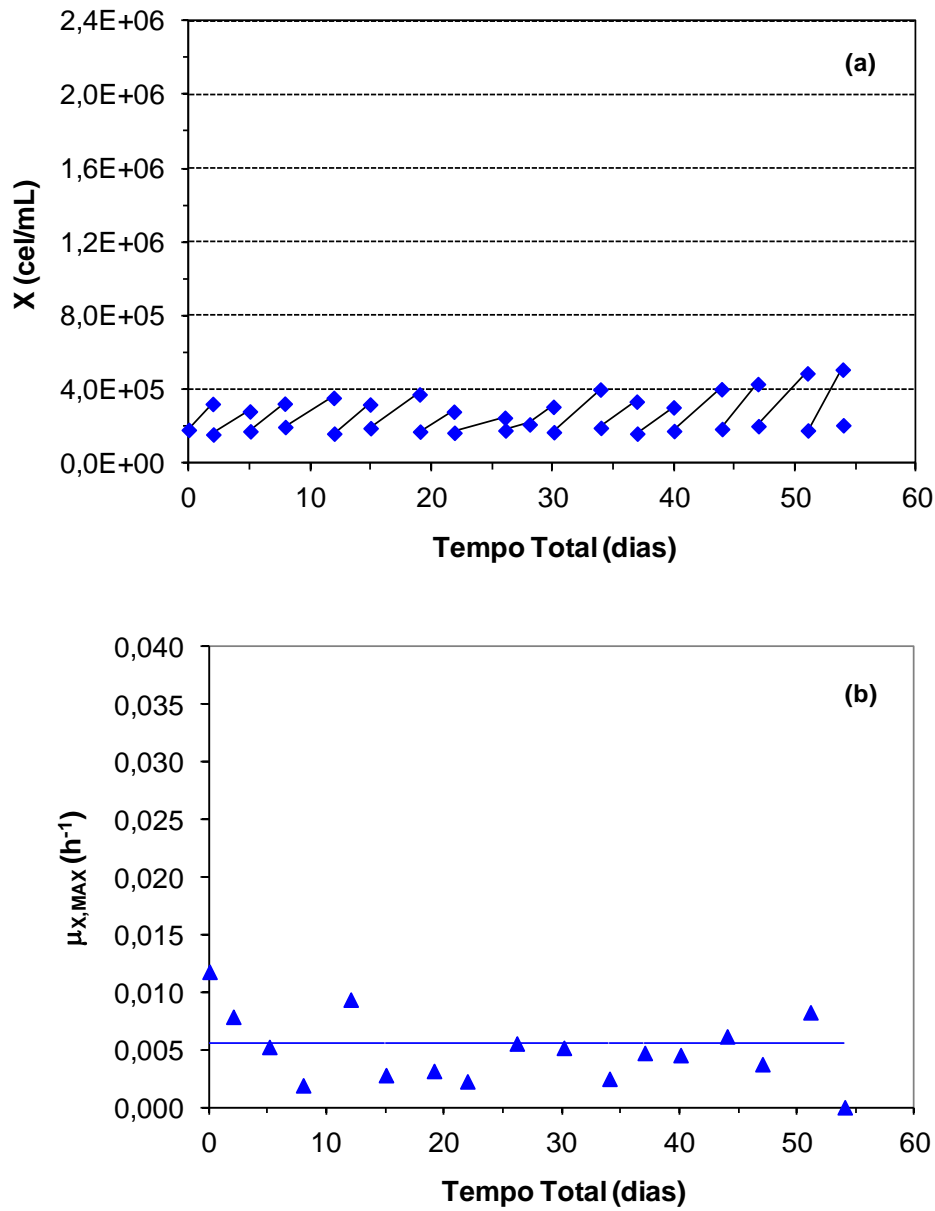
No processo de adaptação da linhagem a suspensão descrito no item anterior (células SkHep\_FVIII DMEM Sp), um dos problemas enfrentados foi a presença de grumos. Uma alternativa para diminuir a presença de grumos no sistema é a utilização do aditivo denominado *anti-clump*. Foram realizados testes utilizando o *anti-clump (Invitrogen EUA)* nas diluições de 1:1000 e de 1:500, no Meio 2 e no Meio 3 (Tabela 4.1), respectivamente, utilizando as células já adaptadas a suspensão (Adapt 3, 4 e 5, Tabela 4.1).

Iniciaram-se as adaptações em frasco T25 (Adapt 3 e 5, Tabela 4.1) e verificou-se que em ambas as concentrações de *anti-clump* as características dos grumos eram muito parecidas. Em alguns repiques os grumos estavam com aparência pouco densa, de forma que apenas a homogeneização do meio com a pipeta era suficiente para dissolvê-los e realizar a contagem das células. Esse fato ocorreu na utilização de ambos os meios.

Após alguns repiques nessa condição, as células foram transferidas para o sistema spinner (Adapt 4, Tabela 4.1) utilizando-se o Meio 2. Os resultados estão apresentados na Figura 5.5, porém não se obteve o mesmo sucesso de manutenção do crescimento em suspensão, como indicado no item 5.2.2. Foram 68 dias de cultivo, sem uma melhora expressiva na redução da presença de grumos. Para realização das contagens e dos repiques era sempre necessária a tripsinização.

### 5.2.4 Adaptação a meios isentos de soro

Com as células já adaptadas ao crescimento em suspensão (SkHep\_FVIII DMEM Sp, Adapt 2, Tabela 4.1), procurou-se adaptá-las a meios isentos de SFB (Adapt 6 a Adapt 14, tabela 4.1). Foram avaliados diversos meios, de diferentes fabricantes, com formulações indicadas como “isentas de soro”, “isentas de proteína animal” e “quimicamente definidas”. O resumo dos resultados encontra-se na tabela 5.2.



**Figura 5.5.** Resultados do uso de células SkHep\_FVIII DMEM Sp, em Meio 2, com suplementos anti grumos (Adapt 4; tabela 4.1). (a) Concentração celular; (b) Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ).



**Tabela 5.2.** Quadro resumo das adaptações a meios de cultura isentos de SFB.

Meio de Cultura	Adaptação	Condição mínima de SFB		$\mu_{X,MAX}$ (h <sup>-1</sup> )			$X_{MAX}$ (cel/mL) (medido com 48h de cultivo)			Observações
		% de SFB	Nº de repiques	Média	DP	CV	Média	DP	CV <sup>(*)</sup> (%)	
Meio 5	Adapt 8	0	41	0,012	0,004	54,3	3,05E+05	1,63E+05	54,3	Adaptado
Meio 6	Adapt 10	1,3	16	0,01	0,003	37,7	2,96E+05	1,32E+05	44,4	Sem sucesso
Meio 7	Adapt 11	2,3	12	0,008	0,005	55,8	2,86E+05	1,63E+05	57,1	Sem sucesso
Meio 8	Adapt 12	1,3	13	0,008	0,007	96,7	3,00E+05	1,73E+05	57,9	Sem sucesso
Meio 9	Adapt 13	0,6	17	0,008	0,003	37,4	2,61E+05	1,12E+05	42,8	Sem sucesso
Meio 10	Adapt 14	2,3	9	0,008	0,006	75,3	3,23E+05	1,59E+05	49,2	Sem sucesso

$$CV = 100 \cdot \frac{DP}{Média}$$

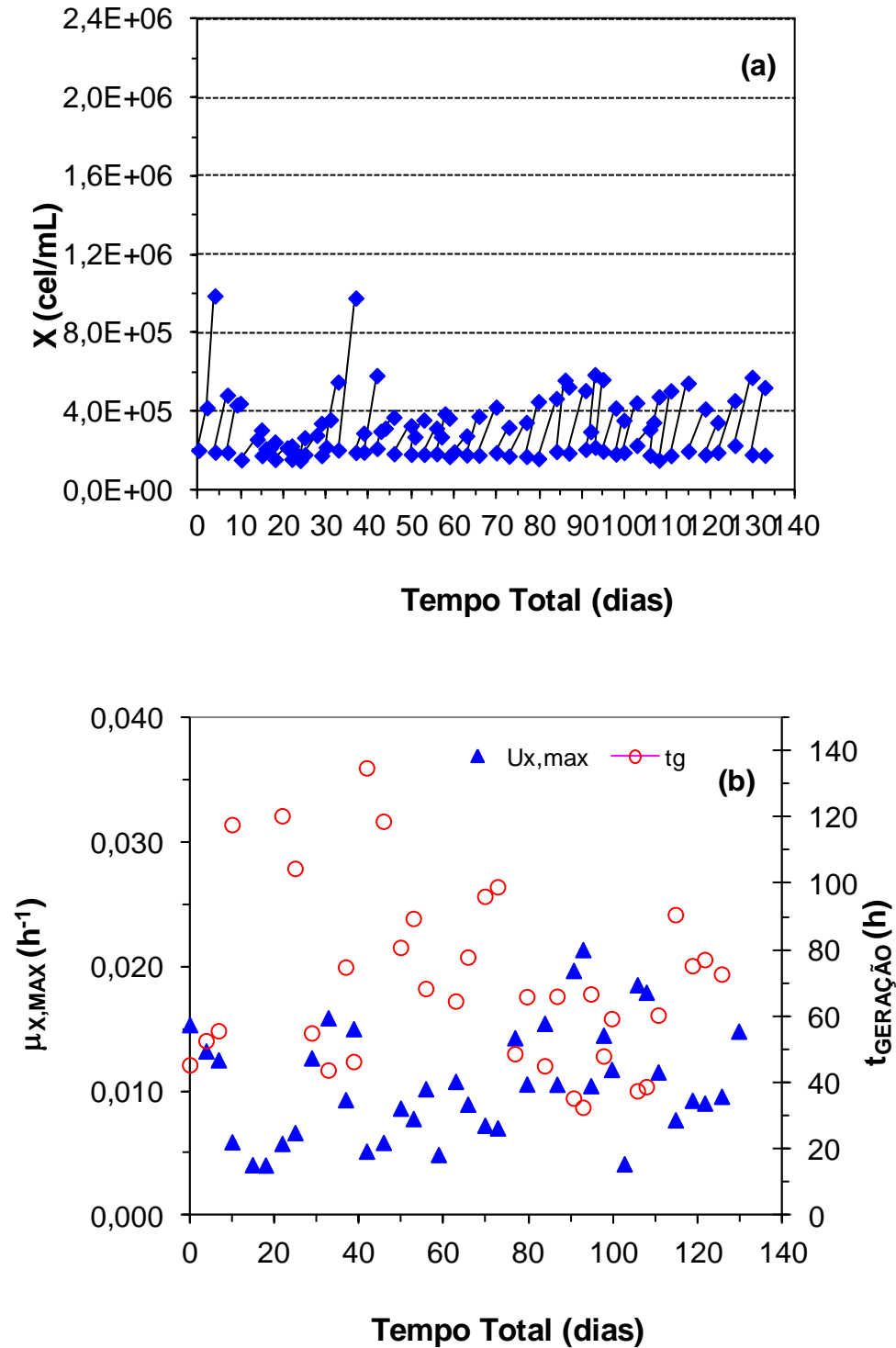
#### 5.2.4.1 Adaptação ao meio HyCD

Nesta tentativa de adaptação para o crescimento em suspensão (Adapt 8, Tabela 4.1), foi utilizado o Meio 5 (quimicamente definido), em frasco spinner, por um período de aproximadamente 140 dias. Com 63 dias de cultivo, 41 repiques (Tabela 5.2), iniciou-se a retirada total do soro fetal bovino, culminando em 23 passagens sem soro. A Figura 5.6a mostram-se os perfis de crescimento, onde cada trecho linear representa um subcultivo, com seus valores inicial e final de concentração celular. A Figura 5.6b indica os valores de velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ) e de tempo de geração, calculados a partir dos dados da Figura 5.6a, tendo como hipótese que o crescimento era exponencial no intervalo de tempo de cada subcultivo. O valor médio  $\mu_{X,MAX}$  é de  $0,012 \text{ h}^{-1}$  (Tabela 5.2), valor 53% abaixo daquele apresentado pelas células quando cultivadas em frasco T (Meio 01; ensaio TF8\_10). O fato de que os subcultivos apresentaram valores baixos, porém estáveis, de  $\mu_{X,MAX}$ , nesta adaptação é uma indicação de que a mesma foi bem sucedida, embora difícil e tendo causado estresse às células durante o processo.

#### 5.2.4.2 Adaptação em meio ACF

Foram realizadas duas tentativas de adaptação da linhagem SkHep\_FVIII DMEM Sp com meio ACF (livre de componentes de origem animal), a primeira utilizando o Meio 7 (Adapt 11, Tabela 4.1) e a segunda utilizando o Meio 8 (Adapt 12, tabela 4.1). O sistema de cultivo foi em spinner.

Nas duas tentativas, retirou-se o soro fetal bovino de maneira lenta e pausadamente. Na Adapt 11, sem a adição de  $\beta$ mercaptoetanol, foram feitos cultivos por 38 dias, o que equivale a 12 repiques (Tabela 5.2), chegando-se a uma porcentagem mínima de 2,3 % de soro na formulação final. Ao se reduzir esta porcentagem, não houve crescimento celular e, conseqüentemente, as células morreram.



**Figura 5.6.** Resultados do uso de células SkHep\_FVIII DMEM Sp, no Meio 5 (Adapt 8; tabela 4.1). (a) Concentração celular; (b) Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ) e tempo de geração.

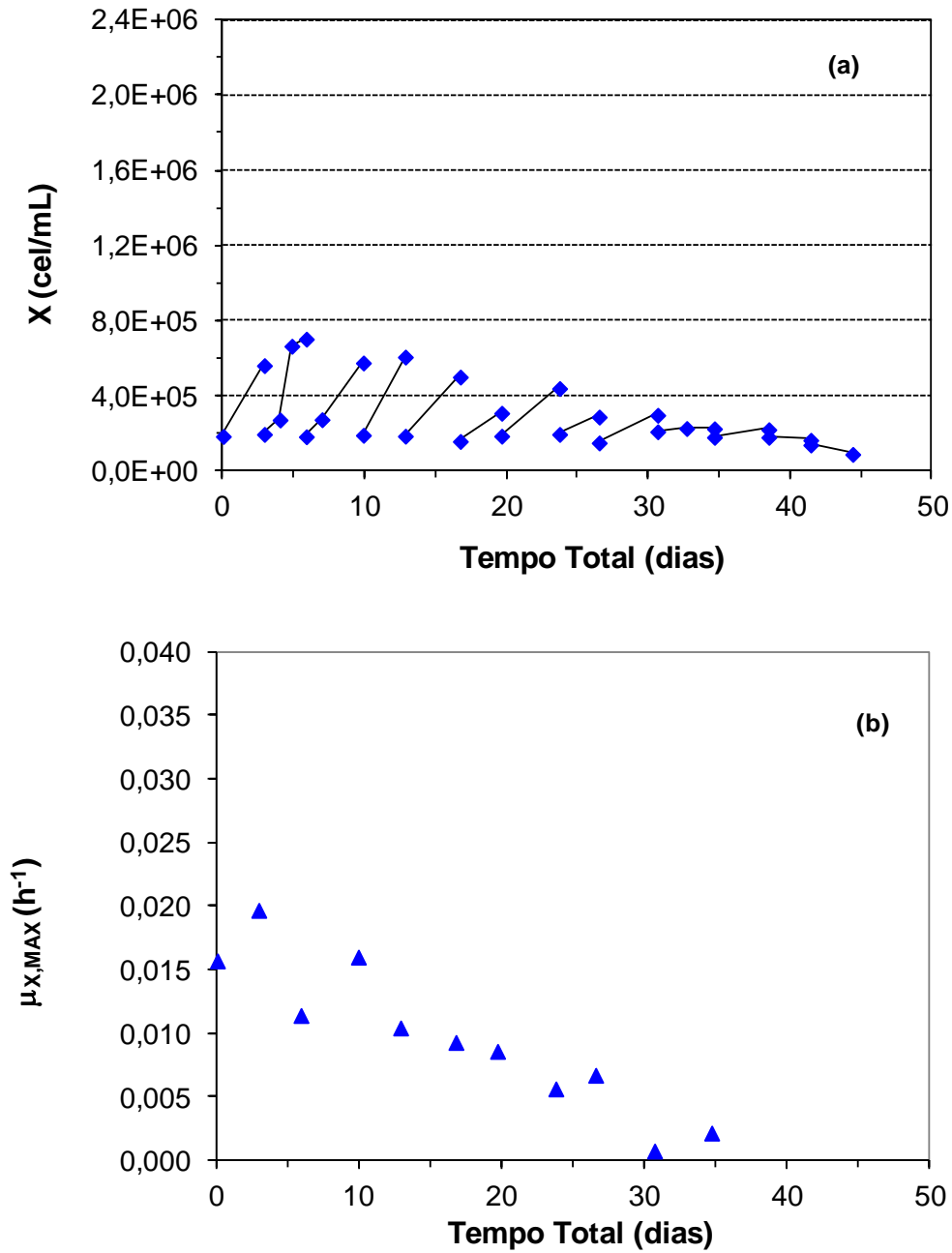
Já na segunda tentativa, ou seja, com a adição do  $\beta$ mercaptoetanol (Adapt 12, Tabela 4.1), o cultivo foi mantido por 45 dias, perfazendo 13 repiques. Chegou-se a uma porcentagem mínima de 1,3% de soro na formulação final (Tabela 5.2). De forma análoga, as reduções subseqüentes resultaram em morte celular. A Figura 5.7b indica os valores de velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ), calculados a partir dos dados da Figura 5.7a, tendo como hipótese que o crescimento era exponencial no intervalo de tempo de cada subcultivo. O valor médio  $\mu_{X,MAX}$  é de 0,008 (Tabela 5.2), valor 72% abaixo daquele apresentado pelas células quando cultivadas em frasco T. O fato de que os subcultivos apresentaram valores baixos nesta adaptação é uma indicação de que a adaptação à condição de suspensão no Meio 8 certamente estava crescendo em condições adversas, não apresentando um bom resultado.

#### 5.2.4.3 Adaptação em meio HySF

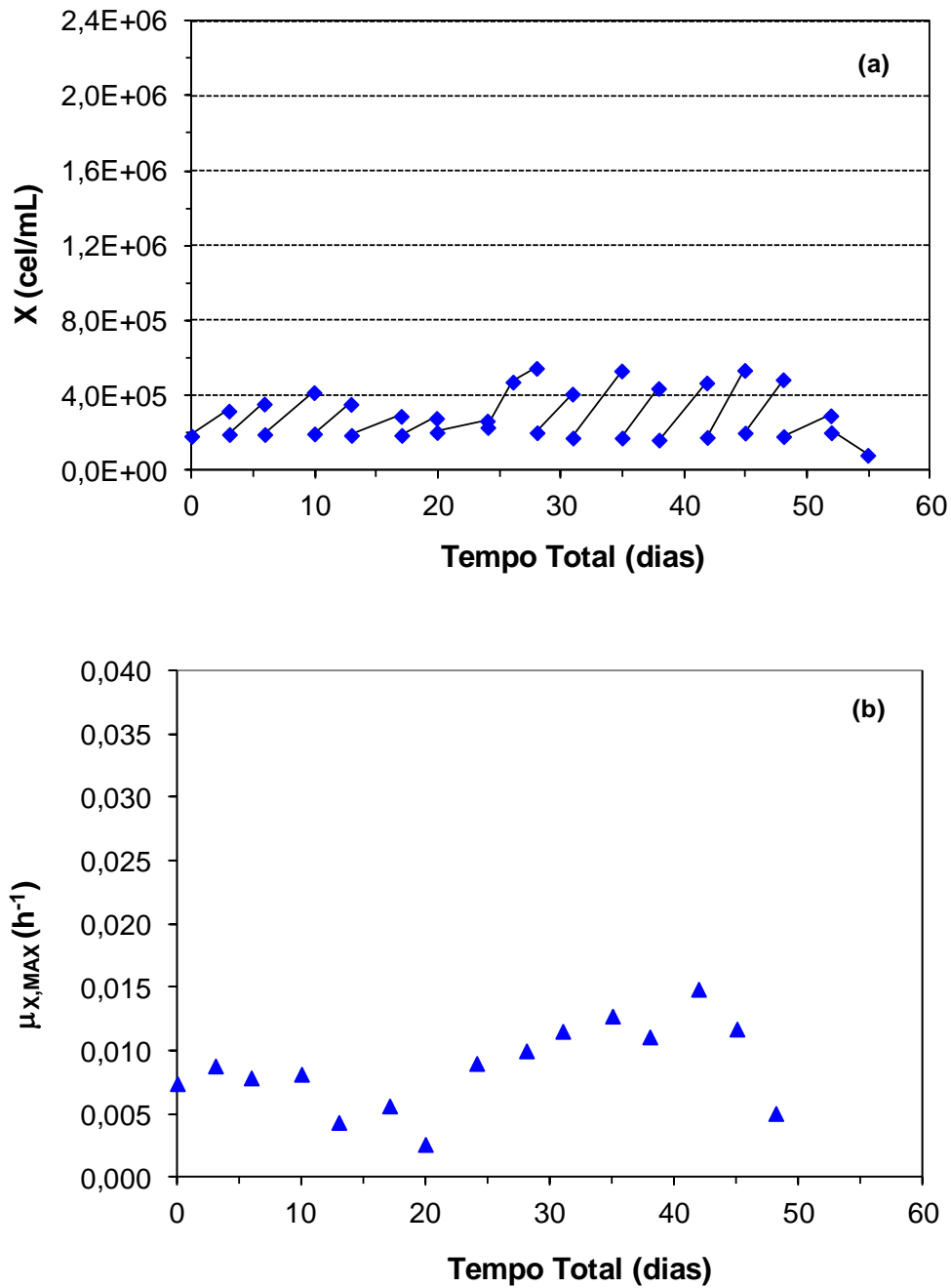
Foram realizadas duas tentativas idênticas da linhagem SkHep\_FVIII DMEM Sp no meio HySF (meio livre de soro, Meio 6), nas condições Adapt 9 e Adapt 10 (Tabela 4.1). O sistema de cultivo foi em spinner.

Nas duas tentativas, retirou-se o soro fetal bovino de maneira lenta e pausadamente. Na primeira adaptação, Adapt 9, realizaram-se apenas 4 dias de cultivo, 1 repique, e logo em seguida houve a morte celular.

Já na segunda tentativa, na Adapt 10 (Tabela 4.1), observaram-se 55 dias de cultivo, perfazendo 16 repiques, e chegando a uma porcentagem mínima de 1,3% de soro no meio (Tabela 5.2). Reduções maiores do que este valor ocasionaram a morte celular. A Figura 5.8b indica os valores de velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ). O valor médio  $\mu_{X,MAX}$  é de  $0,010 \text{ h}^{-1}$  (Tabela 5.2) valor abaixo ao apresentado pelas células quando cultivadas em frasco T. O fato de que os subcultivos apresentaram valores baixos nesta adaptação é uma indicação de que a adaptação à condição de suspensão no meio 06, certamente estava crescendo em condições adversas, não apresentando um bom resultado.



**Figura 5.7.** Resultados do uso de células SkHep\_FVIII DMEM Sp, em Meio 8 (Adapt 12, Tabela 4.1). (a) Concentração celular; (b) Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ).



**Figura 5.8.** Resultados do uso de células SkHep\_FVIII DMEM Sp, em Meio 6 , na condição Adapt 10 (Tabela 4.1). (a) Concentração celular; (b) Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ).

#### 5.2.2.4 Adaptação em Meio 302

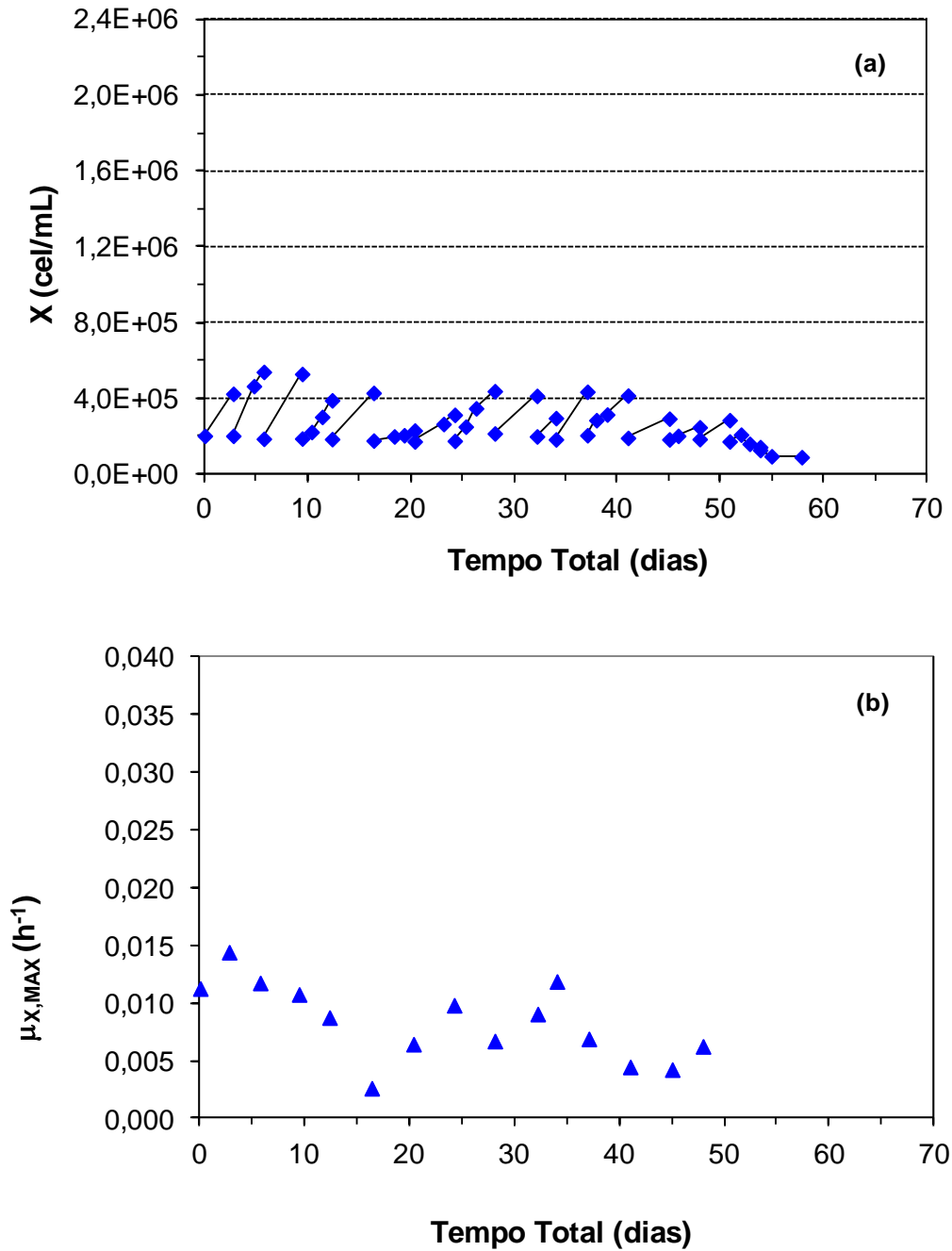
Realizou-se uma tentativa de adaptação da linhagem SkHep\_FVIII DMEM Sp ao Meio 9 (302, livre de soro), na condição Adapt 13 (tabela 4.1). O sistema de cultivo, foi igualmente em spinner.

Nesta tentativa, o soro fetal bovino foi retirado do meio de cultura de maneira lenta e pausadamente. Conseguiu-se 58 dias de cultivo, completando 17 repiques (Tabela 5.2), e atingindo-se uma porcentagem mínima de 0,6% de soro na formulação de meio final, além do que, observou-se a morte celular. A Figura 5.9b indica os valores de velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ), calculados a partir dos dados da Figura 5.9a, tendo como hipótese que o crescimento era exponencial no intervalo de tempo de cada subcultivo. O valor médio de  $\mu_{X,MAX}$  é de  $0,008 \text{ h}^{-1}$  (Tabela 5.2), valor 72% abaixo daquele apresentado para essas células quando cultivadas em frasco T. O fato de que os subcultivos apresentaram valores baixos nesta adaptação é uma indicação da dificuldade da linhagem na condição de crescimento imposta.

#### 5.2.2.5 Adaptação em meio Sigma Fusion

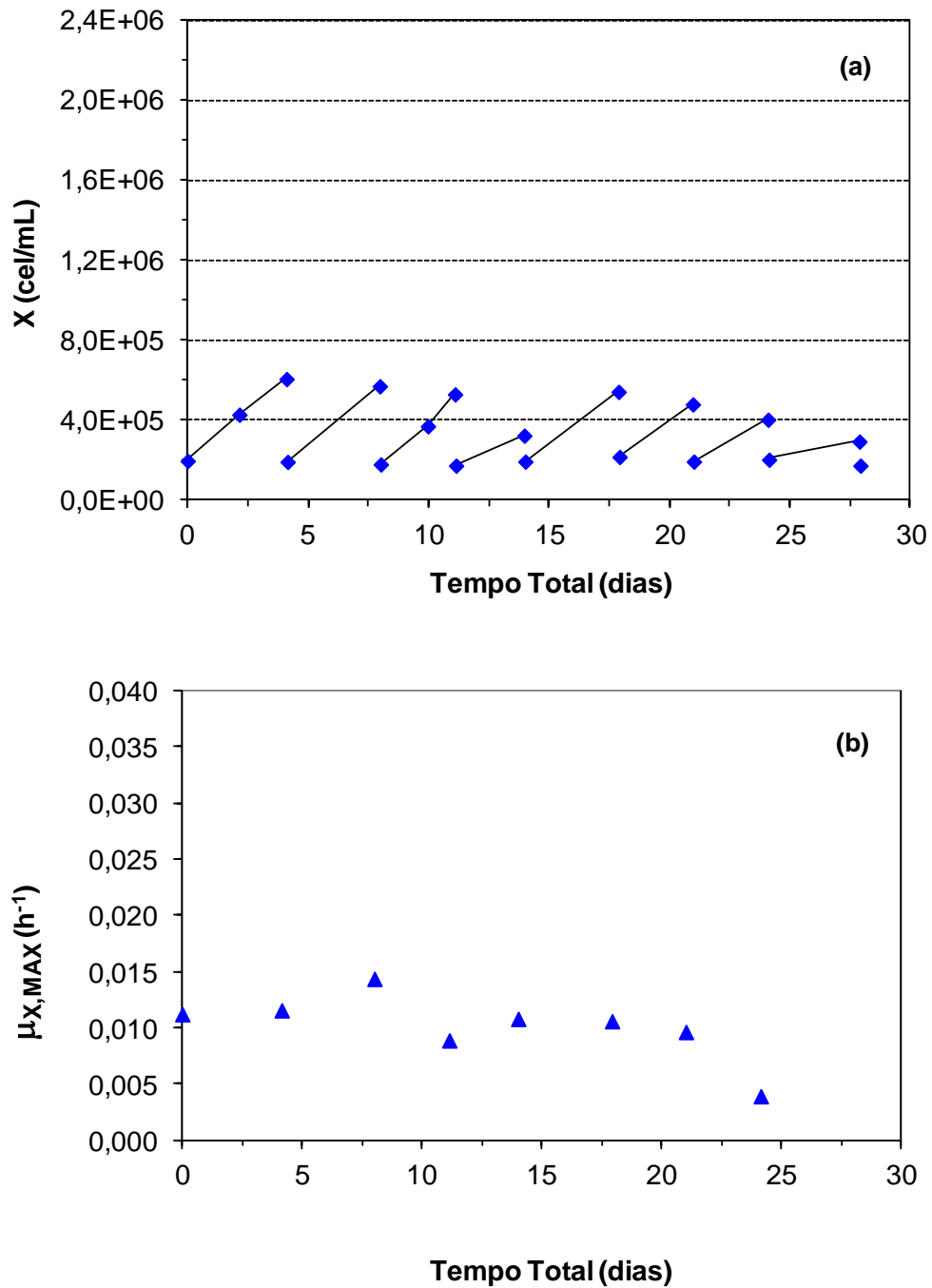
Realizou-se uma última tentativa de adaptação da linhagem SkHep\_FVIII DMEM Sp ao Meio 10, condição Adapt 14 (Tabela 4.1), também em spinner.

Reduziu-se a porcentagem de soro fetal bovino de maneira lenta e pausadamente, conseguindo-se 31 dias de cultivo, perfazendo 9 repiques (Tabela 5.2) e uma porcentagem mínima de 2,3% de soro no meio. A Figura 5.10b indica os valores de velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ), calculados a partir dos dados da Figura 5.10a, tendo como hipótese que o crescimento era exponencial no intervalo de tempo de cada subcultivo. O valor médio  $\mu_{X,MAX}$  é de  $0,008 \text{ h}^{-1}$ , valor 72% abaixo daquele apresentado pelas células quando cultivadas em frasco T.



**Figura 5.9.** Resultados do uso de células SkHep\_FVIII DMEM Sp, em Meio 9, na condição Adapt 13 (Tabela 4.1). (a) Concentração celular; (b) Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ).

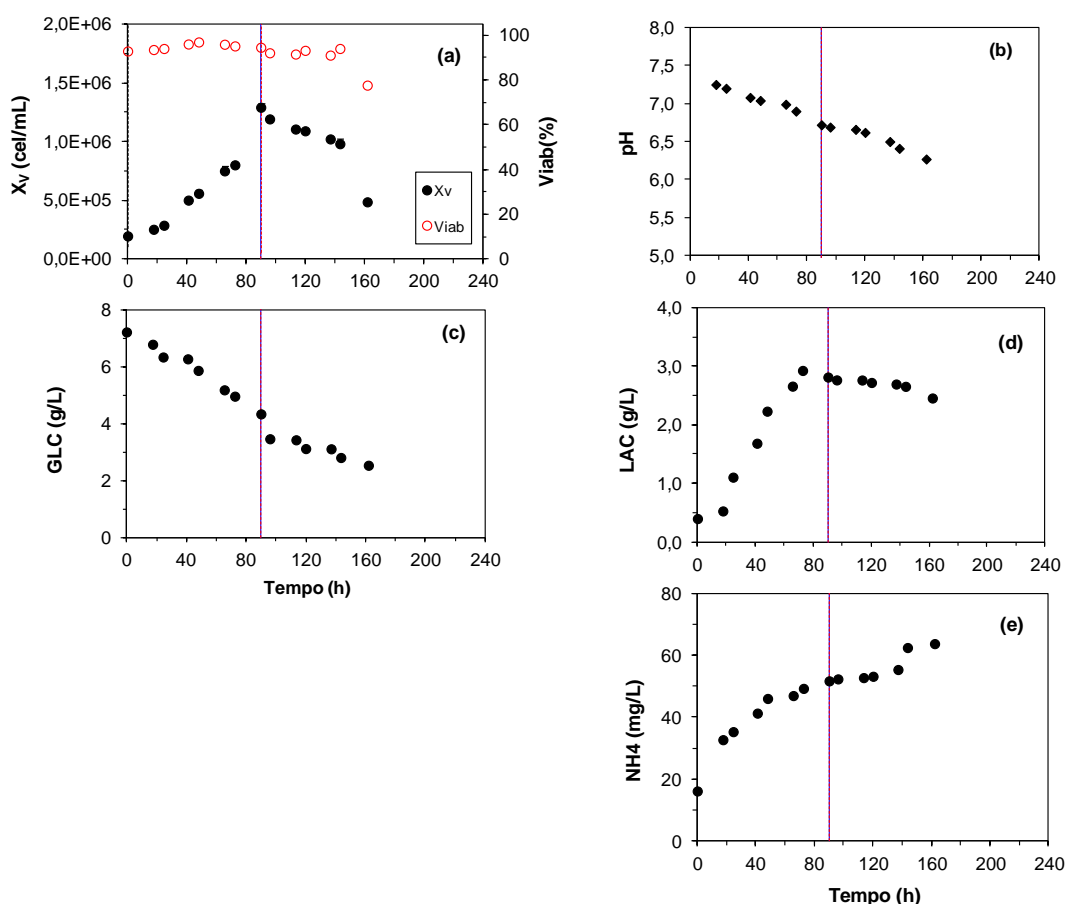




**Figura 5.10.** Resultados do uso de células SkHep\_FVIII DMEM Sp, em Meio 10, na condição Adapt 14 (Tabela 4.1). (a) Concentração celular; (b) Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{X,MAX}$ ).

### 5.2.3 Cinética de crescimento da célula em meio livre de soro

Após a adaptação da linhagem ao meio 05 (HyCD, quimicamente definido), foi realizado um estudo cinético no sentido de avaliar o crescimento e o metabolismo das células nessas condições. A Figura 5.11 apresenta os resultados do estudo cinético do Ensaio Tati\_01 (Tabela 4.2), que são representativos da linhagem quando cultivada em meio 05.



**Figura 5.11.** Resultados do ensaio Tati\_01, realizado com a linhagem SkHep – FVIII HyCD, no Meio 5 (HyCD quimicamente definido), em spinner: a) Concentração celular e viabilidade; b) pH; c) Concentração de glicose; d) Concentração de lactato; e) Concentração de amônio. Linha vertical azul indica o instante no qual ocorre o final da fase de crescimento exponencial e, também, o início da morte celular.

Os dados mais expressivos desse cultivo (Tati\_01) estão resumidos na Tabela 5.1. O comportamento cinético da linhagem nesse meio de cultivo

quimicamente definido assemelhou-se àqueles das condições mais estressantes (ensaio Tati\_03 com microcarregadores e ensaio Tati\_04 células adaptadas à suspensão; vide Tabela 5.1): os valores de produção de células ( $\Delta X$ ) foram 52% menores e a produtividade em células 69% inferior que àqueles do ensaio de referência (TF8\_10) que contem soro. A linhagem estudada apresentou igualmente uma velocidade específica máxima ( $\mu_{X,MAX}$ ) de  $0,021 \text{ h}^{-1}$ , valor 33% menor que o da mesma condição de referência.

Apesar dos menores valores de crescimento celular, é possível afirmar que a condição de meio quimicamente definido, acrescido de  $\beta$ mercaptoetanol e Pluronic® F68, foi bem capaz de fornecer nutrientes e suplementos essenciais para a adaptação da linhagem a uma ausência de soro e em suspensão.

O metabolismo observado nessa condição adaptada foi também bastante semelhante à dos demais ensaios com grau mais elevado de estresse (Tati\_03 e Tati\_04). De forma análoga ao observado nos ensaios com adição de soro, houve formação de subprodutos (lactato e amônio) (Figura 5.11d e 5.11), em decorrência do consumo dos substratos (glicose e glutamina, respectivamente) (Figura 5.11c). Houve o re-consumo de lactato quando ocorreu esgotamento da glicose (Figura 5.11d), mas o mesmo não foi observado para o amônio (Figura 5.11f). As medidas dos fatores de conversão de substrato a produto ( $Y_{X/GLC}$  e  $Y_{LAC/GLC}$ ) e de formação de produto por células geradas ( $Y_{NH_4/X}$ ) indicam uma menor eficiência metabólica se comparado com a condição de referência – ensaio TF8\_10 (ver Tabela 5.1); *i.e.*, menor valor de  $Y_{X/GLC}$  e maiores valores de  $Y_{LAC/GLC}$  e  $Y_{NH_4/X}$ .

O término da fase exponencial de crescimento com 90h, é um demonstrativo de uma condição de limitação (carência nutricional) ou de inibição (acúmulo de substância tóxica) do sistema. Há algumas hipóteses para o término da fase exponencial, todas já mencionadas na avaliação dos resultados em presença de SFB:

- a) Inibição por amônio ( $NH_4^+$ ) ou lactato (LAC), que atingiram valores de aproximadamente 50 mg/L e 3,0 g/L, respectivamente, no final da fase exponencial de crescimento. Esses valores são suficientemente elevados para causar inibição em muitas linhagens celulares (Gòdia: Cairó, 2006);

- b) Limitação em glutamina (GLN), inferida a partir do perfil de formação do amônio e, em particular do pseudo-patamar que se observa no final da fase exponencial de crescimento;
- c) Inibição pelos baixos valores de pH alcançados (aprox: 6,5, Figura 5.11b);
- d) limitação em oxigênio dissolvido.

Apesar do bom resultado da adaptação em termos do crescimento celular, as medidas de produção de rFVIII resultaram em valores praticamente nulos (Tabela 5.1). A determinação da presença de rFVIII foi feita por 2 métodos distintos: TPPa e cromogênico, ambos retornando valores similares e praticamente nulos.

Um último teste foi ainda realizado com o banco máster que fora preparado com células com menor número de passagens. Infelizmente esse também não apresentou expressão significativa do produto de interesse.

O processo de adaptação de linhagens a essas condições de meio isento de soro e independente de suporte é reconhecidamente difícil e aleatória (Sinacore; Drapeau; Adamson, 1999). A capacidade de crescer pode depender de genes que são desligados devido a ausência de componentes usualmente presentes no soro (Zander; Bemark, 2008). Outra hipótese é que o processo seletivo estabelece uma condição de clonagem, da qual pode resultar uma população de células incapaz de expressar a proteína de interesse (Zander; Bemark, 2008).

Outro aspecto relevante neste caso é discutido por Costa e colaboradores (2013), que discutiram alterações nos padrões de glicosilação de proteínas recombinantes expressas por célula animais, em decorrência da adaptação a meios isentos de soros. As alterações na glicosilação implicaram em alterações na atividade biológica.

O rFVIII é uma proteína complexa sujeita a várias modificações pós-tradução (glicosilação inclusive). Caso tenha ocorrido alguma alteração no padrão de glicosilação e, conseqüentemente, na sua atividade biológica, os dois métodos empregados para determinar seriam possivelmente incapazes de detectar a proteína, pois ambos baseiam-se em técnica que mede a funcionalidade da proteína. Seria interessante empregar uma técnica alternativa que pudesse mensurar a proteína a partir de vários epitopos, como por exemplo o método ELISA

que tem disponível vários anticorpos para sítios independentes (Purohit et al., 2003).

## 6 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu caracterizar a linhagem SKHep-FVIIIdeIB-GFP-CMV, cultivada em diferentes meios de cultura, acrescidos ou não de soro fetal bovino.

As melhores condições de crescimento e expressão da proteína foram verificadas em meio contendo soro fetal bovino e condição estática de cultivo. Valores típicos nessas condições são:  $\mu_{X,Max} = 0,028 \text{ h}^{-1}$ ,  $Y_{X/GLC} = 3,25 \cdot 10^8 \text{ cel/g}$ ;  $Y_{LAC/GLC} = 0,563 \text{ g/g}$  e  $Y_{NH_4/X} = 1,78 \cdot 10^{-2} \text{ mg/cel}$ ;  $rFVIII = 5,27 \text{ UI/mL}$ ;

O cultivo em microcarregador e na presença de soro resultou em diminuição de 43% na produção de células e um aumento de 11% no valor de  $\mu_{X,Max}$  comparada com a condição de referência (frasco T). O metabolismo celular tornou-se menos eficiente com redução de 31% no valor de  $Y_{X/GLC}$ , aumentos de 27% no valor de  $Y_{LAC/GLC}$  e de 154% no  $Y_{NH_4/X}$ . O estresse causado, possivelmente pelo aumento do cisalhamento, também resultou em menor expressão de rFVIII (32% inferior). Claramente essa redução não está apenas vinculada ao menor crescimento celular, mas a alterações na expressão que resultam em valores de  $Y_{rFVIII/X}$  6,4x menor que aquela da situação de referência.

Foi possível adaptar a linhagem ao crescimento em suspensão em meio contendo soro. Comparando-se os resultados com a referência em frasco T, nota-se um crescimento ( $\Delta x$ ) 38% menor na linhagem adaptada. O metabolismo celular apresentou-se comportamento bastante distinto, ainda em comparação com o frasco T, todos sofreram aumentos o  $Y_{X/GLC}$  em 65%, o  $Y_{LAC/GLC}$  em 21%, e o  $Y_{NH_4/X}$  em 23%. O  $\mu_{X,Max}$  também sofreu um aumento de 13%. Mais o estresse dessa condição de cultivo implicou em reduções de 43% na expressão do rFVIII e de 8,6x menor no fator de formação de rFVIII por unidade de célula. A resposta a esta condição de estresse foi semelhante a relatada anteriormente, em microcarregador, exceto pelo comportamento do parâmetro  $Y_{X/GLC}$ .

Foi possível adaptar as células para crescimento apenas ao meio de cultura comercial isento de soro e quimicamente definido (SH30556.01/ CDM4CHOTM, Hyclone). O comportamento cinético nessa condição foi similar àquele observado

para as condições de maior estresse, *i.e.*, comparando com o frasco T, com reduções de 35% na produção de células, de 24% no valor de  $\mu_{X,Max}$ , e de 15% no valor de  $Y_{X/GLC}$ , porém os valores  $Y_{LAC/GLC}$  e  $Y_{NH_4/X}$ , ambos sofreram aumentos de 52% e 60%, respectivamente. Entretanto, o processo de adaptação das células implicou na perda total da capacidade de expressar o rFVIII.

## 7 REFERÊNCIAS

ADAMSON, R. Design and operation of a recombinant mammalian cell manufacturing process for rFVIII. **Ann Hematol**, 68: S9-S14, 1994.

AL-RUBEAI, M; Apoptosis and Cell Culture Technology. In: **Scheper, Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, v. 59, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 1998. pp.225-249.

ASHU, K.; SAPANA, T.; DURAI, P.; KANNUSAMY, S.; ARDRANA, P.; ANITA, B.; AROORA, S.; KAMESWARA, R. Optimization and efficient purification of recombinant Omp28 protein of brucella melitensis using Triton X-100 and  $\beta$ mercaptoetanol. **Protein Expression and Purification**. India, 2012, p. 226-232.

AUGUSTO, E.F.P.; OLIVEIRA, M.S. Processos com Células Animais. In: **Biotecnologia Industrial**, vol. 3, Editora Edgard Bluncher, 1º edição, 2001. p.547-582.

BARROWCLIFFE TW, RAUT S, HUBBARD AR. 1998. Discrepancies in potency assessment of recombinant FVIII concentrates, **Haemophilia**,4:634-40.

BARROWCLIFFE TW, RAUT S, SANDS D, HUBBARD AR. 2002. Coagulation and chromogenic assays of factor VIII activity: general aspects, standardization, and recommendations, **Semin Thromb Hemost.**, 28:247-56.

BARROWCLIFFE TW. 2003. Standardization of FVIII & FIX assays, **Haemophilia**, 9:397-402.

BERNE, R.M; LEVY, M.N; ESBERARD, C.A.; **Princípios de Fisiologia**. Guanabara Koogan, 1991. p.165- 169.



BUTLER, M. et al. Department of Microbiology, University of Manitoba, **Winnipeg Canadá**, 1998.

BURTON, M.; NAKAI, H.; COLOSI, P.; CUNNINGHAM, J.; MITCHELL, R.; COUTO, L. Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein. **Proc Natl Acad Sci USA**. 96(22):12725-30, 1999.

CAMPOS-DA-PAZ M, COSTA CS, QUILICI LS, SIMÕES IC, KYAW CM, MARANHÃ AQ, BRIGIDO MM. 2008. Production of recombinant human factor VIII in different cell lines and the effect of human XBP1 co-expression. **Molecular Biotechnology**, 39:155-158.

CARLOS, M.M.L.; FREITAS, P.D.F.S. Estudo da casacata de coagulação sanguínea e seus valores de referência. **Acta Veterinária Basílica**. v.1, n.2, p.49-55, 2007.

CHICO, E.; RODRIGUEZ, G.; FIGUEIREDO, A., 2008). **Biorreatores para células animais**. In: MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L.R. (Orgs) Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica, capítulo 5. Ed. Roca, 2008, p. 216-254.

CHISTI, Y. Animal-Cell Damage in Sparged Bioreactors, Trends in **Biotechnologist**, 2000. v. 18, p. 420-432.

COSTA, A.R. et al. The impact of cell adaptation to serum- free conditions on the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by Chinese hamster ovary cells. **New Biotechnol.** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2012.12.002>.

DOORISS KL, DENNING G, GANGADHARAN B, JAVAZON EH, MCCARTY DA, SPENCER HT, DOERING CB. 2009. Comparison of Factor VIII Transgenes Bioengineered for Improved Expression in Gene Therapy of Hemophilia A. **Hum Gene Ther.** 20(5):465-78.

DREWS, M., PAALME, T., VILU, R. The growth and nutrient utilization of the insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture. **Journal of Biotechnology**, 40, 187-198, 1995.

ECHALIER, G., *Drosophila* cells in Culture, **Academic Press**, 1997.

ERIKSON, B. 2001. B-Domain deleted recombinant factor VIII for treatment of hemofilia A. Eds: Young, N.S. & Beris, P. In: **Seminars in Hematology**, 38(2) Suppl 4.

FANG X, CHEN C, WANG Q, GU J, CHI C. 2001 .The interaction of the calcium- and integrin-binding protein (CIBP) with the coagulation factor VIII. **Thromb Res.**102(2):177-85.

FRANCO, R.F. Fisiologia da Coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina Ribeirão Preto**, v34, p.229-237, 2001.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells** – A Manual of Basic Technique, 5<sup>o</sup> edição, New York: John Wiley & Sons, 2005.

GE HEALTHCARE. Microcarrier Cell Culture. Principles and Methods. Handbooks from GE Healthcare. 2005, 172p.

GÒDIA, F.; CAIRÓ, J.J. **Cell metabolism**. In: OZTURK, S.S.; HU, W.S. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies, capítulo 4, Taylor & Francis: New York, 2006, p.81-112.

HEIDEMANN, R.; ZHANG, C.; QI, H.; RULE, J.L.; ROZALES, C.; PARK, S.; CHUPPA, S.; RAY, M.; MICHAELS, J.; KONSTANTINOV, K. e NAVEH, D. The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology*, 2000, vol. 32, p. 157 – 167.

HERLITSCHKA, S.E.; SCHLOKAT, U.; FALKNER, F.G.; DORNER, F. High expression of a B domain deleted factor VIII gene in a human hepatic cell line. **Journal of Biotechnology**. Cap.61, p. 165-173, 1998.

HUBBARD, A.R.; RIGSBY, P.; BARROWCLIFFE, T.W. Standardisation of factor VIII and von Willebrand factor in plasma: calibration of the 4th International Standard (97/586), **Thromb Haemost.** 2001. Cap 8, p. 634- 638.

HUBBARD, A.R.; SANDS, D.; SANDBERG, E.; SEITZ, R.; BARROWCLIFFE, T.W. A multi-centre collaborative study on the potency estimation of ReFacto, **Thromb Haemost.** 2003. Cap 90, p.1088-1093.

HUIYONG, Z.; NICOLAI, M.; JUTTA, S.; HENNING, S. Regulation of multilineage gene expression and apoptosis during in vitro expansion of human bone marrow stromal cells with different cell culture media. **George August University**. 2010. Gottingen, Germany.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003. Cap. 62, p.1-20.

INGERSLEV, J.; JANKOWSKI, M.A.; WESTON, S.B.; CHARLES, L.A. Re Factor Field Study Participants. Collaborative field study on the utility of a BDD factor VIII concentrate standard in the estimation of BDDr Factor VIII:C activity in hemophilic plasma using one-stage clotting assays. **Thromb Haemost.** 2004. Cap 2, p.623-628.

JIANG R et al. Manufacturing challenges in the commercial production of recombinant coagulation factor VIII. **Haemophilia**, 2008. v.8, p. 1-5.

KESSLER, C.M.; GILL, J.C.; WHITE, G.C.; SHAPIRO, A.; ARKIN, S.; ROTH, D.A. MENG, X. ; LUSHER, J.M. B-domain deleted recombinant factor VIII preparations are bioequivalent to a monoclonal antibody purified plasma-derived factor VIII concentrate: a randomized, three-way crossover study **Haemophilia**, 2005. v.11,p. 84–91.

KEY, N.S; NEGRIER, C. Coagulation factor concentrates: past, present, and future. **Lancet**, 2007 v.370, p. 439–448.

LIND P, LARSSON K, SPIRA J, SYDOW-BACKMAN M, ALMSTEDT A, GRAY E, SANDBERD H. 1995. Novel forms of B-domain-deleted recombinant factor VIII molecules Construction and biochemical characterization, **Eur. J. Biochem.** 232:19-27.

LOWE, G.D.O. Factor IX - Rewien. British **Journal of Haematology**, v. 115, p. 507 - 513, 2001.

MCCORMICK AN, LEACH ME, SAVIDGE G, ALHAQ A. 2004. Validation of a quantitative SPR assay for recombinant FVIII. **Clin Lab Haematol.** 26(1):57-64.

MIAO, H.Z.; SIRACHAINAN, N.; PALMER, L.; KUCAB, P.; CUNNINGHAM, R.; KAUFMAN, R.J.; PIPE, S.W. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. **Blood**, 103: 3412-3419, 2004.

MICLEA, R.D.; PUROHIT, V.S.; BALU-IYER, S.V. O-phospho-L-serine, multi-functional excipient for B domain deleted recombinant factor VIII, **AAPS J.**, 9:E251-E259, 2007.

MIKAELSSON M, OSWALDSSON U, JANKOWSKI MA. 2001. Measurement of factor VIII activity of B-domain deleted recombinant factor VIII, **Semin Hematol.**, 38:13-23.

MIKAELSSON M, OSWALDSSON U, SANDBERG H. 1998. Influence of phospholipids on the assessment of factor VIII activity, **Haemophilia**, 4:646-50.

MORAES, A.M.; MENDONÇA, R.Z.; SUAZO, C.A.T. **Meio de cultura para células animais**. In: MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L.R. (Orgs) Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica, capítulo 5. Ed. Roca, 2008. p.112-121.

MUKHOPADHYAY, A.; MUKHOPADHYAY, S.N.; TALWAR, G.P. Influence of serum proteins on the kinetics of attachment of vero cells to cytodex microcarriers. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 56, p. 369-374, 1993.

NEIDHARDT E, KOVAL R, BURKE E, WARNE N. 2005. In vitro evaluation of B-domain deleted recombinant factor VIII (ReFacto\_) stability during simulated continuous infusion administration, **Haemophilia**, 11:319–325.

PALOMARES, L.A., GONZALEZ, M., RAMIREZ, O. T., Evidence of Pluronic® F-68 direct interaction with insect cells: impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production. **Enzyme and Microbial Technology**, 26, 324-331, 2000.

PARKER, E.T.; CRADDOCK, H.N.; BARROW, R.T.; LOLLAR, P. Comparative immunogenicity of recombinant B domain-deleted porcine factor VIII and Hyate:C in hemophilia A mice presensitized to human factor VIII, **J Thromb Haemost**, 2: 605–11, 2004.

PICANÇO, V. et al. Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non - hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. **Cytotherapy**, v.9, p.785-94, 2007.

PIPE, S.W; The promise and challenges of bioengineered recombinant clotting factors. **Thromb Haemost**, v.3, p.1692 - 1701, 2008.

PUROHIT, V.S.; MIDDAUGH, C.R.; BALASUBRAMANIAN, S.V. Influence of aggregation on immunogenicity of recombinant human Factor VIII in hemophilia A mice. **J Pharm Sci**. 95(2):358-71, 2006.

PUROHIT, V.S.; RAMANI, K.; KASHI, R.S.; DURRANI, M.J.; KREIGER, T.J.; BALASUBRAMANIAN, S.V. Topology of factor VIII bound to phosphatidylserine-containing model membranes, **Biochimica et Biophysica Acta** 1617: 31– 38, 2003.

RAMIREZ, O.T.; SURESHKUMAR, G.K. e MUTHARASAN, R. Bovine colostrum or Milk as a serum substitute for the cultivation of a mouse hybridoma. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, vol.35, p 882-889.

RANG, T. et al. Lipid Binding Region (2303-2332).In Involved in Aggregation of Recombinant Human FVIII. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v94, n.6, p. 1288-1299, 2001.

RESENDE, M.A.C.; SILVA, E.V. Administração de Fatores da Coagulação: Quais as Evidências?. **Medicina Perioperatória**. 2009.cap. 42, p.335-341.

RODRIGUEZ, M.H.; PLANTIER, J.L.; ENJOLRAS, N.; REA, M.; LEBOEUF, M.; UZAN, G.; NEGRIER, C. Biosynthesis of FVIII in megakaryocytic cells: improved production and biochemical characterization, **British Journal of Haematology**, 127:568–575, 2004.

ROSENBERG JB, GREENGARD JS, MONTGOMERY RR. 2000. Genetic induction of a releasable pool of factor VIII in human endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20: 2689-2695.

SHEN, C.F.; HAWARI, J. e KAMEN, A. Micro quantitation of lipids in serum-free cell culture media: a critical aspect is the minimization of interference from medium components and chemical reagents. *Journal of Chromatography B*, 2004, vol. 810, p. 119-127.

SINACORE, M.S.; DRAPEAU, D.; ADAMSON, S.R. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. In: Jenkins, N. (ed.) **Methods in Biotechnology**. Nova Jersey: Humana Press, 1999. vol. 8, p. 11-22.

SOUKHAREV, S.; HAMMOND, D.; ANANYEVA, N.M.; ANDERSON, J.A.M.; HAUSER, C.A.E.; PIPE, S.; SAENKO, E.L. Expression of factor VIII in recombinant and transgenic systems. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, 28: 134-248, 2002.

VAN DER POL, L.E.; TRAMPER, J. Shear Sensitivity of Animal Cells from a Culture Medium Perspective, **Trends in Biotechnology**, 1998. v. 16, p. 323-328.

YATUV, R.; DAYAN, I.; BARU, M. A modified chromogenic assay for the measurement of very low levels of factor VIII activity (FVIII: C), **Hemophilia**, 12: 253–257, 2006.

WANG, W.; WANG, Y.J.;KELNER, D.N. Coagulation factor VIII: structure and stability **International Journal of Pharmaceutics**.v. 259, p. 1–15, 2003.

ZANDER, L; BEMARK, M. Identification of genes deregulated during serum-free medium adaptation of a Burkitt's lymphoma cell line. **Cell Prolif.**, v.41, p.136–155, 2008.