

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Úrsula Fernanda Tavares Rodrigues da Silva

**Avaliação de diferentes sistemas de cultivo em escala de bancada
para a expressão transiente de anticorpos monoclonais**

Rio de Janeiro

2018

Úrsula Fernanda Tavares Rodrigues da Silva

**Avaliação de diferentes sistemas de cultivo em escala de bancada
para a expressão transiente de anticorpos monoclonais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação de Formação em Pesquisa Biomédica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção ao título de Mestre em Pesquisa Biomédica.

Orientador: Dr. José Procópio Moreno Senna

Co-Orientador: Me. Guillermo Marini

Rio de Janeiro

2018

Silva, Úrsula Fernanda Tavares Rodrigues da

Avaliação de diferentes sistemas de cultivo em escala de bancada para a expressão transiente de anticorpos monoclonais. / Úrsula Fernanda Tavares Rodrigues da Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2018.

93 f.: il.; 31 cm.

Orientador: José Procópio Moreno Senna.

Coorientador: Guillermo Marini

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Pós-Graduação em formação para a pesquisa biomédica, 2018.

Referências: f. 78-82.

1. Anticorpos Monoclonais- análise. 2. *Staphylococcus aureus* Resistente à Metilina. 3. Proteínas de Ligação às Penicilinas. 4. Técnicas de Cultura de Células- instrumentação. 5. Células HEK293. 6. Híbridomas. 7. Pesquisa biomédica - tese. I. Senna, José Procópio Moreno. II. Marini, Guillermo. III. UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Pós-Graduação em formação para pesquisa biomédica. IV. Título.

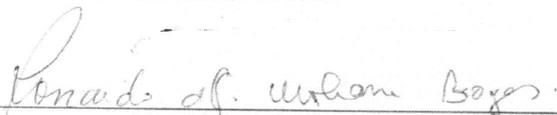
“Avaliação de diferentes sistemas de cultivo em escala de bancada para expressão
transiente de anticorpos monoclonais”

ÚRSULA FERNANDA TAVARES RODRIGUES DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA
SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

Rio de Janeiro, 14 de dezembro de 2018.



DR. RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)



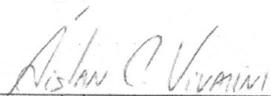
DR. JOSE PROCOPIO MORENO SENNA (DOUTOR – FIOCRUZ) – ORIENTADOR



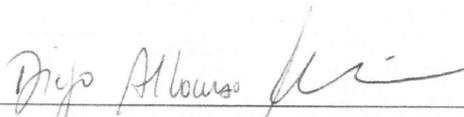
DR. GUILLERMO MARINI (DOUTOR – FIOCRUZ) – COORIENTADOR



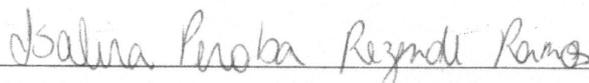
DRA. FLÁVIA FONSECA BLOISE (DOUTOR – UFRJ) – REVISOR



DR. ÁISLAN DE CARVALHO VIVARINI (DOUTOR – UFRJ)



DR. DIEGO ALLONSO RODRIGUES DOS SANTOS DA SILVA (DOUTOR – UFRJ)



DRA. ISALIRA PEROBA REZENDE RAMOS (DOUTOR – UFRJ)

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo, Felipe Rodrigues.

Aos meus pais, Valdemiro Rodrigues e Josemary Tavares.

Ao meu irmão Rodolpho Tavares.

A minha amada filha, Catharina Tavares Rodrigues.

Que foram os meus alicerces nesta longa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha amada filha, Catharina Rodrigues por ser a minha maior incentivadora. Motivo de toda minha dedicação, esforço e persistência. Hoje enxergo a vida através dos seus olhos.

Agradeço ao meu marido, Felipe Rodrigues por todo amor, carinho e paciência que teve comigo ao longo deste período de estudo. Sem o seu apoio e incentivo não seria possível percorrer esta caminhada.

Aos meus maravilhosos pais que sempre me impulsionaram a estudar para conquistar uma vida digna e honesta. Agradeço também a todo alicerce e apoio que, ofereceram principalmente nos cuidados com a Catharina, para que eu pudesse estudar.

Ao meu querido irmão, Rodolpho Tavares pelo carinho que sempre teve comigo.

Ao meu orientador, José Procópio Moreno Senna pela oportunidade de dividir sua experiência comigo e possibilitar o aprimoramento do meu conhecimento técnico-científico.

Ao meu coorientador, Guillermo Marini um argentino muito gente boa, agradeço toda sua paciência, disponibilidade e ajuda nos experimentos de bancada. Obrigado, pela sua generosidade em partilhar os seus conhecimentos.

Aos meus amigos, Flávia de Paiva e Emílio Gomes pelas conversas enriquecedoras e pela paciência nos momentos difíceis.

A gerente do Departamento de Vacinas Bacterianas (DEBAC/Bio-Manguinhos), Maria do Carmo. E ao gerente da Divisão de Apoio a Bacterianas (DIAPB/Bio-Manguinhos), Jorge Alexandre Cunha.

A equipe do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER/Bio - Manguinhos).

A equipe do Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (LATAM/ Bio-Manguinhos).

A equipe do Laboratório de Macromoléculas (LAMAM/ Bio-Manguinhos).

Aos professores do Mestrado profissional de Pesquisa Biomédica (IBCCF/UFRJ).

A professora, Flávia Bloise que me ajudou na revisão da dissertação.

E principalmente a DEUS, que me manteve erguida, com força, determinação e fé!

RESUMO

Silva, Úrsula Fernanda Tavares Rodrigues da. Avaliação de diferentes cultivos em escala de bancada para expressão transiente de anticorpos monoclonais, 2018. Dissertação (Mestrado para formação em pesquisa biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018

Dentre as etapas iniciais de desenvolvimento de um anticorpo monoclonal estão à seleção do anticorpo específico para o antígeno de interesse, caracterizações químicas, físicas e biológicas. Estes processos demandam tempo e custos. A expressão transiente é uma alternativa rápida e eficiente quando se pretende obter quantidades em massa de anticorpo, para posterior caracterização. O gene que codifica a proteína de interesse é introduzido em uma célula animal, que tem a capacidade de expressar temporariamente a proteína de interesse. Este trabalho, tem por objetivo avaliar dentre os sistemas de cultivo, àquele capaz de proporcionar um aumento da produtividade volumétrica do anticorpo monoclonal anti-proteínas de ligação à penicilina 2a (do inglês - *Penicilin Binding Protein 2a* - PBP2a) de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) através da expressão transiente em células de rim embrionário humano 293 (do inglês - *Human Embryonic Kidney* - HEK 293). Para tanto, foram realizadas diferentes estratégias, mediante a integração dos modos de operação (batelada ou semi-perfusão), sistemas de expressão (frascos *Roller*, *Spinner* ou erlenmeyer) e temperatura de cultivo, a 37 °C (condição usual) ou a 34 °C (condição de indução hipotérmica). Os resultados demonstram que o sistema de cultivo em frasco *roller* no modo de operação em batelada, associado à condição de uma leve hipotermia das células a uma temperatura de 34 °C após a transfecção apresentou o melhor resultado na produtividade volumétrica quando comparado com os demais ensaios. Foram realizados ensaios físico-químicos para caracterização dos anticorpos monoclonais anti-PBP2a de MRSA que confirmam a funcionalidade e aspectos qualitativos da proteína secretada.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais, expressão transiente, MRSA. PBP2a.

ABSTRACT

Silva, Ursula Fernanda Tavares Rodrigues da. Evaluation of different bench scale for transient expression of monoclonal antibodies, 2018. Dissertation (Master's degree for training in biomedical research) - Biophysics Institute Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018

Among the initial stages of development of a monoclonal antibody are the selection of the antibody specific for the antigen of interest, chemical, physical and biological characterization. These processes take time and cost. Transient expression is a fast and efficient alternative when it is desired to obtain bulk quantities of antibody for further characterization. The gene encoding the protein of interest is introduced into an animal cell, which has the ability to temporarily express the protein of interest. The aim of this study was to evaluate the increase in the volumetric productivity of the anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) penicillin-binding protein 2a (PBP2a) monoclonal antibody, through transient expression in human embryonic kidney 293 (HEK 293) cells. In order to do this, different strategies were performed by integrating the modes of operation (batch or semi-perfusion), expression systems (roller, spinner or erlenmeyer flasks) and culture temperature at 37 °C (usual condition) or at 34 °C (hypothermic induction condition). The results demonstrate that the roller bottle culture system in the batch mode, coupled with the condition of mild hypothermia of the cells at a temperature of 34 °C after transfection, presented the best result in the volumetric productivity when compared to the others essay. Physical and chemical assays were performed to characterize MRSA anti-PBP2a monoclonal antibodies that confirm the functionality and qualitative aspects of the secreted protein.

Key words: Monoclonal antibodies, transient expression, MRSA, PBP2a.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura de uma molécula de anticorpo.....	03
Figura 2 - Estrutura tridimensional de uma molécula de IgG humana revelada por cristalografia de Raios X.....	04
Figura 3 - Esquema ilustrativo do método do hibridoma na geração de anticorpos monoclonais murinos.....	06
Figura 4 - Principais diferenças estruturais entre anticorpos murinos, quiméricos, humanizados e humanos.....	08
Figura 5 - Tipos de anticorpos.....	10
Figura 6 - Anticorpos monoclonais aprovados.....	11
Figura 7 – (A) Plataforma para agitação de frascos do tipo Roller; (B) Frascos Roller para cultivo de células.....	13
Figura 8 - Frasco Spinner para cultivo de células em suspensão.....	14
Figura 9 - Os diversos modos de operação no cultivo de células animais.....	17
Figura 10 – Morfologia do <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA)..	22
Figura 11 - Desenho representativo do vetor pcDNA3.....	27
Figura 12 – Esquemas representativos das construções das cadeias leves e das cadeias pesadas.....	27
Figura 13 - (A) Câmara de Neubauer para contagem das células (B) Quadrantes da Câmara de Neubauer.....	30
Figura 14 - Procedimento de descongelamento e passagem das células Expi 293F™	33
Figura 15- Procedimentos para etapa de transfecção das células Expi 293F™ no meio de expressão Expi 293™	34
Figura 16 - Os diferentes sistemas, modos de operação e parâmetros de temperatura avaliados em cada produção.....	40
Figura 17 - Cálculo para concentração de proteínas.....	43

Figura 18 - Cinética de crescimento e viabilidade celular do cultivo em Erlenmeyers, no modo de produção em batelada, na temperatura de 37 °C após a transfecção.....	47
Figura 19 - Viabilidade celular do cultivo em Erlenmeyers, no modo de produção em batelada, na temperatura de 37 °C após a transfecção.....	47
Figura 20 - Concentração de anticorpo monoclonal de MRSA.....	48
Figura 21 - Massa de anticorpo monoclonal de MRSA.....	48
Figura 22 - Cinética de crescimento celular do cultivo em Erlenmeyers no modo de produção em semi-perfusão, na temperatura de 37 °C após a transfecção na 2 ^a produção.....	50
Figura 23 - Viabilidade celular do cultivo em Erlenmeyers no modo de produção em semi-perfusão, na temperatura de 37 °C após a transfecção na 2 ^a produção.....	51
Figura 24- Concentração em µg/mL de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a.....	52
Figura 25 - Massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a.....	52
Figura 26 - Cinética de crescimento celular do cultivo em Erlenmeyer no modo de produção em batelada na temperatura de 34 °C após a transfecção na 3 ^a produção.....	55
Figura 27 - Viabilidade do cultivo em Erlenmeyers, no modo de produção em batelada, na temperatura de 34 °C após a transfecção na 3 ^a produção.....	56
Figura 28- Concentração de anticorpo monoclonal de MRSA produzidos em µg/mL no ensaio imunoenzimático na 3 ^a produção.....	57
Figura 29 - Massa de anticorpo monoclonal de MRSA µg/ 30mL no ensaio imunoenzimático (ELISA) na 3 ^a produção	57
Figura 30 - Cinética de crescimento celular do cultivo em frascos <i>Roller</i> , no modo de produção em batelada, a temperatura de 34° C após a transfecção na 4 ^a produção.....	60
Figura 31 - Viabilidade celular do cultivo em frascos <i>Roller</i> , no modo de produção em batelada, a temperatura de 34° C após a transfecção na 4 ^a produção.....	60

Figura 32 - Cinética de crescimento celular do cultivo em frascos <i>Spinner</i> , no modo de produção em batelada, a temperatura de 34 °C após a transfecção na 4 ^a produção.....	62
Figura 33 - Viabilidade celular do cultivo em frascos <i>Spinner</i> , no modo de produção em batelada, a temperatura de 34 °C após a transfecção na 4 ^a produção.....	62
Figura 34 - (A) Concentração de anticorpo monoclonal de MRSA anti PBP2a produzido em µg/mL no ensaio imunoenzimático (ELISA) na 4a produção em sistemas de frascos Roller. (B) Massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti PBP2a produzido em µg/mL no ensaio imunoenzimático (ELISA) na 4a produção, em frascos Spinner.....	64
Figura 35 - (A) Massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti PBP2a produzido em µg/90mL no ELISA na 4a produção em sistema de frascos Roller. (B) Massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti PBP2a produzido em µg/90mL no ELISA na 4a produção em sistema de frascos Spinner.....	64
Figura 36 - Massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a secretado (µg/mL) nas produções.....	66
Figura 37 - Massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a secretado (µg/30mL ou µg/90mL) nas produções.....	66
Figura 38 - Eletroforese de anticorpo anti-MRSA.....	68
Figura 39 - Focalização isoeétrica em gel de poliacrilamida dos anticorpos anti-MRSA.....	68
Figura 40 - Perfil cromatográfico do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a na 3 ^a produção.....	70
Figura 41 - SDS-PAGE das frações cromatográficas provenientes da purificação de IgG MRSA anti-PBP2a na 3 ^a produção.....	70
Figura 42 - Espectro de fluorescência do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a na 3 ^a produção.....	71
Figura 43 - Perfil cromatográfico do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a na 4 ^a produção em sistema <i>Roller</i>	72
Figura 44 - SDS-PAGE 4-12% das frações cromatográficas provenientes da purificação do anticorpo MRSA na 4 ^a produção em sistema <i>Roller</i>	73

Figura 45 - IEF-PAGE pH 3-9 para estimativa do pI do anti-MRSA.....	73
Figura 46 - Espectro de fluorescência do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a na 4ª produção em sistema <i>Roller</i>	74
Figura 47 - SDS-PAGE da purificação de anticorpo anti-MRSA na 4ª produção em <i>Spinner</i>	75
Figura 48 - Focalização isoelétrica do MRSA na 4ª produção em <i>Spinner</i>	76
Figura 49 - Espectro de fluorescência do Anticorpo Monoclonal na 4ª produção em <i>Spinner</i>	76

Lista de Quadros

Quadro 1- Tipos de anticorpos monoclonais.....	09
Quadro 2 - Classificação dos Biorreatores de acordo com a homogeneidade do sistema.....	16
Quadro 3 - Comparativo das produtividade volumétricas de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a nos diferentes sistemas, modos de produção e influência do parâmetro temperatura a 37 °C e 34 °C.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN – Ácido Desoxirribonucléico

CDR's – Regiões de determinação de complementariedade

CO₂ - Dióxido de Carbono

DTT - Dithiothreitol

ELISA – Imunoensaio ligado a enzima (do inglês *Enzyme Linked Immuno Assay*)

EUA – Estados Unidos da América

Fc – Fragmento cristalizável

FDA – Administração de drogas e alimentos (do inglês - *Food and Drug Administration*)

HAMA - Anticorpos humanos anti-camundongo (do inglês - *Human Antimouse Antibodies*)

HAT – meio de cultivo de hibridomas contendo hipoxantina, aminopterina e timidina; utilizado durante o processo de hibridização

HEK 293 – Rim embrionário Humano (do inglês - *Human Embryonic Kidney 293*)

IEF-PAGE - Focalização Isoelétrica em Gel de Poliacrilamida

IgG – Imunoglobulina G

kDa - kiloDaltons

LATAM - Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais

LAMAM - Laboratório de Macromoléculas

mAbs – Anticorpos monoclonais (do inglês - *Monoclonal Antibodies*)

mL – mililitro

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

Nm – Nanômetro

NaCl – Cloreto de sódio

O₂ - Oxigênio

OKT3 – primeiro anticorpo monoclonal aprovado para uso terapêutico; de origem murina.

PBP2a - Proteína de ligação à proteína 2a (do inglês - *Penicilin Binding Protein 2a*)

PBS – Solução de tampão fosfato (do inglês - Phosphate Buffer Solution)

pH – potencial de hidrogênio

pI – Ponto Isoelétrico

PM – Peso Molecular

RPM – Rotações por minuto

R₁ – Réplica 1

R₂ – Réplica 2

R₃ – Réplica 3

SDS-PAGE – Dodecil Sulfato de Sódio – Gel Poliacrilamida Eletroforese (do inglês - *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

µg - Micrograma

VH – Porção variável da cadeia pesada de um anticorpo

VL – Porção variável da cadeia leve de um anticorpo.

www – Rede mundial de computadores (do inglês - *Word Wide Web*)

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Anticorpos.....	2
1.2 Imunoterapia passiva.....	4
1.3 Tecnologia dos hibridomas.....	5
1.4 Anticorpos monoclonais e a redução da imunogenicidade em humanos.....	7
1.5 Anticorpos monoclonais e o mercado biofarmacêutico.....	9
1.6 Sistemas de cultivo.....	121
1.6.1 Cultivos em pequena escala.....	12
1.6.1.1 Frasco Roller.....	13
1.6.1.2 Frasco Spinner.....	14
1.6.1.3 Biorreatores.....	14
1.6.2 Modos de operação.....	17
1.6.2.1 Cultivos em batelada.....	18
1.6.2.2 Cultivo em batelada alimentada.....	18
1.6.3.3 Cultivo em perfusão.....	20
1.7 A resistência microbiana e terapias alternativas.....	21
1.8 Anticorpos monoclonais murinos anti-PBP2a de MRSA.....	22
1.9. Sistemas de expressão transiente associado a uma leve hipotermia em células HEK-293.....	23
2.0 JUSTIFICATIVA.....	25
3.0 OBJETIVOS.....	26
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Construções de cadeias leves e pesadas do anticorpo monoclonal.....	27
4.2 Linhagem celular HEK-293.....	27
4.3 Meios de cultivo.....	28

4.4 Reagentes para transfecção.....	28
4.5 Sistemas de Cultivo.....	29
4.6 Análise de viabilidade e celularidade.....	29
4.7 Descongelamento das células.....	31
4.8 Expansão das células.....	31
4.9 Transfecção das células HEK-293.....	31
4.9.1 Transfecção das células HEK-293 em Erlenmeyers.....	31
4.9.2 Transfecção de células HEK-293 em frascos tipo <i>Spinner</i> e <i>Roller</i>	32
4.10 A expressão transiente células HEK-293.....	34
4.10.1 Estratégia de produção.....	35
4.10.2 Sistema de produção erlenmeyers com modo de produção em batelada a 37 °C após a transfecção.....	36
4.10.3 Sistema de produção em erlenmeyers com modo de produção em semi-perfusão a 37 °C após a transfecção.....	37
4.10.4 Sistema de produção em erlenmeyers com modo de produção em batelada a 34 °C após a transfecção.....	38
4.10.5 Sistema de produção em frasco <i>Roller</i> com modo de produção em batelada a 34 °C após a transfecção.....	38
4.10.6 Sistema de produção em frasco <i>Spinner</i> com modo de produção em batelada a 34 °C após a transfecção.....	39
4.11 Purificação por cromatografia de afinidade a proteína A.....	41
4.12 Concentração por ultrafiltração e dessalinização.....	41
4.13 Caracterização físico-química.....	41
4.13.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	41
4.13.2 Focalização isoeétrica.....	42
4.13.3 Dosagem de proteínas.....	43
4.13.4 Espectroscopia de fluorescência.....	43
4.13.5 Ensaio imunoenzimático (<i>ELISA</i>).....	43
4.14 Análise estatística.....	44

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Cinéticas de crescimento celular, viabilidade celular e avaliação das produtividades volumétricas.....	45
5.1.1 Cinética do crescimento e viabilidade celular na 1ª produção.....	45
5.1.2 Rendimento na expressão do anticorpo monoclonal de MRSA obtido na 1ª produção.....	47
5.1.3 Cinética do crescimento e viabilidade celular da 2ª produção.....	49
5.1.4 Avaliação do rendimento na expressão do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a obtido na 2ª produção.....	51
5.1.5 Cinética do crescimento e viabilidade celular na 3ª produção.....	53
5.1.6 Rendimento na expressão do anticorpo monoclonal de MRSA obtido na 3ª produção.....	56
5.1.7 Cinética do crescimento e viabilidade celular na 4ª produção.....	58
5.1.7.1 Cinética do crescimento e viabilidade celular na 4ª produção no sistema de frascos <i>Roller</i>	58
5.1.7.2 Cinética do crescimento e viabilidade celular na 4ª produção em frascos <i>Spinner</i>	60
5.1.8 Rendimento na expressão do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a obtido na 4ª produção em frascos <i>Roller</i> e <i>Spinner</i>	62
5.2 Caracterizações dos ensaios de produção do anticorpo monoclonal de MRSA.....	67
5.2.1 Ensaios de caracterização na 1ª do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA na 1ª produção.....	67
5.2.2 Ensaios de caracterização do anticorpo monoclonal MRSA anti-PBP2a 3ª produção.....	69
5.2.3 Ensaios de caracterização do anticorpo monoclonal MRSA anti-PBP2a na 4ª produção em frascos <i>Roller</i>	71
5.2.4 Ensaios de caracterização do anticorpo monoclonal MRSA anti-PBP2a na 4ª produção em frascos <i>Spinner</i>	74
6.0 CONCLUSÃO.....	77

7.0 REFERÊNCIAS.....	78
ANEXO A - ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	86

1.0 INTRODUÇÃO

Atualmente, os anticorpos monoclonais pertencem ao grupo de biofármacos mais estudados e de maior destaque no mercado. O termo biofármaco é utilizado para designar proteínas e substâncias derivadas de ácidos nucleicos, utilizadas com finalidade terapêutica ou em diagnóstico *in vivo* produzidos por meios que não a extração direta por fontes biológicas (WALSH, 2004). Há um interesse em especial pelos anticorpos monoclonais devido à sua ação específica e a reduzida imunogenicidade causada aos pacientes. Existe uma forte tendência de que as vendas destes medicamentos continuem a aumentar nos próximos anos, em razão do avanço no desenvolvimento de novos produtos candidatos e principalmente pela sua crescente consolidação dos anticorpos monoclonais no mercado biofarmacêutico (ECKER et al., 2015).

O processo de fabricação de um biofármaco tradicional consiste em uma sequência similar de operações unitárias que são divididas em duas partes principais: *upstream* e *downstream*. A etapa de *upstream* para produção de anticorpos monoclonais começa com o cultivo celular. É realizado a partir de um inóculo inicial e expandido para biorreatores, que operam nos modos de produção em batelada, batelada alimentada ou perfusão. Em seguida, as células e restos celulares são removidos por centrifugação, seguido por filtrações em membrana. Já o processo de *downstream* tem início com a separação das células do sobrenadante e da captura do anticorpo monoclonal por cromatografia afinidade com proteína A. Seguida de uma série de etapas de purificação, ultrafiltração e concentração do produto (HONG et al., 2017).

As etapas para o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal envolvem primordialmente a escolha e a geração de um anticorpo específico para o antígeno alvo. E, além disto, incluem também a caracterização deste anticorpo através de ensaios químicos, físicos e biológicos para a determinação do produto. Visto que, todo este processo exige uma demanda de custo e tempo, uma possibilidade para a geração de proteínas de maneira rápida e eficaz ocorre por meio da expressão transiente de proteínas heterólogas em sistemas utilizando células de mamífero, como as células embrionárias de rim humano 293 (*Human Embryonic Kidney – HEK-293*). Através da expressão transiente torna-se viável a obtenção de quantidades do anticorpo, com o objetivo de caracterizá-lo e estudar a sua

funcionalidade (ABBOT et al., 2015).

No presente trabalho, foram realizados experimentos para avaliação da produtividade volumétrica dos anticorpos monoclonais recombinantes nos sistemas de cultivo, em Erlenmeyers, frascos do tipo *Spinner* e *Roller* empregando como modelo um anticorpo monoclonal que reconhece a proteína de ligação a penicilina 2a (*Penicilin Binding Protein- PBP2a*) de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Paralelamente aos diferentes sistemas, foram avaliados também os modos de produção em batelada e semi-perfusão utilizando o modelo de sistema de expressão transiente através de células HEK-293, com uso do *kit* Expi 293™ da Thermofisher. Por meio das avaliações do sistema de cultivo e dos modos de operação que apresentaram melhores resultados, foi introduzida a variável temperatura induzindo as células HEK-293 em uma condição de leve hipotermia, com a redução de temperatura para 34 °C, após a transfecção das células com o vetor que carrega o gene que codifica as cadeias leves e pesadas do anticorpo monoclonal de interesse a ser caracterizado.

1.1 Anticorpos

Os anticorpos são proteínas circulantes produzidas nos vertebrados pelo sistema imunológico. Em resposta a uma exposição a certas estruturas moleculares diferentes ao organismo, estruturas estas conhecidas como antígenos. Os anticorpos são amplamente diversos e altamente específicos em sua capacidade de reconhecer estruturas moleculares diferentes ao organismo e constituem os mediadores da imunidade humoral contra classes de microorganismos (ABBAS; LICHMAN; PILLAI, 2015). Na fase efetora da imunidade humoral, esses anticorpos secretados se ligam aos antígenos, ativando mecanismos efetores que visam eliminar os antígenos (ABBAS; LICHMAN; PILLAI, 2015).

As moléculas de anticorpos apresentam estruturais básicas semelhantes, são formadas por duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas. Tanto a cadeia leve como a pesada apresentam regiões variáveis aminoterminal variáveis (V) que participam do reconhecimento do antígeno e regiões carboxiterminais constante (C). As regiões C-terminais das cadeias pesadas medeiam funções efetoras como: fagocitose, lise de microorganismos e toxinas, ativação do sistema complemento e opsonização. Cada cadeia leve é ligada a região variável da cadeia pesada por ligações dissulfeto. Sendo as cadeias pesadas

ligadas entre elas por ligações dissulfeto na região constante. As figuras 1 e 2 mostram a estrutura de uma molécula de anticorpo (ABBAS; LICHMAN; PILLAI, 2015).

A maioria das diferenças de sequência e variabilidade entre os diferentes anticorpos são encontrados em três pequenas regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve. Essas regiões são chamadas de hipervariáveis, e originam uma superfície complementar à forma tridimensional do antígeno ligado. As regiões hipervariáveis também chamadas de regiões determinantes de complementaridade (CDRs) – (CDR1, CDR2 e CDR3) (ABBAS; LICHMAN; PILLAI, 2015).

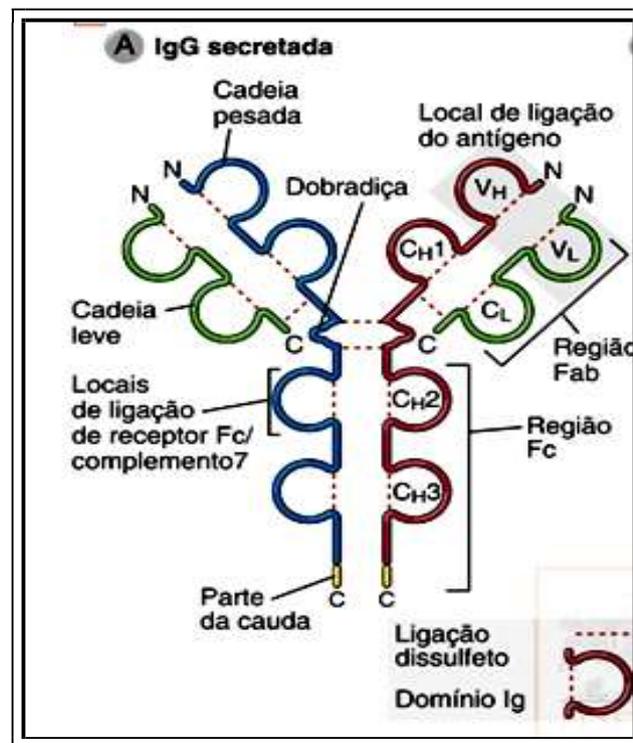


Figura 1 - Estrutura de uma molécula de anticorpo. Estrutura de uma molécula de anticorpo. (A) Diagrama esquemático de uma molécula de IgG (Imunoglobulina G) secretada. Os locais de ligação do antígeno são formados pela justaposição dos domínios V_L e V_H . As regiões C das cadeias pesadas terminam em uma estrutura terciária linear.

Fonte: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (2015).

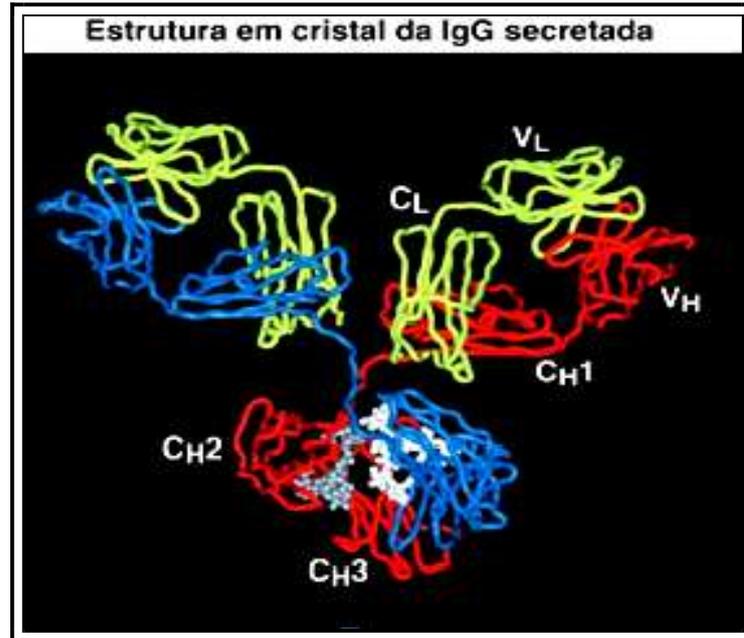


Figura 2 - Estrutura tridimensional de uma molécula de IgG humana revelada por cristalografia de Raios X. Neste diagrama de uma molécula de IgG secretada, as cadeias pesadas estão coloridas em azul e vermelho, e as cadeias leves estão coloridas de verde.

Extraído de: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (2015).

1.2 A imunoterapia passiva

A capacidade do animal vertebrado de produzir anticorpos contra toxinas bacterianas foi descoberto pelos cientistas Emil Adolf Von Behring e Kitasato Shibasaburo no início da década de 1890. Esta observação levou ao rápido desenvolvimento da terapia de anticorpos para o tratamento de diversas doenças infecciosas (CASADEVALL; PIROFSKI, 2004). Eles verificaram que animais imunologicamente competentes poderiam ser protegidos por soro retirado de animais tratados com doses subletais de preparações brutas de tétano e difteria, dando origem à soroterapia (FLOSS; FALKENBURG; CONRAD, 2007).

Após esta descoberta, começaram a surgir os efeitos adversos do uso da soroterapia. As reações adversas ocorriam em razão desses soros usados nos tratamentos possuírem origem animal. Com o advento dos antibióticos e sulfonamidas na primeira metade da década de 30, o uso da soroterapia foi sendo gradativamente descontinuada, pois as reações adversas e o alto grau de toxicidade trazida aos pacientes levaram a conclusão que este tratamento não oferecia vantagens. Além disso, os antimicrobianos aplicados como recurso terapêutico, atendiam as necessidades da época (KAUFMANN; STEFAN, 2017).

Na segunda metade do Século XX, a terapia baseada em anticorpos ganhou novamente evidência, porém agora como uma forma relevante no tratamento para muitas doenças inflamatórias e infecciosas, devido ao desenvolvimento da tecnologia do anticorpo monoclonal e a descoberta de receptores de superfície celular que reconhecem o fragmento constante dos anticorpos, denominada região do Fragmento cristalizado (Fc) (CASADEVALL; PIROFSKI, 2004; ELBAKRI et al., 2010). Paralelo a estes acontecimentos, a geração de camundongos com deficiências genéticas definidas, tornaram possíveis os estudos e reacenderam o interesse nos mecanismos básicos de imunidade mediada por anticorpos (CASADEVALL; PIROFSKI, 2004; ELBAKRI et al., 2010).

A descoberta da tecnologia de hibridomas e o posterior estabelecimento dos anticorpos monoclonais ofereceram resultados nos tratamentos de diversas doenças autoimunes, cardiovasculares e infecciosas, câncer e inflamação. Além disto, estão gerando uma riqueza de informações nos ensaios clínicos realizados e ampliando as perspectivas para aplicações na área de diagnóstico (CHAMES et al., 2009).

Atualmente, estão disponíveis no mercado biofarmacêutico inúmeros produtos derivados de anticorpos monoclonais, para diversas terapias. Os estudos e as pesquisas para o desenvolvimento de novos produtos derivados de anticorpos monoclonais (*Monoclonal Antibodies* - mAbs) avançam diariamente e reacendem a esperança no tratamento de diversas enfermidades, como por exemplo: carcinoma, artrite reumática, sarcoma, esclerose múltipla, mieloma e doenças cardíacas (WALSH, 2014).

1.3 Tecnologia dos Hibridomas

No século XX, Paul Ehrlich propôs o modelo da “bala mágica” no qual um fármaco é ligado a um carreador específico com atuação somente no tecido alvo. Desta forma, não haveria respostas indesejáveis em outros tecidos, além do fato de ser direcionado, e com alto grau de eficiência e com uma menor administração da dose (SANTOS et al., 2006).

Em 1975, apoiados no conceito da “bala mágica”, Köhler e Milstein desenvolveram os anticorpos monoclonais *in vitro*, com especificidade pré-definida. A tecnologia de produção de hibridomas inovou a terapia com o uso de anticorpos, possibilitando a partir deste momento, a obtenção de quantidades consideráveis de anticorpos homogêneos com a capacidade de resposta específica a seu antígeno.

(MORAES et al., 2008).

A estratégia de produção de um hibridoma consiste na fusão *in vitro* de linfócitos B produtores de anticorpos, oriundos de camundongos, com mielomas que possuem a capacidade de se propagar *in vitro*. Os produtos da fusão preservam a capacidade de se propagar por longos períodos em cultura e de secretar anticorpos de interesse. Os mielomas empregados nas fusões são, geralmente, linhagens celulares adaptadas ao cultivo *in vitro* a partir de tumores desenvolvidos em murinos. Já os linfócitos B normais secretores dos anticorpos específicos são obtidos de camundongos previamente imunizados com o antígeno de interesse, permitindo a obtenção de quantidades de anticorpos homogêneos e altamente específicos (MORAES et al., 2008). A Figura 3 descreve as etapas para geração de anticorpos monoclonais murinos.

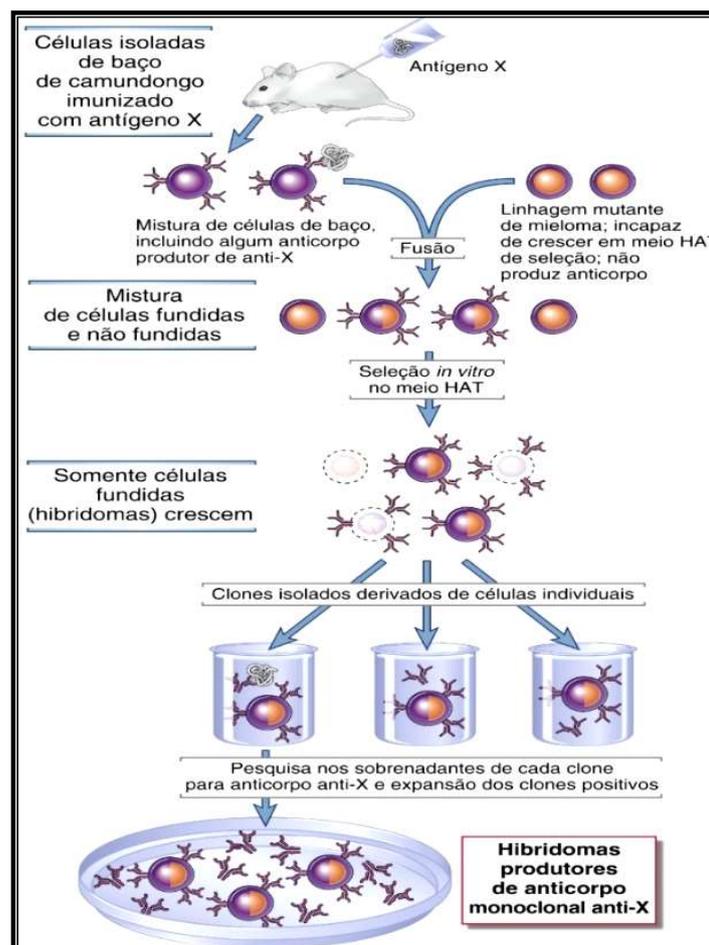


Figura 3 - Esquema ilustrativo do método do hibridoma na geração de anticorpos monoclonais murinos.

Extraído de: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (2015).

Os primeiros anticorpos monoclonais produzidos eram feitos a partir de moléculas originárias de camundongos, porém, estas eram reconhecidas como estranhos pelo sistema imune humano. Além disso, para serem eficazes, os anticorpos precisam interagir com outros elementos do sistema complemento e receptores superficiais das células efectoras. Por esta razão, os anticorpos monoclonais obtidos através de camundongos, não conseguiam ativar todos esses componentes do sistema imunológico humano, diminuído assim a sua eficácia (CHAMES et al., 2009).

Com o advento da técnica do ADN (Ácido Desoxirribonucleico) recombinante e o desenvolvimento no campo da genética, houve um grande avanço na tecnologia da produção de hibridomas. A partir dos anos 90, tornou-se possível clonar genes de moléculas de Imunoglobulina G (IgG) e como resultado, os genes de anticorpos monoclonais poderiam ser clonados em vetores eucarióticos (CHAMES; BATY, 2000). Desta forma, versões recombinantes de qualquer anticorpo monoclonal podiam ser obtidas a partir de diversas linhagens celulares de maneira reprodutível, resolvendo o problema da produção de hibridomas (CHAMES; BATY, 2000). Através do intenso progresso na área da biologia molecular foi possível a produção de anticorpos monoclonais quiméricos, humanizados e, atualmente, o totalmente humano.

1.4 Anticorpos monoclonais e a redução da imunogenicidade em humanos

Na década de 1980, iniciaram-se os estudos clínicos a respeito dos anticorpos monoclonais terapêuticos murinos. E os problemas ocasionados pelo reconhecimento e produção de anticorpos em resposta a esses anticorpos monoclonais foram rapidamente evidenciados: a chamada resposta dos anticorpos humanos anti-camundongo (*Human antimouse antibodies* - HAMA). A tentativa de solucionar estas questões impulsionou a evolução da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais, buscando o aumento da eficácia e a redução da imunogenicidade dessas moléculas. Técnicas de engenharia genética foram introduzidas para a produção tanto de anticorpos monoclonais quiméricos derivados do ADN de seres humanos e camundongos, quanto de anticorpos monoclonais totalmente humanos (OLEKSIEWICZ et al., 2012).

Um dos primeiros métodos para a diminuição da imunogenicidade gerada por anticorpos murinos foi desenvolvido para converter parcialmente os anticorpos

monoclonais murinos em anticorpos com cadeias de imunoglobulinas predominantemente humanas, preservando as regiões variáveis murinas. Os anticorpos são proteínas que foram conservadas ao longo da evolução; Sendo assim, foi possível criar quimeras através da fusão dos domínios variáveis murinos, responsáveis pela atividade vinculativa, com o domínio constante humano (CHAMES et al., 2009). Neste sentido, a porção Fc da molécula de anticorpo foi trocada por uma porção humana, dando origem aos anticorpos quiméricos. Dessa forma, a especificidade do anticorpo não é perdida, induzindo, porém, a uma resposta HAMA significativamente muito menor (BOULIANNE et al., 1984). Estes anticorpos quiméricos são 70% humanos e por possuírem a porção Fc humana, os torna menos imunogênico em humanos e lhes permite interagir com células efetoras humanas e com o sistema complemento (CHAMES et al.,2009). As técnicas em biologia molecular utilizadas para eliminar ainda mais as porções originárias de camundongos que são envolvidas com o reconhecimento do antígeno e geram imunogenicidade ao paciente humano, continuaram avançando. Com isso, surgem os anticorpos humanizados, onde os fragmentos de ADN correspondentes às regiões de determinação de complementariedade (CDR's) são enxertados na estrutura *framework* (regiões relacionadas à estrutura do anticorpo, estas regiões são mais conservadas da região da variabilidade que limitam os CDR's) das imunoglobulinas utilizando-se de métodos moleculares. A Figura 4 apresenta as diferenças estruturais entre os anticorpos monoclonais.

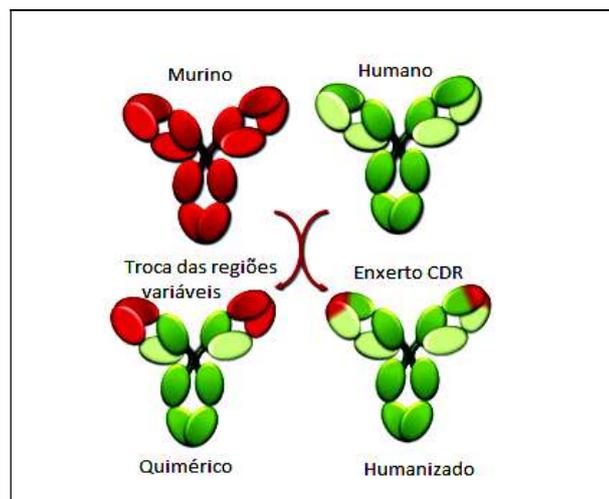


Figura 4 - Principais diferenças estruturais entre anticorpos murinos, quiméricos, humanizados e humanos. As sequências murinas estão em vermelho e as sequências humanas em verde. Cores claras representam as cadeias leves e cor escura para as cadeias pesadas. Adaptado de: CHAMES et al.,(2009).

Dessa maneira, os anticorpos conservam afinidade e especificidade e apresentam imunogenicidade reduzida em seres humanos (JONES et al., 1986). O quadro 1, descreve os tipos de anticorpos monoclonais (adaptado de OLEKSIEWICZ et al., 2012).

Tipos de Anticorpos Monoclonais:

<p><u>Anticorpo Monoclonal Murino</u></p> <p>Um anticorpo monoclonal totalmente derivado de camundongo. Hibridomas murinos gerados a partir da fusão de células de mieloma e de linfócitos B de camundongos.</p>
<p><u>Anticorpo Monoclonal Quimérico</u></p> <p>Anticorpo monoclonal construído a partir de regiões variáveis derivadas de uma fonte murina e regiões constantes derivadas de uma fonte humana.</p>
<p><u>Anticorpo Monoclonal humanizado</u></p> <p>Anticorpo monoclonal construído apenas com as regiões de ligação antígeno (CDR's) derivadas de camundongo, porém possui as regiões variáveis e regiões constantes de uma fonte humana.</p>
<p><u>Anticorpo Monoclonal Humano</u></p> <p>Anticorpo monoclonal totalmente derivado de uma fonte humana, camundongos transgênicos ou <i>phage display</i>.</p>

Quadro1 - Tipos de anticorpos

Fonte: adaptado de OLEKSIEWICZ et al., (2012).

1.5 Anticorpos monoclonais e o mercado biofarmacêutico

Os biofármacos que também são conhecidos como drogas biológicas, são produtos derivados de proteínas, ácidos nucleicos ou de organismos biológicos, que após processados, são usados para tratar ou prevenir doenças. Os mAbs, constituem a classe de proteínas terapêuticas mais estudada e utilizada atualmente, aprovados para o tratamento de uma variedade de doenças como hemoglobinúria paroxística noturna, câncer, esclerose múltipla, asma, doenças autoimunes, entre outras (MELLADO; CASTILHO, 2008; ECKER et al., 2015).

Dentre o grupo dos biofármacos, os anticorpos monoclonais foram os produtos mais vendidos em 2016. Existe um interesse particular nesta classe de biofármaco, devido à reduzida imunogenicidade aos pacientes e, também, em razão da sua alta especificidade. A venda de produtos biofarmacêuticos tende a aumentar nos próximos anos, esta tendência está diretamente ligada ao contínuo crescimento da venda de produtos de anticorpos monoclonais que atualmente, estão disponíveis no mercado e ao crescente número de publicações de possíveis produtos de anticorpos monoclonais que vem sendo desenvolvidos (HONG et al., 2017). A venda global de produtos biofarmacêuticos até 2014 gerou, aproximadamente, 300 bilhões de dólares e tem como estimativa a projeção de valor de 450 bilhões em 2019 (DELLOITE, 2016).

O ano de 1982 pode ser considerado um marco, pois foi nessa época em que houve a aprovação do primeiro produto biofarmacêutico (a Humulina; uma insulina humana recombinante da Eli Lilly, Indianapolis). Desde então, os números de aprovações começaram a crescer ao longo da década de 90, à medida que a indústria foi amadurecendo. Ainda na década de 90, o maior número de aprovação em medicamentos foi de anticorpos monoclonais perdurando este processo até a segunda década do Século XXI, com crescente prevalência de anticorpos humanizados sobre as formas quiméricas. A Figura 5 mostra as crescentes aprovações dos anticorpos monoclonais, ao longo dos períodos (WALSH, 2014).

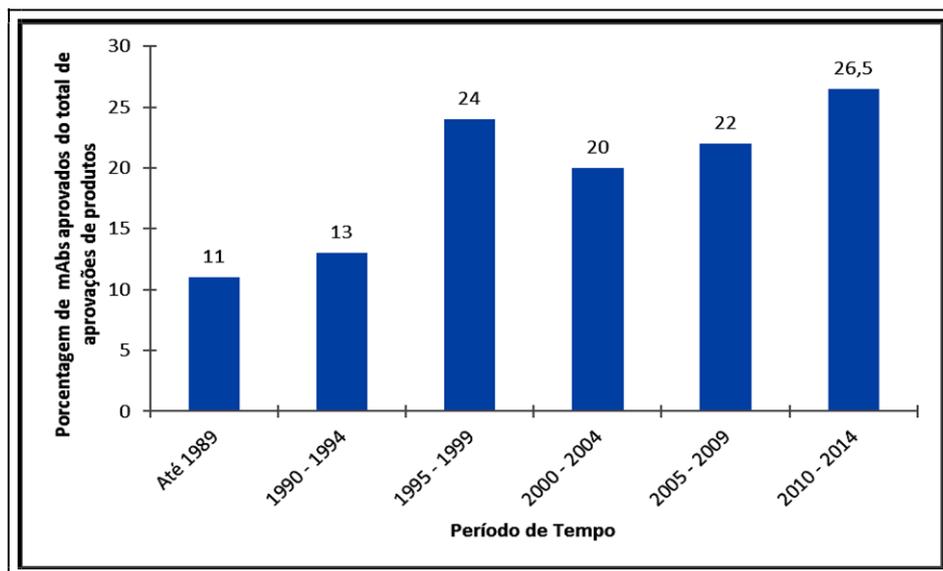


Figura 5- Anticorpos monoclonais aprovados dentro dos períodos indicados, expressos em porcentagem do total de aprovações de produtos biofarmacêuticos dentro do mesmo período. Adaptado de: WALSH, (2014).

A proporção de produtos, baseados em anticorpos monoclonais tem sido constante ao longo do tempo, é possível verificar que do total de produtos aprovados no período compreendido entre 2010 e 2014, 30% foi de anticorpos monoclonais (Figura 6).

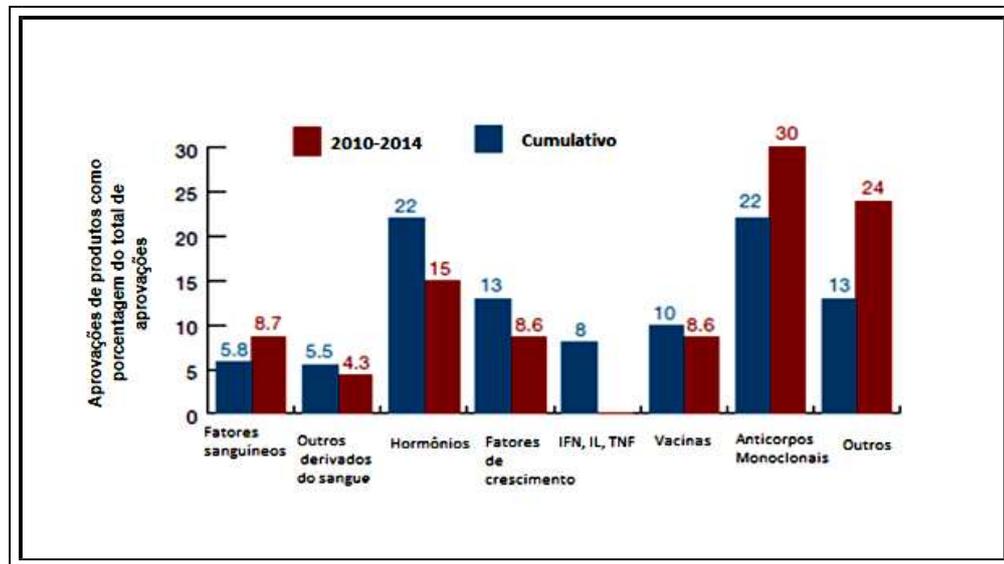


Figura 6 - Aprovações de produtos, cumulativas (1982-2014) e para o período atual (2010-julho 2014) no contexto da classe de produtos. Cada conjunto de dados é expresso como uma porcentagem do total de aprovações de produtos biofarmacêuticos para o período em questão. Adaptado de: WALSH, (2014).

Conforme o Anexo A sobre os anticorpos monoclonais aprovados pela Agência Europeia de Medicina (EMA) e *Food and Drug Administration* (FDA), em 2017, para uso terapêutico, desde o primeiro produto inserido no mercado em 1986 com o OKT 3 (Muromomab) utilizado para rejeição de transplante, até o mais atual produto disponível no mercado, o Amjevita (Adalimumab), aprovado respectivamente, em 2016 e 2017, nos Estados Unidos e na União Europeia. Este último destinado ao tratamento das seguintes doenças: artrite; artrite reumatóide juvenil; artrite psoriática; colite reumatóide; doença de Crohn ulcerativa; psoríase e espondilite anquilosante. Destaca-se também no anexo A, a evolução do perfil dos produtos ao longo dos anos. Os primeiros anticorpos monoclonais eram originários de murinos, porém no decorrer dos anos, é possível notar um aumento na produção de mAbs totalmente humanos ou humanizados, usando para tal células de mamíferos.

Paralelamente estes dados corroboram positivamente, com recentes pesquisas que apontam a necessidade de redução no uso indiscriminado de drogas

antimicrobianas, em razão do aumento da resistência bacteriana. Um dos pilares projetados para redução da resistência antimicrobiana é a busca de terapias alternativas, a exemplo de vacinas e também de produtos inovadores como os anticorpos monoclonais (O'NEILL, 2016).

1.6 Sistemas de cultivo

Para realização da produção de biofármacos, dois sistemas de cultivo são bastante explorados: o cultivo em frascos e o cultivo de células em biorreatores. Os cultivos de células em frascos e em garrafas, geralmente são utilizados para expansão da linhagem celular como preparação do inóculo para cultivo em biorreatores ou para adaptação das células ao cultivo em suspensão. O biorreator é utilizado para aumentar a escala de cultivo e, por consequência, é empregado na produção, tanto experimental quanto industrial (VÉLIZ et al., 2008 apud MURAD, 2015).

1.6.1 Cultivos em pequena escala

Para se chegar a um processo de produção em escala industrial, faz-se necessário estudar e definir as condições de cultivo celular (modo de cultivo, tipo de cultivo e parâmetros de cultivo) mais adequadas em pequena escala e, posteriormente, realizar o aumento dessa escala (*scale-up*). O cultivo em pequena escala tem como objetivo assegurar a reprodutibilidade e consistência do processo. No cultivo em pequena escala, utilizam-se frascos agitados, frascos estacionários, garrafas *Roller*, Erlenmeyers etc. Nestes sistemas de cultivo, a transferência de O₂ ocorre através da difusão gás-líquido.

As manipulações das células ocorrem no interior de uma cabine de segurança biológica para manter a esterilidade do sistema e a manutenção de temperatura, O₂ e CO₂ e umidade torna-se possível através de uma incubadora, que condiciona o ambiente necessário para que haja o crescimento do cultivo. Para células que crescem em suspensão como a HEK-293, utiliza-se, também, *shakers* ou plataformas agitadoras, para os frascos em constante agitação e, portanto, as células em suspensão, o que permite homogeneizar o meio de cultivo e os nutrientes contidos, favorecendo também, a transferência de gases.

O cultivo em pequena escala tem as vantagens de paralização e redução de custos quando comparado com uma escala industrial, devido ao uso reduzido dos

constituintes dos meios.

Frascos de cultivos fabricados com materiais que impeçam a adesão celular e que apresentem formato que favoreçam a manutenção das células em suspensão, como os frascos agitados, garrafas rotatórias e frascos tipo *Spinner* são os mais indicados para obtenção de anticorpos em média escala, escalonamento de bioprocessos e realização de expansão celular (RODRIGUES et al., 2010 apud CORRÊA, 2015). A seguir serão relacionados os tipos de frascos mais comuns utilizados em escala de bancada.

1.6.1.1 Frasco *Roller*

Os frascos tipo *Roller*, são de forma cilíndrica, feitos de vidro ou plástico e usados tanto para células que dependem de ancoragem quanto para células em suspensão (Figura 7A). Os sistemas utilizados para células aderentes, também podem ser usados para o cultivo de células, desde que, sejam mantidos em constante agitação em suspensão. O cultivo é agitado de forma axial, formando uma fina camada de meio na superfície da garrafa, o frasco fica sob agitação rotatória em uma plataforma rotatória, a fim de evitar depósitos celulares (Figura 7B); possui um sistema de tubos em paralelo que permite a rotação da garrafa *Roller* de forma permanente, proporcionando uma completa homogeneização do conteúdo no interior do frasco, além disso, mantêm as células em suspensão. Os cultivos são mantidos em rotação no interior de uma estufa em condições adequadas de temperatura, umidade e oxigênio que permitam o crescimento celular (KUMAR et al., 2004).



Figura 7- (A) Plataforma para agitação de frascos do tipo Roller. Disponível em: (<https://www.ika.com/pt/Produtos-Lab-Eq/Agitadores-csp-179/ROLLER-10-basic-cpdt-4012000>). Acesso em: 25 maio 2018.

Fonte: IKA - Alemanha, 2018.

(B) Frascos *Roller* para cultivo de células. Disponível em: (<https://pt.vwr.com/store/product/2322126/rollerbolttes;jsessionid=S13vNk4Ure72pysKeATubHxY.estore1b>). Acesso em: 25 maio 2018.

Fonte: VWR – EUA, 2018. .

1.6.1.2 Frasco *Spinner*

A Figura 8 mostra o frasco *Spinner*, utilizado comumente para o cultivo de células em suspensão ou para células adaptadas para crescimento em suspensão, ou para células com aderência a microcarregadores, é confeccionado de vidro borosilicato, apresenta fixado em sua tampa um eixo em que na sua outra extremidade, possui uma barra magnética coberta de *teflon*, silicone ou vidro. A barra magnética, não deve encostar ao fundo do frasco, para evitar qualquer dano às células.

Nas laterais da parte superior do frasco, há duas aberturas com tampas rosqueáveis, que permitem a entrada de meio de cultura e a outra de saída e coleta de amostra. Também na parte superior, em alguns casos, são encontrados com uma tampa rosqueável com um filtro para que haja troca dos gases (O_2 e CO_2), em um ambiente controlado de estufa. Para manutenção da agitação constante das células em suspensão, o frasco deverá estar sobre um agitador magnético com velocidade controlada.



Figura 8 - Frasco *Spinner* para cultivo de células em suspensão.

Disponível em: http://www.lobov.com.br/representadas/bellco/produtos-descricao.php?id_produto=3.

Acesso: em 25 maio 2018.

Fonte: LOBOV Científica.

1.6.1.3 Biorreatores

O uso de cultura de células animais em larga escala tornou-se mais comum na década de 1980, devido ao avanço das tecnologias de ADN recombinante e de hibridomas. Com isso, cresceu a necessidade de aprimorar as tecnologias tradicionais que vinham sendo utilizadas. As características particulares das células animais, quando comparadas com microorganismos, se impuseram e passaram a

orientar os desenvolvimentos de estudos nessa área. A questão da sensibilidade das células às tensões de cisalhamento, por exemplo, passou a ser tratada com mais atenção (LIMA et al., 2002).

Como consequência prática desses estudos, foram desenvolvidos equipamentos visando o controle das condições ambientais (pH, temperatura, teor de oxigênio dissolvido etc.), surgindo assim, os biorreatores destinados ao cultivo de células animais (CHICO; RODRIGUES; FIGUEIREDO, 2008).

Os biorreatores utilizados para células animais podem ser classificados de diferentes formas. Uma das formas mais utilizadas é aquela que se refere à homogeneidade do sistema, conforme a figura 11. Todos os sistemas de cultivo são multifásicos, pois existem pelo menos duas fases: a sólida (formada por células) e a líquida (composta pelo meio de cultivo). São chamados de biorreatores homogêneos aqueles nos quais as células estão distribuídas uniformemente suspensas na fase líquida. Já os biorreatores heterogêneos são aqueles que não estão distribuídos uniformemente ao longo de todo volume do fluido (CHICO; RODRIGUES; FIGUEIREDO, 2008). Os biorreatores do tipo tanque agitado são utilizados para uma série de produtos imunobiológicos (LIMA et al., 2002). No geral esses biorreatores são muito semelhantes a fermentadores (submersos) para fins industriais, em forma de tanque nos quais empregam impelidores para promover a mistura. O escalonamento de tanques agitados pode chegar atualmente até 20.000L (CHICO; RODRIGUES; FIGUEIREDO, 2008).

Os biorreatores do tipo *air-lift* possuem um tubo central que injeta uma corrente gasosa gerando bolhas, produzindo uma recirculação vertical e ascendente no interior do equipamento. Tem como vantagens, a redução dos problemas de cisalhamento e uma maior eficiência na transferência de oxigênio se comparado com os tanques agitados. Na atualidade, tem seu uso limitado em razão da reduzida ampliação de escala até 5.000 L (CHICO; RODRIGUES; FIGUEIREDO, 2008).

Os biorreatores de ondas consistem de uma bolsa estéril, descartável de polietileno contendo portas para circulação de gases (mantendo a bolsa parcialmente inflada), inóculo, passagem de meio de cultivo, retirada de amostras e coleta de sobrenadante (obtenção do produto). A bolsa é parcialmente preenchida com o meio de cultivo e a sua parte superior fica preenchida de ar. O reator é mantido sobre uma plataforma de agitação, mantendo a mistura homogênea através de um movimento oscilante, gerando ondas (*waves*) que aumentam a superfície ar-

líquido. A agitação através de ondas permite, portanto, uma boa aeração sem o uso de bolhas, reduzindo o dano às células causado por estas (ZANNATA, 2009).

Como a maioria das células animais não é capaz de se multiplicar quando cultivadas em suspensão, houve a necessidade do desenvolvimento de biorreatores heterogêneos que apresentassem uma superfície sólida para adesão celular. São utilizados como suporte para crescimento celular em sistemas que podem ser constituídas de diferentes materiais. Em geral, as partículas que permitem crescimento celular na sua superfície são denominadas microcarregadores (BRUN-GRAEPPPI et al., 2011 apud CORRÊA, 2013). Já os biorreatores de leito empacotado, leito fluidizado e fibra-oca consistem em sistemas de alta densidade celular que possibilitam a imobilização das células sobre sua superfície (JAIN; KUMAR, 2008). Na produção em escala industrial os principais pontos que devem ser levados em consideração são: as características das células que estão sendo cultivada, a estabilidade para expressão do produto e a resistência às tensões de cisalhamento (VÉLIZ; RODRIGUES; CORDEIRO, 2008).

Classificação dos biorreatores com relação à homogeneidade do sistema	
<u>Homogêneos</u>	<u>Heterogêneos</u>
Biorreatores do tipo tanque agitado Biorreatores do tipo <i>air-lift</i> Biorreator de ondas	Sistemas de microcarreadores Biorreatores de leito empacotado Biorreatores de leito fluidizado Biorreatores de fibras ocas Biorreatores com crescimento sobre superfícies

Quadro 2 - Classificação dos Biorreatores de acordo com a homogeneidade do sistema.
Fonte: Adaptado de CASTILHO; MEDRONHO, 2002.

1.6.2 Modos de Operação

Devem ser avaliados diversos fatores na escolha do modo de operação mais adequado para produção em biorreatores. Em escala industrial os principais pontos que devem ser levados em consideração são: as características das células que estão sendo cultivada, estabilidade para expressão do produto e a resistência as tensões de cisalhamento (VÉLIZ; RODRIGUES; CORDEIRO, 2008). Um dos interesses centrais no estudo do cultivo celular é, sem dúvida, a otimização da produção da proteína de interesse. Desta forma, atua-se visando o desenvolvimento de linhagens celulares que apresentam bom crescimento e produtividade, a maximização da produtividade da linhagem celular, a minimização dos metabólitos tóxicos e controles das condições de desenvolvimento do cultivo são questões cruciais para obter um bom êxito no trabalho (ZHANG et al., 2004). Os modos de operação mais comumente utilizados são: cultivo em batelada, cultivo em batelada alimentada, cultivo contínuo e cultivo em perfusão.

O principal diferencial entre os modos de operação está relacionado ao meio de cultura, com a substituição ou não do meio de cultura fresco, a coleta ou não do sobrenadante que contém o produto de interesse com a posterior alimentação de meio de cultivo. A Figura 9 abaixo ilustra os modos de operação.

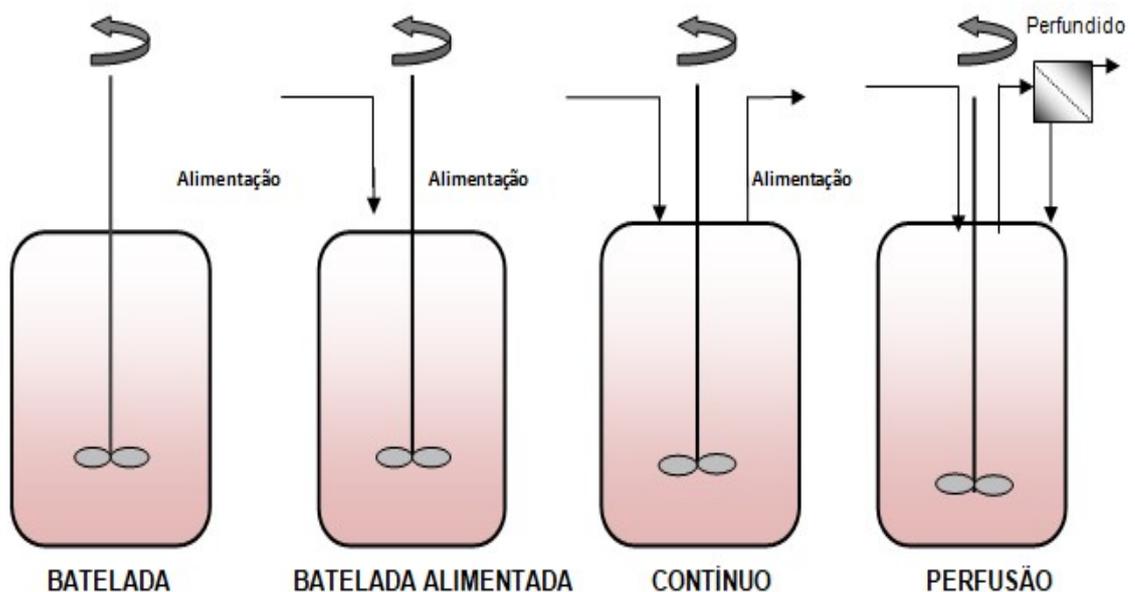


Figura 9 - Os diversos modos de operação no cultivo de células animais.
Fonte: Adaptado de CASTILHO; MEDRONHO, 2002.

1.6.2.1 Cultivos em batelada

A batelada é um modo de operação, no qual ocorre o crescimento da população celular em um vaso fechado, sem qualquer suplemento adicional de substrato após a inoculação das células. Enquanto o substrato é metabolizado, a população celular cresce, formando o produto de interesse e demais metabólitos (MORAES et al., 2008).

Devido ao esgotamento dos nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos para as células, o cultivo entra em uma etapa de morte celular, porém, o volume é mantido constante ao longo de todo o processo enquanto, o perfil metabólico não (MORAES et al., 2008).

A estratégia de produção no modo batelada é de simples execução e amplamente empregada nos cultivos. É utilizada em frascos agitados (Erlenmeyers e Spinner) e ainda em biorreatores, variando a escala de pequena a intermediária para propagação de inóculo e, também, em escala industrial. Em caso de propagação de inóculo o cultivo é cessado quando as células atingem a fase exponencial de crescimento, que promove uma alta concentração de biomassa, multiplicando-se, com velocidade máxima. Dessa maneira, garantindo que estas células, quando inoculadas em biorreatores de altos volumes, tenham uma mínima fase de adaptação e, assim, reduzindo o período de improdutividade (VÉLIZ; RODRIGUES; CORDEIRO, 2008).

Apesar da facilidade do ponto de vista operacional, o modo de produção em batelada tem como aspecto, a baixa produtividade volumétrica, que está diretamente relacionado ao fato de que o cultivo celular não consegue atingir altas concentrações em razão do consumo dos nutrientes, uma vez que a entrada do substrato só ocorre uma única vez, ou seja, na etapa inicial do cultivo. Consequentemente, levando a um baixo rendimento do produto final (CHICO; RODRIGUES; FIGUEIREDO, 2008; KUYSTERMANS; AL-RUBEAI, 2011).

1.6.2.2 Cultivo em batelada alimentada

A diferença do cultivo em batelada alimentada em relação à batelada reside no fato de que, no modo alimentado, se administra um ou mais nutrientes durante o cultivo, para repor aqueles consumidos pelas células. O cultivo se inicia com um volume inferior (40% - 60%) do volume máximo de trabalho do equipamento para

que, dessa maneira, seja possível receber adições de nutrientes que em geral, são realizadas na forma de soluções concentradas destes compostos. Nos cultivos de batelada alimentada, a produtividade é geralmente limitada pelo forte acúmulo de metabólitos tóxicos, que podem inibir o crescimento, afetar a viabilidade e a produção celular. Entre os metabólitos mais tóxicos estão o lactato e a amônia (CHICO; RODRIGUES; FIGUEIREDO, 2008).

Quando as células atingem a fase exponencial decrescimento e os nutrientes são consumidos mais rapidamente, inicia-se a fase de alimentação, que pode ser com o meio basal mais concentrado ou com um meio contendo os nutrientes mais consumidos em maior concentração (meio fortificado) ou consuplementos (*cocktails*), contendo apenas os nutrientes mais consumidos, como a glicose, a glutamina e os aminoácidos em alta concentração. Como consequência, há o prolongamento das fases exponencial e estacionária do processo, o que garante a obtenção de maiores concentrações de células viáveis e de concentrações de produto superiores em relação à batelada (BIBILA; ROBINSON, 1995; WLASCHIN; HU, 2006 apud BETTINARDI, 2016).

O regime de alimentação pode ser realizado de forma contínua ou intermitente, de acordo com diferentes estratégias que levem em consideração a composição do meio de alimentação e a condição fisiológica das células. O uso do meio basal concentrado pode ser adotado como uma estratégia inicial de alimentação, por ser uma maneira mais simples e rápida de se estabelecer o processo de batelada alimentada (BIBILA; ROBINSON, 1995 apud BETTINARDI, 2016).

Outra possibilidade, mais laboriosa, é a determinação da concentração residual dos nutrientes no meio (conhecida como *spent medium analysis*) que permite corrigir a taxa e a composição da alimentação de forma interativa, refinando o processo de acordo com as características de produção da linhagem ao longo do processo (BIBILA; ROBINSON, 1995 apud BETTINARDI, 2016).

A alimentação dos nutrientes ao longo do procedimento permite incrementar a quantidade total de nutrientes utilizados pelas células, o que resulta em maiores concentrações de células e, também, do produto formado. A característica mais relevante da batelada alimentada é o fato de que, ainda que a sua operação quando comparada à batelada seja levemente mais complexa, possui um aumento significativo em sua produtividade (CHICO; RODRIGUES; FIGUEIREDO, 2008).

1.6.2.3 Cultivos em Perfusão

A perfusão é um modo de produção contínuo, neste sistema operacional é possível solucionar a maior limitação do sistema descontínuo, que é a reduzida produtividade decorrente da perda de células na saída do biorreator. O cultivo contínuo é, principalmente, utilizado em atividades de pesquisa e desenvolvimento de processo em pequena escala. Na perfusão, ocorre a constante adição de meio de cultivo fresco e remoção de meio cultivado contendo as células; ambas as operações acontecendo à mesma vazão, de tal forma que se mantém um volume constante no reator (CHICO; RODRIGUES; FIGUEIREDO, 2008).

Durante o processo de perfusão, células são retidas do interior do frasco, mediante uso de dispositivo de retenção celular interno, no caso de uso de dispositivo de retenção celular externo ou retornado para o biorreator. O sistema de fluxo de injeção constante de meio de cultura fresco, seguida de uma pequena e controlada remoção das células, proporciona um ambiente estável as células, com impactos positivos ao metabolismo celular e a qualidade do produto secretado.

A perfusão permite a condução por um longo período de tempo de um cultivo com alta concentração celular, caracterizado por uma corrente de saída de perfundido de elevada vazão e alta concentração do produto. Este método apresenta como vantagem o fato de que o tempo de residência do produto no sistema reacional é menor do que nos outros modos de operação e maiores concentrações do produto podem ser obtidas com biorreatores de menores volumes (MERCILLE et al., 2000; RYLL et al., 2000; VOISARD et al., 2003; JAIN; KUMAR, 2008, CHICO; RODRIGUES; FIGUEIREDO, 2008 apud ZANATTA, 2009).

Operacionalmente a perfusão é mais complexo quando comparado com os demais modos de cultivo (batelada e batelada alimentada) e apresenta também um maior risco de contaminação ao cultivo, em razão das correntes de entrada, porém tem como vantagem a maior produtividade volumétrica. Outra vantagem é a redução de tempo do produto no interior do biorreator, o que é positivo quando se está trabalhando com proteínas lábeis.

No modo de produção em semi-perfusão o meio de cultura é adicionado ao biorreator de forma contínua, isto é vantajoso, pois as células estão em um meio de cultura com reposição constante dos nutrientes. Simultaneamente a esta etapa, ocorre a retirada do sobrenadante do cultivo com a proteína de interesse que foi

secretada, ao mesmo tempo que, os metabólitos tóxicos celulares são removidos, para que não se acumulem no meio onde estão sendo cultivadas as células. No biorreator que opera sob o modo de produção em perfusão, há um dispositivo de retenção que possibilita o retorno das células ao cultivo.

A semi-perfusão, é assim denominada em razão de sua similaridade ao modo de produção em perfusão, com a diferença de que na semi-perfusão não há uma alimentação contínua de meio de cultivo e, sim, uma reposição periódica. A adição do meio de cultivo ocorre de forma descontínua, ou seja, em um período determinado ocorre a troca do meio.

1.7 A resistência antimicrobiana e a urgência de terapias alternativas

A resistência microbiana tem sido descrita como uma das principais ameaças do século XXI e desencadeou preocupações sobre a possibilidade de uma era pós-antibióticos, em que muitas infecções não serão tratáveis (LITTMAN et al., 2018). Se não houver soluções pró-ativas neste momento para diminuir a crescente resistência aos medicamentos antimicrobianos, estima-se que até 2050, dez milhões de pessoas morrerão por ano devido ao aumento da resistência das infecções às drogas. Atualmente, 700 mil pessoas morrem de infecções resistentes todos os anos (O'NEILL, 2016).

A resistência a antimicrobianos caracteriza-se pela sobrevivência de microrganismos que causam a infecção (por exemplo, bactérias) quando expostos a um medicamento que, normalmente, é capaz de matá-los. Isso permite que sejam capazes de sobreviver à exposição de uma determinada droga, devido à falta de concorrência de outras cepas (O'NEILL, 2016). Os antimicrobianos pertencem a classe de medicamentos mais prescritos mundialmente. São utilizados com o objetivo de inibir ou combater o crescimento de determinados organismos, porém muitas vezes são indicados sem necessidade ou com imprecisão, facilitando assim, o desenvolvimento da resistência microbiana e, conseqüentemente, impedindo a ação de outros medicamentos (KADOSAKI et al., 2012 apud VIEIRA, 2017).

Estudos têm demonstrado que o uso indiscriminado de antibióticos em hospitais tem sido inapropriado (DEL FIOLE et al., 2010 apud VIEIRA, 2010). Este tipo de conduta tem levado ao surgimento de superbactérias, como MRSA e casos de tuberculose extremamente resistente (XDR-TB), bactérias que são difíceis ou impossíveis de tratar com os medicamentos existentes (KADOSAKI et al., 2012 apud

VIEIRA, 2017).

Torna-se necessário que novos sistemas terapêuticos sejam adotados, visando controlar as infecções causadas por estes patógenos. Assim, a imunoterapia ativa e passiva parece ser uma opção promissora (SENNA et al., 2015).

1.8 Anticorpos monoclonais murinos anti-PBP2a de MRSA

A Figura 10, mostra a bactéria MRSA uma das principais responsáveis pelas infecções nosocomiais, e apresentam uma taxa de alta mortalidade, aproximadamente, 35% (SENNA et al., 2015).

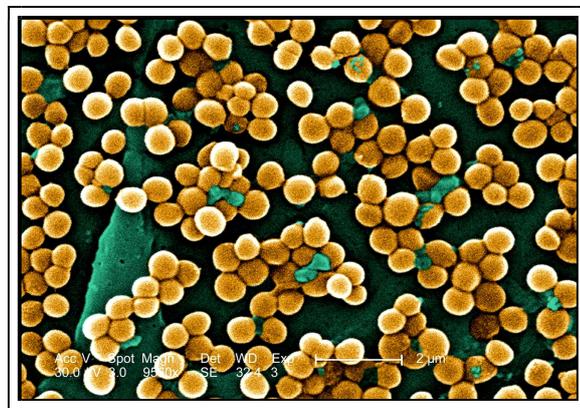


Figura 10- Morfologia do *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Fonte: Live Science. Disponível em:

<<https://img.purch.com/h/1000/aHR0cDovL3d3dy5saXZlc2NpZW5jZS5jb20vaW1hZ2VzL2kvMDAwLzAyNi82NjYvb3JpZ2luYWwvTVJTQS5qcGc=>>. Acesso em: 25maio 2018

Esta bactéria possui o gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina com baixa afinidade aos beta-lactâmicos (PBP), conferindo resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos. Além disso, este patógeno é resistente a várias classes de antimicrobianos, sendo sensível apenas a glicopeptídeos. A PBP2a é uma PBP multimodular de classe B (proteína de ligação à penicilina) (GOFFIN; GHUYSEN, 1998), localizada na membrana de todas as cepas de MRSA e, portanto, acessível ao sistema imune do hospedeiro (SENNA et al., 2015). A baixa disponibilidade de opções terapêuticas de tratamento de infecções causadas por MRSA faz com que o desenvolvimento de estratégias alternativas seja considerado de alta relevância.

Um anticorpo monoclonal específico contra MRSA anti-PBP2a foi obtido por Bio-Manguinhos/FioCruz, usando a tecnologia do hibridoma. Este anticorpo monoclonal é capaz de reconhecer PBP2a de cepas de MRSA e pode ser utilizado

para fabricação de *kits* de diagnóstico. Além disso, uma vez devidamente humanizado, poderá vir a ser usado como agente terapêutico nas infecções contra MRSA (CORRÊA et al., 2016).

1.9 Sistemas de expressão transiente associado a uma leve hipotermia em células HEK-293

O desenvolvimento de um processo de produção *in vitro* de um anticorpo monoclonal exige a seleção e o estudo de um sistema de expressão, de um bioprocesso que viabilize a secreção da proteína de interesse, de técnicas de purificação, de concentração de produto e de métodos analíticos para determinação da pureza final (TAMASHIRO; AUGUSTO, 2008 apud BETTINARDI, 2016).

A elaboração de uma plataforma de produção baseada em células animais inicia-se com o desenvolvimento e a seleção das linhagens recombinantes altamente produtivas, seguida pela otimização do processo e do meio de cultivo em sistemas de pequena escala, em frascos agitados como: *Spinner*, *Roller* e Erlenmeyers.

As condições mais promissoras são testadas em biorreatores de bancada, que são equipamentos que permitem o monitoramento e controle de parâmetros como pH, temperatura, aeração e agitação. O escalonamento do processo é, então, avaliado utilizando-se biorreatores de maiores volumes. Durante esta etapa, em geral, busca-se cumprir os requisitos das boas práticas de fabricação e a demanda de material para os ensaios pré-clínicos (GAUGHAN, 2016 apud BETTINARDI, 2016).

A expressão transiente requer a introdução das sequências gênicas, específicas que irão expressar a proteína de interesse. No caso do anticorpo monoclonal, correspondem as sequências da cadeia leve e cadeia pesada. A expressão da proteína de interesse será apenas temporária, pois não há incorporação da sequência gênica no ADN do genoma da célula hospedeira. Preferencialmente, o uso de células hospedeiras de mamíferos vem se destacando em razão de sua capacidade de realizar corretamente a etapa pós traducional e fazer o enovelamento correto das proteínas (ABBOT et al., 2015).

Dentre as diversas linhagens celulares utilizadas para uma expressão transiente, destaca-se a HEK-293 que é uma linhagem celular humana estabelecida e mais comumente usada para realização de expressão transitória. Estas células

são utilizadas como um sistema de expressão muito popular para produzir proteínas recombinantes. Podem ser usadas intactas ou em fragmentos lipídicos para estudar as relações de estrutura e de função de propriedades farmacológicas das proteínas da membrana que são expressas nas células (LIN et al., 2015).

A linhagem celular HEK-293 foi desenvolvida há mais de 30 anos, por transformação de células renais embrionárias humanas. Estas apresentam algumas vantagens como à elevada transfectabilidade de plasmídeos, traduzem fielmente, além de um excelente processamento da proteína, facilidade de adaptação e crescimento em suspensão em condições sem soro (BALDI et al., 2017). Existem diversas técnicas para introdução do ADN exógeno (sequência a ser expressa) na célula hospedeira.

A transfecção tem se mostrado bastante eficaz como forma de incorporação do ADN para produção da proteína de interesse. Dentre as técnicas destacam-se: a lipofecção, eletroporação e co-precipitação com fosfato de cálcio (MORAES et al., 2008).

A transfecção transiente mesmo sendo uma forma eficiente para introdução de ADN exógeno, historicamente tem sofrido muitas vezes com os baixos rendimentos em comparação com métodos em que o gene é integrado ao genoma de maneira estável (LIN et al., 2015).

Para tanto, é possível aumentar a eficiência na expressão de uma proteína em uma cultura transiente, através da modificação da condição de cultivo. Como por exemplo, alterando o meio ou a temperatura em que se encontra. Tradicionalmente os cultivos de células animais são mantidos na temperatura de 37 °C e, neste caso, não é diferente para as células HEK-293 (CORONEL et al., 2016).

Na literatura são descritas pesquisas do cultivo destas células em condições de leve hipotermia (30 °C – 35 °C), que pode levar ao aumento da competência de expressão da proteína desejada. Reduzir a temperatura do cultivo pós-transfecção pode ser benéfico, pois diminui o processo de divisão ou replicação celular (crescimento celular), e favorece o processo de síntese de proteínas. Nesse contexto a redução da temperatura a uma faixa a partir de 37 °C é conhecida por retardar a taxa de crescimento celular. Estudos sugerem que o efeito da baixa temperatura na expressão da proteína é específico para cada tipo celular e a expressão da proteína está ligada à parada de crescimento induzida pelo frio na fase S ou G₁ do ciclo de replicação do ADN (LIN et al., 2015).

Recentemente, Shimizu et al., (2018), relataram uma metodologia eficiente para produção de anticorpos monoclonais de coelho, utilizando a expressão transiente de células HEK-293, em condições de indução a hipotermia combinada a técnica de cromatografia de troca iônica, resultando em uma melhora na especificidade e na qualidade destes anticorpos.

Em trabalho desenvolvido por Lin et al., (2015), demonstrou-se que, as células HEK-293 normalmente cultivadas a 37 °C, quando induzidas a uma condição hipotérmica de 33 °C aumentaram em, aproximadamente, 1,5 vezes a produtividade celular de proteínas recombinantes.

No presente trabalho, os experimentos foram conduzidos utilizando as células HEK-293, de um kit comercial Expi 293F™ *Expression System Kit* (Thermofisher).

O *kit* Expi 293™ é um sistema de expressão transiente para a produção de proteínas com alto rendimento, utilizando células de mamífero. Baseia-se na cultura de alta densidade de células Expi 293F™ em meio de expressão Expi 293™. Na expressão transitória precisa ser realizado a introdução do ADN na célula, a inserção do gene ocorre com o reagente de transfecção ExpiFectamine™ 293 utilizando lipídios catiônicos em combinação com agentes potenciadores (*enhancers* 1 e 2). O sistema Expi 293™ é composto por: Células EXPI 293F™ criopreservadas, meio de expressão Expi 293™ ExpiFectamine™ 293 para transfecção e meio de cultura livre de soro Opti-MEM®.

2.0 Justificativa

O trabalho desenvolvido tem caráter experimental e busca a otimização da produtividade do anticorpo monoclonal de interesse em sistema de expressão transiente. Conhecer e compreender a produção do anticorpo monoclonal de MRSA utilizando os diferentes modos de operação, sistemas de cultivo além e temperaturas (37 °C e 34 °C). Avaliando através dos ensaios realizados e caracterizações físico-químicas o modelo capaz de aumentar a produtividade volumétrica dos anticorpos monoclonais de MRSA anti-PBP2a e por meio da consolidação dos dados utilizar este conhecimento para prospecção e aplicações futuras em biorreatores industriais, produção de Kits e diagnósticos nas áreas produtivas de Bio-Manguinhos.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho consiste em procurar uma melhora da expressão volumétrica dos anticorpos monoclonais recombinantes específicos para enzima PBP2a de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) através da avaliação de diferentes sistemas de cultivo.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a produtividade volumétrica dos cultivos, testando diferentes sistemas de expressão em Erlenmeyers, *Roller* e *Spinner*.
- 2) Avaliar a produtividade volumétrica dos cultivos testando os modos de produção/operação, em batelada e semi-perfusão.
- 3) Avaliar a produtividade volumétrica dos cultivos, testando diferentes temperaturas de produção, como 37 °C (condição usual) e 34 °C (indução a uma leve hipotermia).
- 4) Confirmar a qualidade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a obtido nas diferentes condições, mediante a caracterização físico-química e funcional.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Construções de cadeias leves e pesadas do anticorpo monoclonal

As construções das cadeias leves e pesadas (figura 11) foram realizadas pela clonagem dos insertosem vetores pCDNA3 (*Thermo Fischer Scientific* - EUA) utilizando as enzimas de restrição Hind III e XbaI (Figura 12). Os clones sequenciados foram estocados e armazenados no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER/Bio Manguinhos).

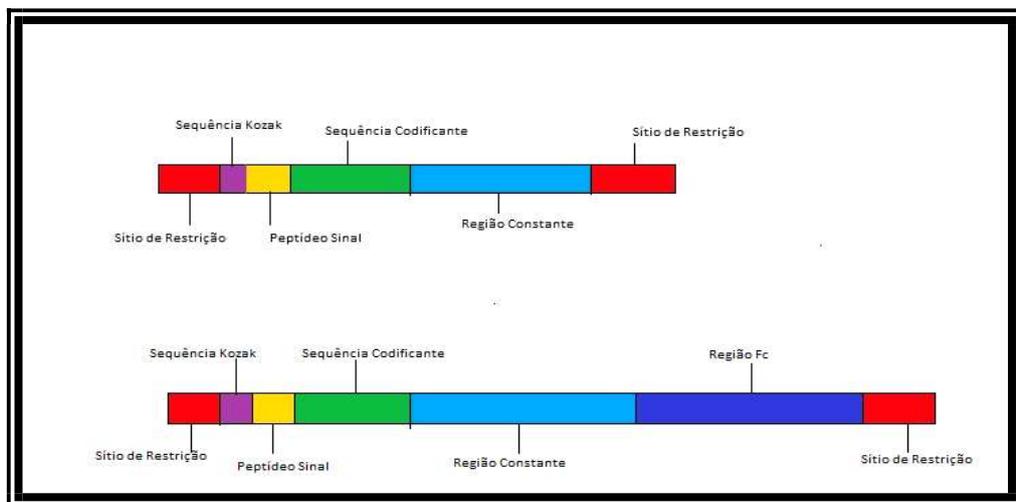


Figura 11– Esquemas representativos das construções das cadeias leves (acima) e das cadeias pesadas (abaixo) do anticorpo monoclonal anti-MRSA.

Fonte: Tese de dissertação de mestrado de Ana Caroline Cavalcante de Araújo (MPTI-BioManguinhos)

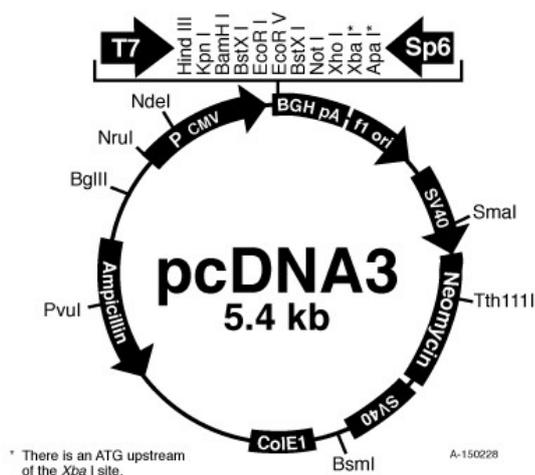


Figura 12 – Desenho representativo do vetor pcDNA3. Fonte: Research gate. Disponível em: <https://www.researchgate.net/figure/Map-of-pcDNA30-mammalian-expression-vector-of-about-54-kb_fig4_279977088>. Acesso em: 15 de novembro de 2018.

4.2 Linhagem celular HEK-293

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizadas células HEK-293 do sistema de *kit* de expressão Expi 293™ (*Thermo Fisher Scientific* - EUA). Estas células têm como características o crescimento em suspensão, com um tempo de duplicação em torno de 24 horas. De acordo com a informação do fabricante do *kit*, o tempo de duplicação pode variar de acordo com a célula, número de passagens e manipulação. Após o descongelamento, estas células devem ter viabilidade acima de 95%, para tanto, faz-se necessário o monitoramento durante o período de 3 a 4 dias para garantir que as células não estejam comprometidas.

O armazenamento das células HEK-293 banco de células utilizado está localizado em um recipiente criogênico no Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (LATAM), em Biomanguinhos – FioCruz (Rio de Janeiro/RJ).

4.3 Meios de Cultivo

Para o cultivo das células HEK-293, empregou-se o meio comercial de expressão Expi 293™, que compõe o sistema de *kit* de expressão Expi 293™ (*Gibco/ThermoFisher*). O frasco contém 1L de meio de cultura, que deve ser armazenado em condições de temperatura entre 2 °C e 8 °C. É um meio quimicamente definido, livre de soro, livre de componentes de origem animal e formulado especificamente para o crescimento de altas quantidades de células em suspensão, utilizadas para transfecção seguindo a recomendação do fabricante (Guia do usuário do Kit Expi 293™ - Disponível no suporte *online Thermo Fisher Scientific*- EUA).

4.4 Reagentes para transfecção

Para a etapa de crescimento e transfecção das células HEK-293 foram utilizados os seguintes reagentes do *kit* de transfecção Expi 293™.

- ✓ Expefectamine™293: trata-se de um reagente com propriedade catiônica baseado nas propriedades lipídicas para transfecção de ADN em células eucarióticas;
- ✓ *Enhancer 1* e *Enhancer 2*: são reagentes, utilizados 20 h após o procedimento de transfecção. Tem por objetivo potencializar a incorporação dos vetores que levam o trecho do gene de cadeia leve e cadeia pesada;

- ✓ Optimem® I Reduced - *Serum Medium*: meio utilizado para diluição do ADN que traz a sequência para expressão nas células HEK-293.

4.5 Sistemas de cultivo

No desenvolvimento dos experimentos, foram utilizados os seguintes frascos: frascos *Spinner*, frascos do tipo *Roller* e Erlenmeyers, com o intuito de avaliar os diferentes sistemas de cultivo.

Erlenmeyers

Foram utilizados frascos estéreis de 125 mL, confeccionados em policarbonato da marca Corning (EUA), com sistema de ventilação na tampa e graduação. Os Erlenmeyers foram submetidos à agitação rotacional constante, através de um agitador (*shaker*) a 125 rotações por minuto (RPM), no interior de uma incubadora de CO₂ a 8% em condições necessárias para que as células HEK-293 secretassem o anticorpo monoclonal de interesse.

Frascos *Spinner*

Foram utilizados frascos estéreis de 250 mL, confeccionados em borosilicato. Os frascos *Spinner*, são dotados de um pêndulo na parte superior da tampa, que permite em conjunto com o agitador magnético manter a homogeneidade do cultivo. As células HEK-293 transfectadas foram submetidas à agitação constante em velocidade de 60 RPM em agitador magnético no interior de uma incubadora de CO₂ a 8%, para manutenção das condições favoráveis de cultivo.

Frasco *Roller*

Frascos com volume de 1L confeccionados em polipropileno, estéreis, sistema de ventilação na tampa e graduado da marca Corning (EUA). Foi empregado para cultivo das células HEK-293 transfectadas, sob constante agitação em uma plataforma rotatória a 10 RPM no interior de uma incubadora de CO₂ a 8%, em um ambiente controlado para secreção do anticorpo monoclonal de interesse.

4.6 Análises de viabilidade e celularidade

Para avaliar a viabilidade e o crescimento nas células HEK-293 foram realizadas contagens em câmara de Neubauer (Figura 13 A). Em um microtubo com

auxílio de uma micropipeta automática adicionou-se 20µl da amostra com as células e, posteriormente, acrescentando 80µl do corante vital azul de Trypan, que foi homogeneizado suavemente.

Desta mistura inicial uma alíquota de 10µl foi retirada e colocada na câmara de Neubauer. A contagem de concentração das células foi realizada na área correspondente aos quatro quadrantes localizados nas extremidades da câmara de Neubauer, conforme demonstrado na Figura 13 B. Em seguida, o valor encontrado multiplicado pelo fator de diluição e pelo fator de diluição da câmara de Neubauer, 10^4 .

A contagem em câmara de Neubauer com o corante azul de Trypan é uma técnica de exclusão, pois é possível identificar e distinguir após a “varredura” nos campos as células vivas das células mortas.

Nas células mortas, em razão de sua membrana celular não seletiva, o corante azul de Trypan consegue penetrar em sua membrana, corando-as. Ao passo que as células vivas, por estarem com a membrana íntegra, aparecem ao microscópio óptico com a coloração clara e reluzente. A Figura 13 (A e B) ilustram uma câmara de Neubauer e seus componentes.

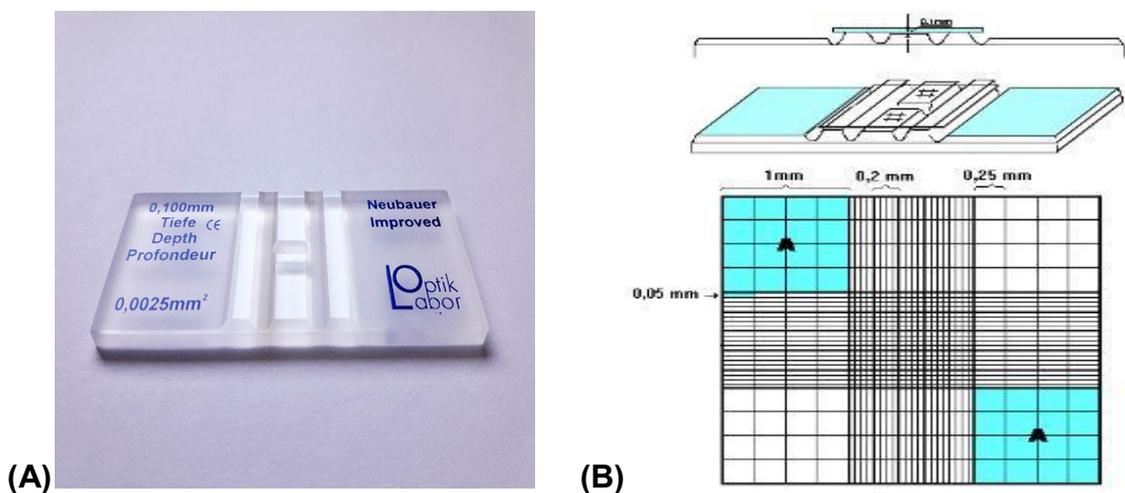


Figura 13- (A) Câmara de Neubauer para contagem das células. Disponível em: <http://www.splab.com.br/produtos/camaras-de-contagem/camara-de-neubauer>. Acesso em: 25 maio 2018.

Fonte: SPALAB, 2018

(B) Quadrantes da Câmara de Neubauer.

Fonte: site Biomedicina Padrão, 2018. Disponível

em: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2013/10/conhecendo-camara-de-neubauer.html>. Acesso em: 25 maio 2018.

4.7 Descongelamento das células

O descongelamento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, como exposto a seguir na Figura 14 a partir das células estocadas em nitrogênio líquido, um criotubo foi retirado e descongelado rapidamente por imersão em banho-maria a 37 °C. Na etapa seguinte, o criotubo foi para o interior da cabine de segurança biológica onde foi assepticamente ressuspendido com auxílio de uma micropipeta com volume de 3 mL do meio Expi 293™. Sendo em seguida, transferido para um tubo cônico tipo Falcon de 50 mL e o volume final foi completado para 30 mL. Posteriormente uma pequena alíquota foi retirada, repassada para um microtubo e foi realizada a contagem para verificação da viabilidade celular em câmara de Neubauer.

4.8 Expansão das células

Após o descongelamento e contagem para verificação da concentração e viabilidade inicial, o cultivo foi mantido em um Erlenmeyer de 125 mL com um volume de 30 mL, sob constante agitação de um agitador no interior de uma incubadora a 37 °C em uma atmosfera de CO₂ a 8%. Foi acompanhado o cultivo por um período de 3 a 4 dias, verificando a cada 24 horas o número de células vivas, células mortas e a viabilidade através da contagem pelo método de exclusão com azul de Trypan em câmara de Neubauer através do microscópio óptico.

Na contagem inicial logo após o processo de descongelamento foi utilizado a concentração inicial de 1×10^6 células por mL. Para realização do processo de expansão das células é desejável que a viabilidade esteja acima de 90%. A Figura 14 a seguir, descreve o procedimento de descongelamento e expansão das células.

4.9 Transfecção das células HEK-293

4.9.1 Transfecção das células HEK-293 em Erlenmeyers

Após a expansão das células no período que ocorreu entre três e quatro dias, foi realizado em triplicata, a transfecção das células HEK-293 em Erlenmeyer em triplicata. Para esta etapa de produção, fez-se necessário uma concentração total de 25×10^6 células por Erlenmeyer. Nesta etapa seguiram-se os passos, conforme a Figura 14.

Foi realizado a ressuspensão de 75×10^6 células totais viáveis em um volume de 25,5 ml através do meio de expressão Expi 293TM. Em um microtubo à parte, diluiu-se 30 µg (15 µg de cadeia leve e 15 µg de cadeia pesada) de ADN plasmidial em meio Opti-MEM reduzido de soro I a um volume total de 1,5 mL e reservado.

Na próxima etapa, diluiu-se 81 µL de Expifectamina em 1,5 mL do MEM e homogeneizado com auxílio de uma pipeta e foi aguardado por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado o complexo de ADN à solução de Expifectamina, este ficando incubado por 20 minutos em temperatura ambiente para formar o complexo ADN-ExpiFectamina.

Ao fim dos 20 minutos, a mistura de ADN e expifectamina foi adicionada aos Erlenmeyers com as células e a cada Erlenmeyer foi adicionado o volume de 3 mL, perfazendo um volume final de 28,5 mL.

O Erlenmeyer foi incubado a 37 °C em uma atmosfera de CO₂ a 8% e após o período entre 16 -18 h após a transfecção foi adicionado a cada Erlenmeyer 150 µL do *Enhancer 1* e 1,5 mL do *Enhancer 2*, perfazendo um volume final de 30mL.

4.9.2 Transfecção de células HEK-293 em frascos tipo *Spinner* e *Roller*

Os experimentos a seguir foram realizados em triplicata, após a expansão das células entre três e quatro dias, período necessário para que as células atingissem a concentração suficiente para realizar a transfecção (225×10^6 células por frasco). As etapas a seguir (Figura 15) descrevem a transfecção em frascos *Roller* e *Spinner*.

Inicialmente foi realizado a ressuspensão de 675×10^6 células totais viáveis em um volume de 229,5 mL Expi 293TM meio de expressão Expi 293TM. Em um microtubo a parte, foi diluído 138,2 µL de cadeia leve e 276,5 µL de cadeia pesada de ADN plasmidial em meio Opti-MEM reduzido de soro I a um volume total de 27,2 mL e reservado.

Na próxima etapa, foram diluídos 1,493 ml de Expifectamina em 26,2 mL do Opti-MEM e homogeneizado com auxílio de uma pipeta por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado o complexo de ADN à solução de Expifectamina, este ficando incubado durante 20 minutos em temperatura ambiente,

para formar o complexo ADN-ExpiFectamina, ao final de 20 minutos, adicionou-se as células a mistura de ADN e Expifectamina.

Para cada tipo de frasco *Spinner* ou *Roller* foi adicionado o volume de 3 mL. Perfazendo um volume final de 85,5 mL.

Após as transfecções os frascos do tipo *Spinner* ou *Roller*, foram colocados em agitação de 60 RPM em agitador magnético e 10 RPM na plataforma giratória, respectivamente. Os frascos ficaram no interior de uma estufa de CO₂ a 8% com temperatura de 37 °C. Ao término do período entre 16h-18h após a transfecção adicionou-se em cada Erlenmeyer 150 µl do *Enhancer 1* e 1,5 mL do *Enhancer 2*, perfazendo um volume final de 90 mL.

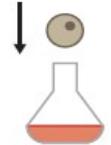
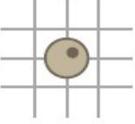
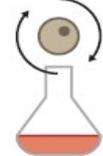
CRONOGRAMA	ETAPAS	DETALHES DO PROCEDIMENTO		
1 	Descongelamento das células	Descongelar rapidamente as células em um banho-maria, descontaminar o criotubo com álcool 70%, e em seguida abrir o criotubo em uma cabine de segurança biológica classe II.		
2 	Adição das células ao meio Expi 293™	Ressuspender as células em 3 mL de meio Expi 293 (pré-aquecido), homogeneizar gentilmente. Em seguida, adicionar as células em 30 mL de meio pré-aquecido a 37 °C em frasco de 125 mL.		
3 	Contagem das células e determinação da viabilidade	Utilizando a câmara de Neubauer realizar a contagem das células e determinar a sua viabilidade, imediatamente, após o descongelamento, através do método de exclusão com azul de Trypan ou contador automatizado. A viabilidade celular deve estar acima de 90%.		
4 	Incubação	Temperatura 37 °C	Umidade atmosférica 8% de CO ₂	Agitação em plataforma orbital a 125 RPM
5 	Subcultura de células	Primeira passagem: Quando a densidade celular atinge > 1 × 10 ⁶ células / mL com a viabilidade maior ou igual a 90% (tipicamente 2-4 dias pós-descongelamento), células em divisão para concentração de 0,3 × 10 ⁶ células / mL em meio Expi293™. Passagens subseqüentes: a cada 3-4 dias, as células devem chegar a 3-5 × 10 ⁶ . Células em divisão para concentração entre 0,3 - 0,5 × 10 ⁶ células / mL.		

Figura 14 - Procedimento de descongelamento e passagem das células Expi293F™ no meio de expressão Expi293™.

Adaptado de: Diretrizes e protocolo do kit de sistema de expressão da EXPI 293F™ fornecido Gibco Life Technology (*Thermo Fisher Scientific 2018 - EUA*).

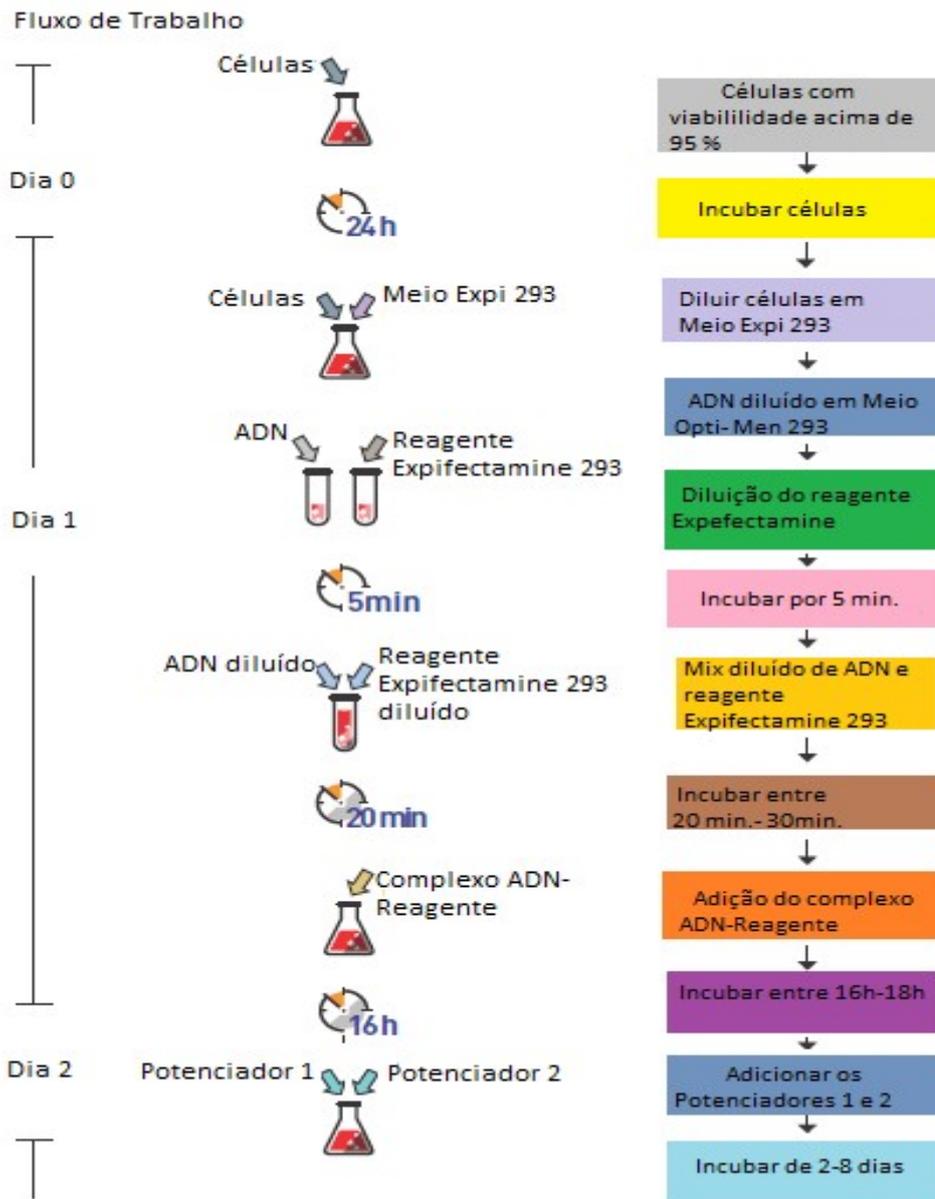


Figura 15 Procedimentos para etapa de transfecção das células Expi293F™ no meio de expressão Expi293™.

Adaptado de: Diretrizes e protocolo do Kit de sistema de expressão da Expi 293F™ fornecido Gibco Life Technologies (Thermo Fisher Scientific (2018))

4.10 A expressão transiente em células HEK-293

Após a transfecção das células, os frascos foram incubados em constante agitação no *shaker* (Erlenmeyers), plataforma rotatória (*Roller*) e agitador magnético (*Spinner*). Diariamente efetuou-se a contagem das células em câmara de Neubauer. A coleta do sobrenadante foi realizada ao final dos sete dias de produção nos modos

de operação em batelada e, no período, a cada 72 horas, no modo de produção em semi-perfusão.

4.10.1 Estratégia de Produção

A Figura 16 demonstrada posteriormente, expõe as diferentes estratégias para obtenção do anticorpo monoclonal de interesse. Foram avaliados em cada etapa os modos, os sistemas e a temperatura de produção. Na primeira produção, os experimentos foram realizados em triplicata utilizando sistema de Erlenmeyers em modo de produção batelada, mantendo a temperatura de 37 °C após a transfecção, com um volume final de 30 mL. Foi utilizado um controle negativo (em uniplicata), para demonstrar que o sistema não expressa nenhum anticorpo monoclonal sem a adição de plasmídeo com o ADN e o branco (uniplicata) composto apenas de sistema com as células, sem nenhum reagente da transfecção e na ausência do plasmídeo com ADN. Ao final desta produção, o sobrenadante foi coletado, pois nele estão os anticorpos secretados pelas células transfectadas, e reservado para realização dos ensaios imunoenzimático (do inglês-*Enzyme Linked Immuno Assay* - ELISA) para determinação da concentração do anticorpo produzido, purificação da proteína e caracterização através de análises físico-químicas.

Na segunda produção, foi fixado através de um sistema de Erlenmeyers em triplicata com 30 mL cada, a uma temperatura de 37 °C após a transfecção. Porém, nesta etapa, avaliou-se o modo de produção em semi-perfusão, que consiste em troca de meio e retenção das células periodicamente a cada 72 horas. Esta periodicidade foi determinada a partir da primeira produção, em que o cultivo apresenta uma acentuada queda na viabilidade no tempo citado. As coletas dos sobrenadantes foram realizadas durante as trocas de meio e reservadas para determinação da concentração, purificação e caracterização físico-químicas.

A terceira produção realizada por meio do sistema de Erlenmeyers em triplicata, com um volume de 30 mL cada, no modo de produção em batelada, de forma similar à primeira produção. No entanto, nessa nova produção, houve uma mudança de temperatura pós-transfecção para 34 °C, induzindo uma leve hipotermia às células HEK-293 durante a etapa de geração dos anticorpos. Ao final de 7 dias de produção, os sobrenadantes foram coletados e reservados para posterior realização do ensaio imuno-enzimático (ELISA), purificação e caracterização físico-química da proteína.

Através da avaliação dos resultados obtidos na primeira, segunda e terceira produção, foi dado prosseguimento ao quarto experimento, como modo de operação em batelada e sistemas de produção, utilizando frascos do tipo *Spinner* e *Roller* em triplicata para cada tipo de frasco, com o volume final de 90 mL cada. Após a transfecção, os cultivos foram incubados a uma temperatura de 34 °C para posterior indução de uma leve hipotermia nas células e ao término de sete dias de produção recolheu-se o sobrenadante para análise através do ELISA, purificação e caracterização físico-química da proteína.

4.10.2 Sistema de produção em Erlenmeyers com modo de produção em batelada a 37 °C após a transfecção

Após a transfecção das células, os Erlenmeyers (triplicata) foram condicionados em uma estufa a 8% de CO₂, sob constante agitação em um *shaker* orbital a 125 RPM a uma temperatura de 37 °C para expressão da proteína de interesse. Esta produção ocorreu, no modo batelada, conforme especificado pelo fabricante, com duração de sete dias.

Amostras do cultivo foram retiradas diariamente para contagem de células (câmara de Neubauer) destinadas a avaliação de viabilidade e concentração celular. Ao término dos sete dias de produção, no interior da cabine de segurança biológica, o cultivo celular de cada Erlenmeyer foi transferido para três tubos cônicos de 50 mL (Corning - EUA) e centrifugados a 400g durante dez minutos a 37 °C. Ao final da centrifugação o sobrenadante com o anticorpo monoclonal de interesse, correspondente a cada tubo Erlenmeyer foi transferido para outros tubos cônicos de 50mL (Corning – EUA) dentro da cabine de segurança biológica.

Uma pequena alíquota de 1 mL do sobrenadante de cada réplica foi transferido para um microtubo e armazenados em *freezer* -30 °C, até posterior realização dos ensaios de quantificação por ELISA. Os tubos com os sobrenadantes da produção em Erlenmeyers no modo batelada a 37 °C, também, foram armazenados em *freezer* -30 °C, para posterior purificação e caracterização por análises físico-químicas do anticorpo monoclonal. Os precipitados celulares retidos no fundo dos tubos foram descartados.

4.10.3 Sistema de produção em Erlenmeyers com modo de produção em semi-perfusão a 37 °C após a transfecção

Para o sistema de produção em Erlenmeyers, com a temperatura a 37 °C pós-transfecção, a troca do meio de cultura ocorreu a cada 72 horas, operando no modo de produção em semi-perfusão. Este período para a troca do meio de cultivo foi adotado, em razão dos resultados obtidos na primeira produção em Erlenmeyers. Após a transfecção das células HEK-293 para expressão transiente, os Erlenmeyers (triplicata) foram acondicionados em estufa de CO₂ a uma temperatura de 37 °C, sob agitação constante de um *shaker* orbital a 125 RPM. Decorridos 72 horas após a transfecção, os Erlenmeyers foram levados para o interior da cabine de segurança biológica e o cultivo de cada frasco foi transferido para três tubos Falcon de 50 mL. Foram retiradas amostras de 1 µL representativo de cada Erlenmeyer e transferidos para três microtubos para a realização de contagem em câmara de Neubauer, a fim de verificar a viabilidade celular da produção.

Os três tubos cônicos tipo Falcon de 50 mL, foram centrifugados por 10 minutos a 400 x g. E, assepticamente acondicionados no interior da cabine de segurança biológica. Todos os tubos apresentavam duas fases: O precipitado com as células e a fase líquida, onde estava o sobrenadante com o anticorpo monoclonal secretado pelas células HEK-293.

O sobrenadante correspondente a cada Erlenmeyer foi transferido para outros três tubos, identificados e armazenados em congelador -30 °C, para posterior purificação, análises físico-químicas e caracterização do anticorpo monoclonal. O *pellet* com as células HEK-293 foram ressuspendidas gentilmente com o meio Expi 293™ com auxílio de uma micropipeta, perfazendo um volume de 30 mL por Erlenmeyer. O conteúdo de cada um desses tubos foi transferido para seus respectivos Erlenmeyers, que foram armazenados sob as mesmas condições iniciais no interior da estufa a uma temperatura de 37 °C, atmosfera de CO₂ a 8% e agitação constante de um *shaker* orbital a 125 RPM. Esta etapa de coleta do sobrenadante de cada Erlenmeyer e a adição de meio de cultura foi realizada novamente após 72 horas da primeira troca do meio. Em cada uma das etapas de coleta do sobrenadante e adição de meio de cultura às células, realizou-se a contagem das células para verificação da viabilidade e cinética celular.

4.10.4 Sistema de produção em Erlenmeyers com modo de produção em batelada a 34 °C após a transfecção

Após a transfecção das células HEK-293, as triplicatas dos Erlenmeyers foram condicionadas em uma estufa de CO₂ a 8%, sob constante agitação no *shaker* orbital a 125 RPM, na temperatura de 34 °C para expressão dos anticorpos. Esta produção foi realizada no modo batelada e conforme especificado pelo fabricante, com duração de sete dias.

As amostras do cultivo foram retiradas diariamente para contagem do número de células (viáveis) destinadas à avaliação de viabilidade e cinética celular. Ao término de sete dias de produção, no interior da cabine de segurança biológica, o cultivo celular de cada Erlenmeyer foi transferido para três tubos cônicos do tipo Falcon de 50 mL (Corning - EUA) e centrifugados a 400 x g durante 10 minutos. Ao final da centrifugação os tubos foram manipulados assepticamente na cabina de segurança biológica e o sobrenadante com o anticorpo monoclonal secretado pelas células, correspondente a cada Erlenmeyer foi transferido para outros tubos cônicos do tipo Falcon de 50 mL (Corning – EUA).

Uma pequena alíquota de 1 mL do sobrenadante representativo de cada Erlenmeyer foi transferido para microtubos identificados. Estas alíquotas passaram a ser armazenadas em congelador -30 °C, com a finalidade da realização dos ensaios imuno-enzimáticos. Os tubos com os sobrenadantes, da produção em Erlenmeyers no modo batelada a 34 °C, identificados e armazenados em congelador -30 °C para posterior purificação e análises físico-químicas e caracterização do anticorpo produzido.

4.10.5 Sistema de produção em frasco *Roller* com modo de produção em batelada a 34 °C após a transfecção

Nesta etapa do experimento, avaliou-se o sistema de produção em frascos tipo *Roller* de 1L sob modo de produção em batelada, com volume de 90 mL por frasco, induzidas a uma condição de leve hipotermia a 34 °C e sob constante homogeneização em plataforma. A condição de indução a leve hipotermia foi iniciado somente após a transfecção, em todo o processo anterior de expansão das células o cultivo realizou-se por meio da incubação a 37 °C.

Amostras do cultivo foram retiradas diariamente para contagem de células (Câmara de Neubauer) destinadas a avaliação de viabilidade e cinética celular. Ao

término dos sete dias de produção, no interior da cabine de segurança biológica, o cultivo celular de cada frasco *Roller* foi transferido para três tubos cônicos do tipo Falcon (Corning - EUA) de 50 mL, completando o volume de 30 mL em cada um dos tubos correspondente a um frasco do tipo *Roller*. Perfazendo um total de nove tubos com 30 mL para os três frascos.

Posteriormente, os tubos previamente identificados, foram centrifugados a 400 xg por 10 minutos. Ao final da centrifugação os tubos foram higienizados com álcool 70% e transferidos para o interior da cabine de segurança biológica o sobrenadante com o anticorpo monoclonal de interesse secretado pelas células, correspondente a cada frasco tipo *Roller* sendo transferido para outros tubos cônicos do tipo Falcon (Corning – EUA) de 50 mL e identificados. Uma pequena alíquota de 1µL do sobrenadante representativo de cada frasco *Roller* foi transferida para microtubos e identificada com a finalidade de realização dos ensaios de ELISA. Os tubos com os sobrenadantes, da produção em batelada dos frascos tipo *Roller* no modo batelada a 34 °C foram identificados e armazenados em congelador -30 °C, para posterior purificação, análises físico-químicas e caracterização do anticorpo monoclonal produzido.

4.10.6 Sistema de produção em frasco *Spinner* com modo de produção em batelada a 34 °C após a transfecção

Nesta etapa do experimento, foi avaliado o sistema de produção em frascos *Spinner* em triplicata com 90 mL cada, sob modo de produção em batelada, com as células HEK-293 induzidas a uma condição de leve hipotermia a 34 °C, pós-transfecção. A condição de indução a leve hipotermia iniciou-se somente, após a transfecção, em todo o processo anterior de expansão das células o cultivo realizou-se por meio de incubação a 37 °C. Amostras do cultivo nos três frascos *Spinner* foram retiradas diariamente para contagem de células (Câmara de Neubauer) destinadas à avaliação de viabilidade e cinética celular. Ao término de sete dias de produção, no interior da cabine de segurança biológica, o cultivo celular de cada frasco *Spinner* foram transferidos para 3 tubos cônicos do tipo Falcon (Corning - EUA) de 50 mL, completando o volume de 30 mL em cada um dos tubos correspondente um frasco do tipo *Spinner*. Perfazendo um total de nove tubos com 30 mL para os três frascos.

Em seguida, os tubos previamente identificados, foram centrifugados a

400 xg por 10 minutos. Ao final da centrifugação, os tubos foram higienizados com álcool 70% e no interior da cabine de segurança biológica o sobrenadante com o anticorpo monoclonal de interesse secretado pelas células, correspondente a cada frasco *Spinner* transferido para outros tubos cônicos do tipo Falcon (Corning – EUA) de 50 mL e identificados.

Uma pequena alíquota de 1 mL do sobrenadante representativo de cada frasco do tipo *Spinner* foi transferida para microtubos e identificados. Estas alíquotas foram armazenadas em freezer -30 °C, com a finalidade de realização dos ensaios de ELISA. Os tubos com os sobrenadantes, da produção em batelada dos frascos tipo *Spinner* a 34 °C foram identificados e armazenados em congelador -30 °C, para posterior purificação, análises físico-químicas e caracterização do anticorpo monoclonal produzido.

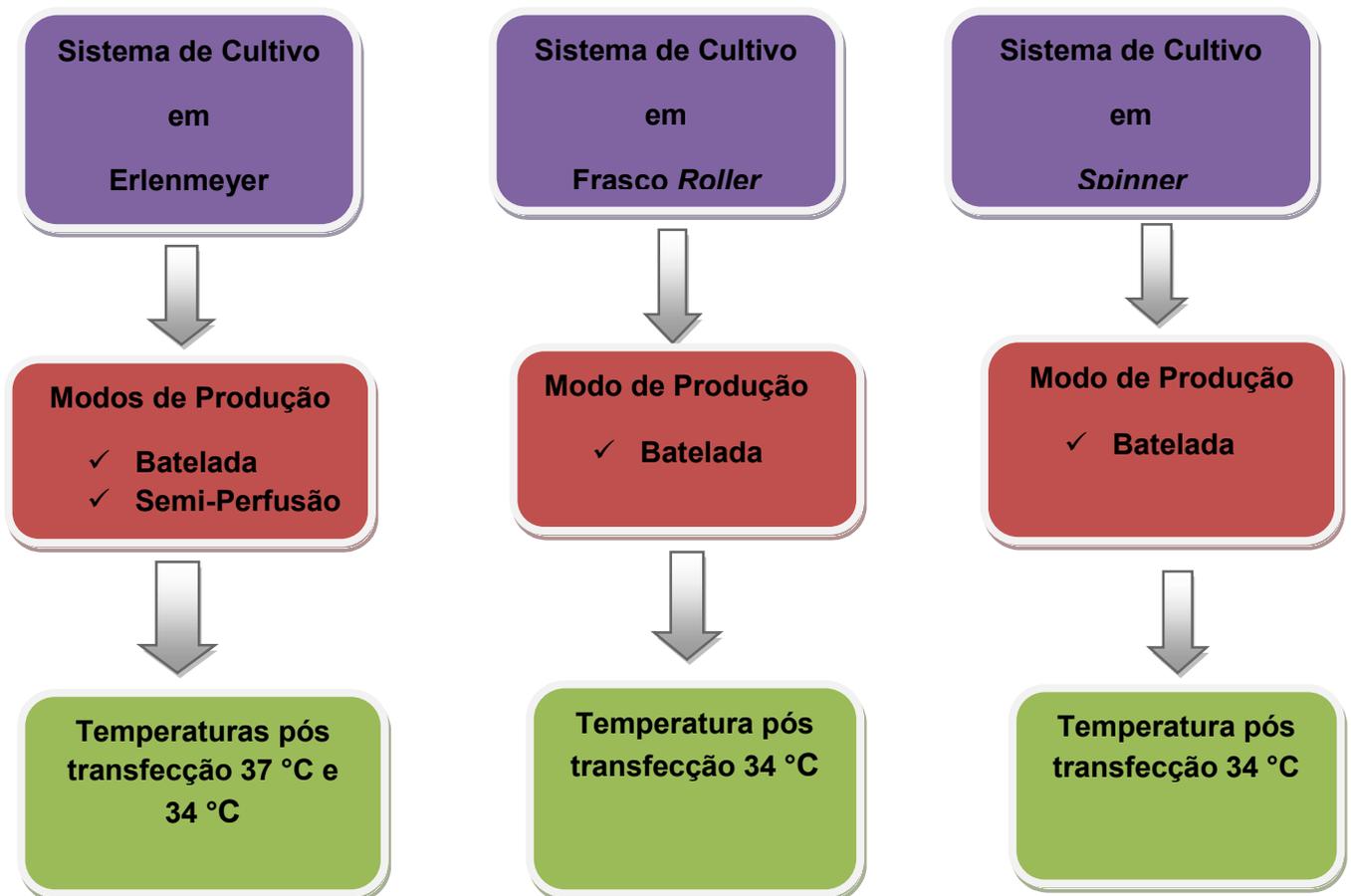


Figura 16 – Estratégia de produção. Esquema representa as principais diferenças entre os sistemas de cultivo, modos de produção e parâmetros de temperatura. Diagramas da cor roxa representam os diferentes sistemas de cultivo, diagramas na cor vermelha representam os diferentes modos de produção e os diagramas da cor verde representam as diferentes temperaturas.

Fonte: elaborada pela autora (2018).

4.11 Purificações de anticorpos monoclonais por cromatografia de afinidade à proteína A

Os ensaios de purificação dos anticorpos monoclonais anti-MRSA produzidos pelas células HEK-293 pós-transfecção e secretados no sobrenadante durante o cultivo, foram realizados no Laboratório de Macromoléculas – BioManguinhos/RJ (LAMAM). A purificação foi realizada por meio da técnica de cromatografia por afinidade à proteína A, utilizando-se uma coluna comercial *HiTrap MabSelect SuRe* 5 mL (ligante de proteína A) para captura de anticorpos monoclonais. Utilizou-se como eluentes as soluções tampão fosfato de sódio 20 mM com NaCl 150 mM, pH 8,0 (eluyente A) e solução tampão citrato de sódio 100 mM, pH 3,0 (eluyente B). Foi utilizado uma alíquota de 5 mL para injeção da amostra.

A eluição do material adsorvido na matriz cromatográfica foi realizada por meio da substituição do eluyente A pela solução tampão de deslocamento (eluyente B), e o fluxo de eluição empregado em 5 mL/min. Para a neutralização da fração de IgG recolhida nesta etapa, adicionou-se volume de 0,1 mL de solução tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, até atingir pH 7,0.

4.12 Concentração por ultrafiltração e dessalinização

Os anticorpos purificados foram concentrados, utilizando o dispositivo de filtração Amicon Ultra 50K (Millipore - EUA) de 50 mL, sendo centrifugado a 4.000xg durante dez minutos à 4 °C, em centrífuga de microtubos modelo 5804R. A diafiltração com solução de tampão fosfato (PBS) foi realizada após a concentração da amostra, a partir da adição de solução tampão PBS seguida de nova centrifugação para a redução do volume. Este procedimento foi repetido mais 2x para garantir a remoção do sal.

4.13 Caracterização Físico-Química

4.13.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os ensaios para análise do peso molecular das amostras purificadas foram realizados no LAMAM (Laboratório de Macromoléculas – BioManguinhos/RJ). A homogeneidade da amostra purificada foi avaliada por SDS-PAGE, utilizando gel Novex Nu-PAGE com concentração variando de 4% a 12% de poliacrilamida. As amostras foram incubadas com solução com DTT (Dithiothreitol) para a avaliação

em condições redutora e também sem o agente redutor. Para as estimativas de peso molecular (PM), utilizou-se o padrão proteico de PM *Precision Dual Color* (Bio-Rad - EUA) contendo proteínas apresentando PM iguais a 10.000; 15.000; 20.000; 25.000; 37.000; 50.000; 75.000; 100.000; 150.000 e 250.000. A corrida eletroforética foi realizada com voltagem constante de 200 V e duração de 45 minutos. O gel foi revelado com solução do corante de *Coomassie Blue Coloidal* (Novex® EUA), preparado de acordo com as instruções do fabricante. Após 18 horas de incubação com o corante à temperatura ambiente, o gel passou por um processo de descoloração por meio de lavagens sucessivas com água Milli-Q, em seguida, o mesmo foi digitalizado e a imagem obtida e analisada no programa GelDoc XR+ (Bio Rad).

4.13.2 Focalização isoeétrica

O ponto isoeétrico (pI) estimado por focalização isoeétrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE) em sistema *Phast System*® (GE *Healthcare* EUA). A focalização isoeétrica foi realizada com o gel *PhastGel*® (GE *Healthcare*) com gradiente de pH 3 a 9. Para as estimativas de pI, utilizou-se padrão de pI High (GE *Healthcare*) na faixa de pH 5,0 a 10,5 cujas proteínas foram: β -lactoglobulina A (pH= 5,20), anidrase carbônica B bovina (pH=5,85), anidrase carbônica B humana (pH=6,55), mioglobina ácida de cavalo (pH= 6,85), mioglobina básica de cavalo (pH=7,35), lectina ácida de lentilha (pH=8,15), lectina intermediária de lentilha (pH= 8,45), lectina básica de lentilha (pH=8,65), tripsinogênio (pH= 9,30) e citocromo C (pH= 10,25).

A amostra foi aplicada no gel, com o pente de aplicação de 4 μ L para seis amostras. Utilizando-se a corrente de 2.5 mA, em uma voltagem de 2.000V com uma duração de trinta minutos. A revelação do gel foi realizada com solução de metanol 30% e ácido acético 10% acrescida de 5 gotas em pipeta Pasteur de *Comassie Brilliant Blue* R350 (*PhastGel Blue R*, GE *Healthcare*). Após uma hora de incubação com o corante à temperatura ambiente, o gel foi descorado, decorrido de várias lavagens com a solução de metanol a 30% e ácido acético 10%. Após esta etapa o gel foi digitalizado no equipamento Gel DOC XR+™ (Bio-Rad/EUA) e a densitometria das bandas eletroforéticas realizada no programa Lab™ (Bio-Rad / EUA).

4.13.3 Dosagem de proteínas

O cálculo da concentração de proteína na fração contendo IgG foi realizada por meio da determinação da absorbância a 280 nm, utilizando os cálculos abaixo (Figura 17):

- Abs₂₈₀ da amostra diluída 1:10 v/v = Y

- ε₂₈₀ da IgG = 1,40

- l (caminho óptico) = 1 cm

$Abs_{280} \times diluição = \epsilon_{280} \times Conc. (mg \times mL) \times l$

Figura 17 – Cálculo para concentração de proteínas. Absorbância (Abs); Y = absorbância da amostra diluída; ε₂₈₀ da IgG = coeficiente de extinção; l = caminho óptico.

4.13.4 Espectroscopia de fluorescência

Para obtenção dos espectros de fluorescência de triptofano, utilizou-se o equipamento espectrofluorímetro JASCO Modelo FP-6500 (Jasco Corporation Tóquio – Japão). A amostra foi analisada de acordo com a concentração encontrada através da dosagem de proteínas. E a excitação ocorreu no comprimento de onda de 280 nm e a emissão foi lida entre 295 a 415 nm.

4.13.5 Ensaio imuno-enzimático (ELISA)

Com o propósito de avaliar a afinidade do anticorpo monoclonal purificado anti-MRSA, secretado em expressão transiente pelas células HEK-293, em cada um dos sistemas, modos de produção e parâmetros de temperaturas avaliados nos sobrenadantes obtidos, as amostras foram submetidas ao ELISA do tipo indireto. A etapa de ensaio de ELISA iniciou-se com a sensibilização de placas de 96 poços. Utilizando-se 0,5 µg do anticorpo Alfa-IgG humano (*ThermoScientific* – EUA) por poço, diluído em solução de tampão carbonato/bicarbonato 0,05M. Foi aplicado em cada unidade de poço 100 µL da solução tampão com o anticorpo. A placa foi incubada *overnight* a 4 °C.

Após o término do período de incubação, os poços da placa foram lavados 3 vezes com 200 µL da solução de PBS *Tween* 0,05% (tampão fosfato de sódio na

concentração de 10 mM + NaCl 150 mM e *Tween* 0,05%). Em seguida, foi aplicado aos poços 200 µL tampão de bloqueio fosfato de sódio na concentração de 10 mM + NaCl 150 mM e 5% de leite em pó desnatado (PBS *milk* 5%). A placa foi incubada em estufa a uma temperatura de 37 °C por um período de 2 horas, para o bloqueio de ligações inespecíficas.

Ao final do período de incubação, os poços das placas foram lavados com três vezes com a solução de PBS + *Tween* 0.05%. E, posteriormente, 100 µL das amostras do anticorpo purificado, foram aplicadas aos poços. Nas seguintes diluições seriadas: 1/50; 1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600. Ao término da aplicação das amostras, a placa foi incubada em estufa a uma temperatura de 37 °C por duas horas.

Ao final de duas horas de reação, a placa foi lavada três vezes com solução de PBS + *Tween* 0,05%. Em seguida, foi aplicado 100 µL a cada poço do anticorpo conjugado anti-*human*IgG, IgA, IgM – HRP (*ThermoScientific*) na diluição de 1:5000 (v/v) em tampão bloqueio e incubado a 37 °C. Após a incubação, a placa foi lavada 3 vezes com 200 µL/poço da solução tampão fosfato de sódio na concentração de 10 mM + NaCl 150 mM (PBS) + *Tween* 0,05% e foi aplicada por 100 µL em cada poço do reagente de revelação 3,3',5,5' tetrametilbenzidina 1% BioRad (TMB Peroxidase) em seguida incubada por quinze minutos.

Ao término da incubação, foi aplicado aos poços 50 µL da solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) na concentração 2M, para cessar a reação de revelação. A placa foi lida em espectrofotômetro na faixa de 450nm.

4.14- Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, foram aplicados os programas Excel e GraphPad Prism® 8.0 e o nível de significância foi determinado p<0,05. Na análise descritiva utilizou-se a média, como medida de tendência central e desvio padrão como medida de dispersão. Foi aplicado o teste de análise de variância Ordinary one-way Anova.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cinéticas de crescimento celular, viabilidade celular e avaliação das produtividades volumétricas.

5.1.1 Cinética do crescimento e viabilidade celular na 1ª produção

Conforme indicações do fornecedor do *kit* de expressão Expi293 (*ThermoFisher*) a primeira produção referência do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a, foi realizado no sistema em Erlenmeyer, sob agitação constante em agitador orbital a 125 RPM no modo de produção em batelada, a uma temperatura de 37 °C após a transfecção. Foram preparadas três réplicas com o vetor e o ADN do anticorpo monoclonal de interesse, além disto, uma uniplacata com os reagentes de transfecção, mas sem vetor contendo ADN (branco do reagente). E uma uniplacata sem o vetor e sem os reagentes de transfecção (controle celular).

As figuras 18 e 19 representam respectivamente a cinética de crescimento e a viabilidade celular do cultivo na primeira produção. A concentração do inóculo para o cultivo em todos os frascos de Erlenmeyers no dia zero foi de $2,5 \times 10^6$ células por mL, apresentando uma viabilidade média de 96%. Dezesete horas após a transfecção das células HEK-293 a concentração média nos erlenmeyers foi de $3,4 \times 10^6$ células por mL e se manteve em crescimento até o período de sessenta e cinco horas. Logo em seguida, teve início uma fase de declínio da concentração e da viabilidade celular.

Decorridos oitenta e nove horas da transfecção, as células apresentaram uma concentração média de $2,05 \times 10^6$ células por mL e uma viabilidade média de, aproximadamente, 60%. A partir deste período, as células das três réplicas entraram em fase de morte celular, chegando ao período de 143 horas e 162 horas, respectivamente, a uma concentração de $1,2 \times 10^6$ e $0,92 \times 10^6$ células por mL. As viabilidades das células correspondentes a 143 e 162 h, respectivamente.

Assim como nos Erlenmeyers das três réplicas, o cultivo referente ao controle celular apresentou uma viabilidade inicial acima de 96%. Após 17 horas de transfecção, o crescimento celular teve uma concentração média de $3,3 \times 10^6$ células por mL. Ao longo das horas é possível notar o crescimento constante das células controle, atingindo um pico máximo no período de 65 horas (3º dia), com uma concentração de $6,45 \times 10^6$ por mL. No período de 89 horas (4º dia) após a transfecção, as células entram em uma fase de declínio chegando a uma

concentração de $5,88 \times 10^6$ células por mL. Ao final de 143 horas do cultivo, as células controle passaram a apresentar uma viabilidade de 10%. O erlenmeyer representante do branco de células obteve no período de dezessete horas após a transfecção um perfil de crescimento ligeiramente superior as células controle, apresentando uma concentração de $3,4 \times 10^6$ células por mL. Entre o período de 43 e 65 horas, ocorreu uma leve estabilização no crescimento celular, demonstrando, respectivamente, a concentração de $3,45 \times 10^6$ células por mL e $3,55 \times 10^6$ células por mL. Em 89 horas, o Erlenmeyer representante do branco de células, teve um perfil de decréscimo da concentração celular, apresentando neste período uma concentração de $3,48 \times 10^6$ células por mL e 79% de viabilidade.

Em 113 horas, a viabilidade e a celularidade alcançam respectivamente: 76% e $2,30 \times 10^6$ células por mL. Nos períodos posteriores, correspondentes a 143 e 162 horas, o branco de células apresentou concentrações na ordem de $2,23 \times 10^6$ e $1,68 \times 10^6$ células por mL. O número de células viáveis também apresentou queda no período de 143 horas, atingindo 70,6 % de viabilidade. Ao final de 162 horas após a transfecção, o branco de células teve como resultado uma viabilidade de 46,9%.

Avaliando os resultados obtidos na 1ª produção referência conforme as indicações do fabricante, nota-se que a partir do 3º dia após a transfecção há uma queda na viabilidade celular, que permanece ao longo do cultivo chegando ao 8º dia após a transfecção com uma viabilidade média para as réplicas de 48,8%. Corroborando com os estudos de Mel et al., (2008) sobre a duplicação celular que obtiveram resultados em torno de dez e cinquenta horas e em sua maioria, as linhagens celulares possuem um tempo de duplicação por volta de vinte e vinte e quatro horas. O pico de concentração celular costuma acontecer entre três e cinco dias.

Considerando a perceptível diminuição da viabilidade celular a partir do 3º dia decorridos da transfecção, realizou-se por meio do segundo experimento, implementando a troca total do meio de cultura, com a finalidade de avaliar a possível extensão do cultivo por mais tempo e, portanto, um possível aumento na produtividade final.

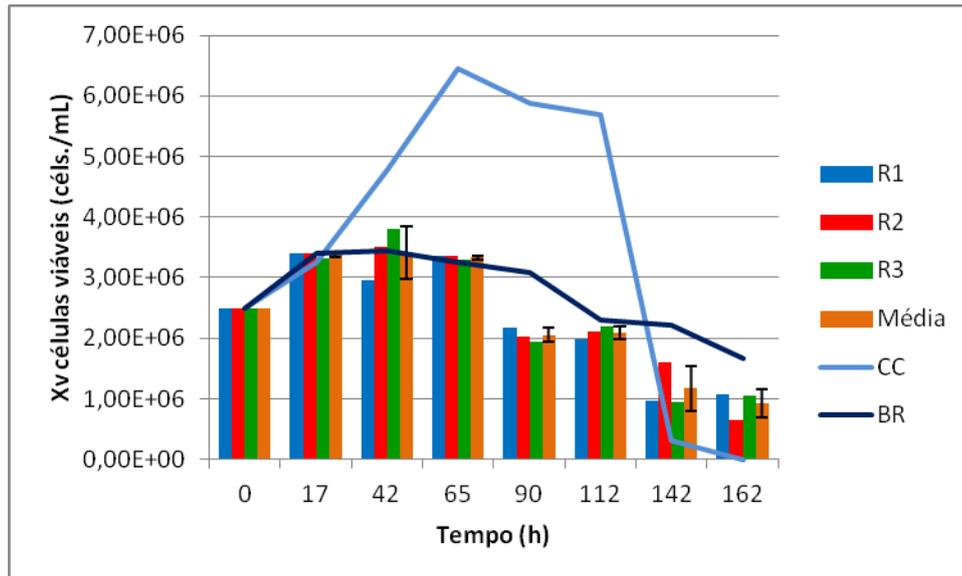


Figura 18 - Cinética de crescimento e viabilidade celular do cultivo em Erlenmeyers, no modo de produção em batelada, na temperatura de 37 °C após a transfecção.

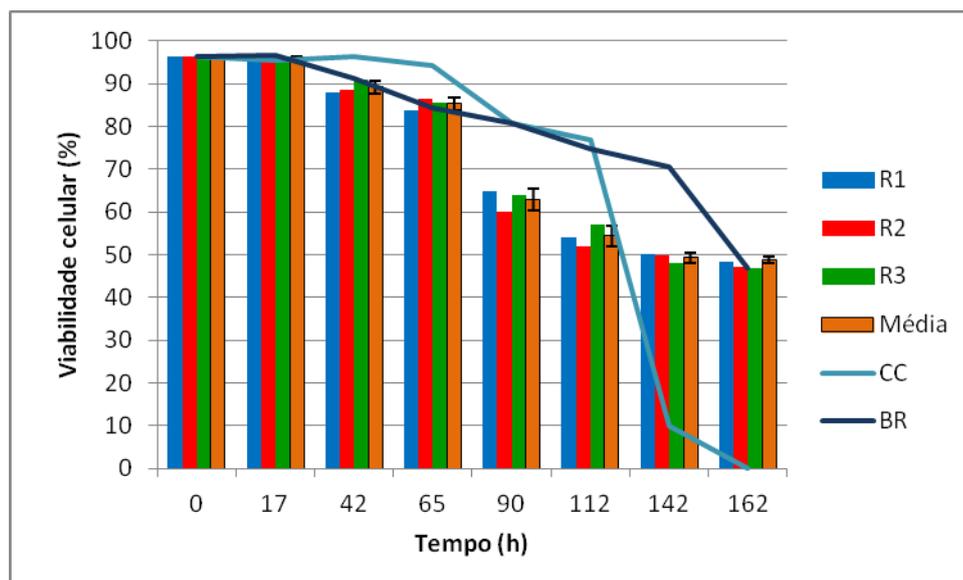


Figura 19 - Viabilidade celular do cultivo em Erlenmeyers, no modo de produção em batelada, na temperatura de 37 °C após a transfecção.

5.1.2 Rendimento na expressão do anticorpo monoclonal de MRSA obtido na 1ª produção

A avaliação da produtividade volumétrica no sistema em Erlenmeyers, no modo de produção em batelada a uma temperatura de 37 °C após a transfecção ocorreu através do ensaio do ELISA. O imunoenensaio apresentou como resultado na réplica um de Erlenmeyer a concentração de 48µg/mL; a réplica 2 de Erlenmeyer

obteve uma concentração de 62,7 μ g/mL e a réplica 3 teve a concentração de 58 μ g/mL. A média da concentração da produção do anticorpo nos Erlenmeyers na primeira produção atingiu 56,2 \pm 7,5 μ g/mL.

Analisando a massa de anticorpo monoclonal produzido nas réplicas 1, 2 e 3 foram respectivamente: 1440 μ g, 1881 μ g, 1740 μ g em 30mL. A média de produtividade em massa de anticorpo monoclonal obtido foi de 1686 μ g \pm 225,2 μ g em 30mL. As figuras 20 e 21 apresentam, os resultados das três réplicas em concentração em μ g/mL e a massa de anticorpo produzido em 30mL, respectivamente.

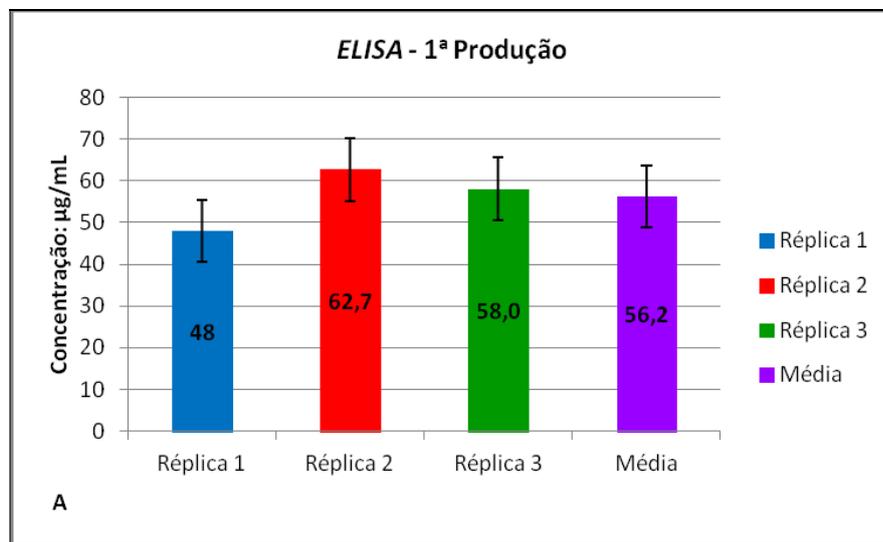


Figura 20- Concentração de anticorpo monoclonal de MRSA obtidona 1ª produção em μ g/mL por (ELISA) das réplicas 1, 2, 3 e médias Desvio Padrão =7,5.

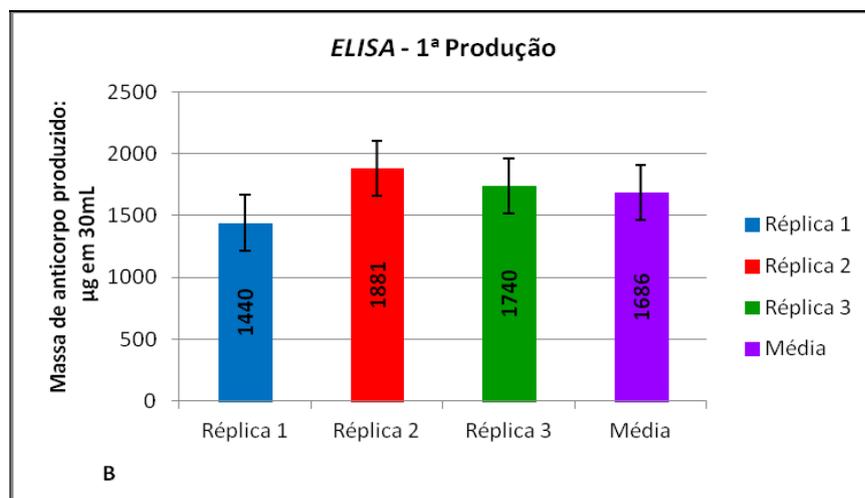


Figura 21 - Massa de anticorpo monoclonal de MRSA produzido em 30mL no ensaio imunoenzimático (ELISA) na 1ª produção das réplicas 1, 2, 3 e média (Desvio Padrão = 225,2).

5.1.3 Cinética do crescimento e viabilidade celular da 2ª produção

Na primeira produção referência, realizada em Erlenmeyers no modo de produção em batelada com uma temperatura de 37 °C em estufa de CO₂ a 8% observou-se que após 65 horas (aproximadamente três dias) ocorridas a transfecção, há um declínio na viabilidade e no crescimento celular. Estes resultados iniciais serviram como diretiva para execução da segunda produção, utilizando o sistema de produção em Erlenmeyers, e a manutenção da temperatura do cultivo após a transfecção de 37 °C, sob constante agitação em *shaker* a 125 RPM em uma estufa de CO₂ a 8% e sob o modo de operação em semi-perfusão.

No modo operação em semi-perfusão, foi realizada a troca total de meio de cultura a cada três dias, período que corresponde, aproximadamente a, 65 horas depois da transfecção das células HEK-293. As células transfectadas foram conservadas em cultivo para expressão do anticorpo monoclonal. A manutenção destas células ocorreu através da reposição total e periódica do meio Expi-293. A cada troca de meio, os sobrenadantes das réplicas foram coletados e armazenados em freezer -30 °C para posteriores análises. O cultivo foi realizado em triplicata de Erlenmeyers com um volume de 30mL cada, representado, respectivamente, em: R₁, R₂ e R₃.

A Figura 22 e 23 a seguir, correspondem respectivamente ao crescimento e viabilidade celular. O cultivo inicia com todas as réplicas em uma concentração de $2,5 \times 10^6$ por mL. Decorrido 90 horas após a transfecção, período da primeira troca de meio, as células representantes dos Erlenmeyers (R₁, R₂ e R₃), apresentaram uma alta concentração de células, em destaque as réplicas R₁ e R₂ que tiveram, respectivamente: $3,72 \times 10^6$ e $3,71 \times 10^6$ células/mL. A réplica 3, apresentou uma concentração de $3,12 \times 10^6$ células/mL. No período correspondente a 162 horas as réplicas 1 e 2 apresentaram uma concentração de $3,54 \times 10^6$ e $3,56 \times 10^6$ células/mL, respectivamente. Em relação à réplica 3 é possível observar uma queda no número de células. A concentração obtida perfaz $1,91 \times 10^6$ células por mL.

Ao final de 316 horas após a transfecção a réplica 1 não apresentava mais células viáveis, sobrevivendo apenas as representantes da réplica 2 com uma concentração de $1,77 \times 10^6$ células/mL e a réplica 3 com $0,7 \times 10^6$ células/mL.

Em relação a viabilidade, todos os Erlenmeyers estavam com 98,5% de viabilidade. Porém, 90 horas após a primeira troca com o meio Expi 293, ocorreu um

declínio na viabilidade das réplicas. As réplicas 1, 2 e 3 apresentaram viabilidade de 82,1%; 81,2% e 89,7%, respectivamente. No decorrer das trocas de meio é notável o declínio da viabilidade celular em todas as réplicas; ao final de 306 horas após a transfecção, na réplica 01 todas as células correspondentes estavam mortas. As réplicas 2 e 3 apresentaram a viabilidade de 43% e 24,6%.

Quando comparado com a primeira transfecção referência, foi possível observar que na segunda produção até o tempo de 90 horas correspondente ao 3º dia (1ª troca de meio), as concentrações celulares alcançadas em ambas produções foram equivalentes, ou seja, na primeira e segunda produção foram obtidas respectivamente as seguintes concentrações: $3,33 \times 10^6$ e $3,52 \times 10^6$ células por mL. Na 2ª troca de meio de cultura (162 horas), a concentração obtida foi de $3,00 \times 10^6$ células por mL. Considerando o mesmo período de tempo (162 horas) na primeira produção referência a concentração foi de $0,925 \times 10^5$ células/mL. Ou seja, a segunda produção alcançou concentração superior a primeira transfecção. Analisando as duas condições de produção, a manutenção com troca de meio de cultura favoreceu o crescimento das células, pois proporcionou a retirada dos metabólitos tóxicos secretados e a reposição dos nutrientes necessários para mantê-las viáveis em cultivo. Comparando com a 1ª produção referência, em que o modo de operação foi a batelada, não havendo a troca do meio de cultivo, as células mantiveram-se viáveis até 65 horas, e após este período apresentaram queda no número de células viáveis, possivelmente, em razão dos metabólitos tóxicos.

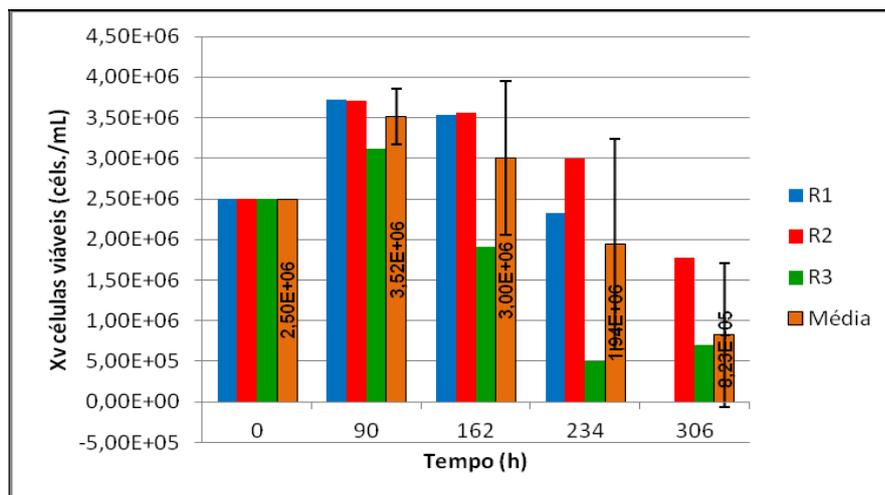


Figura 22- Cinética de crescimento celular do cultivo em Erlenmeyers, no modo de produção em semi-perfusão, na temperatura de 37 °C após a transfecção na 2ª produção.

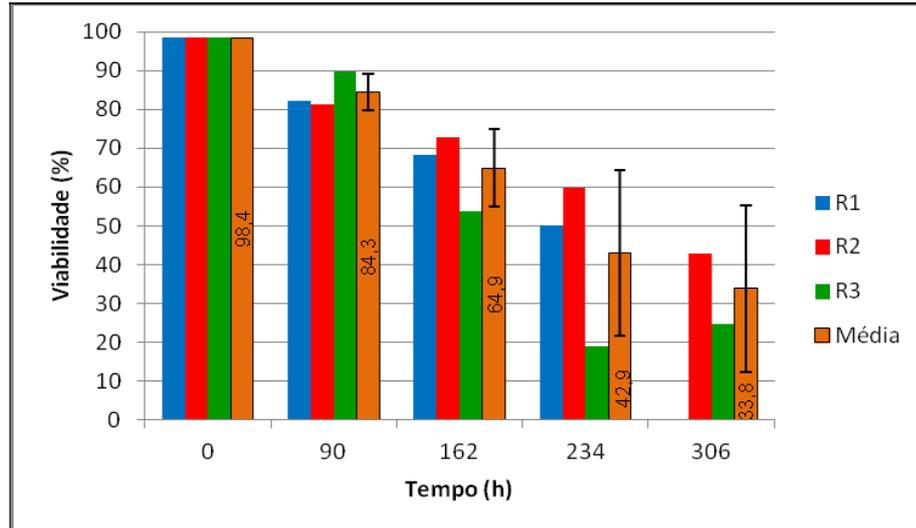


Figura 23–Viabilidade celular do cultivo em Erlenmeyers, no modo de produção em semi-perfusão, na temperatura de 37 °C após a transfecção na 2ª produção

5.1.4 Avaliação do rendimento na expressão do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a obtido na 2ª produção

A avaliação da produtividade volumétrica no sistema em Erlenmeyers, no modo de produção em semi-perfusão a uma temperatura de 37 °C após a transfecção ocorreu através do ensaio do ELISA. O imunoenensaio apresentou como resultado na réplica 1 de Erlenmeyer a concentração média das quatro coletas a concentração de 2,23 µg/mL, a réplica 2 de Erlenmeyer obteve uma concentração de 1,24 µg/mL e a réplica 3 obteve a concentração de 1,30µg/mL (gráfico 24). A concentração média total considerando as quatro coletas das réplicas, produzido de anticorpo monoclonal de MRSA, neste experimento atingiu $1,59 \pm 0,68 \mu\text{g/mL}$. Considerando que o volume final de todas as coletas foi de 120mL a massa média obtida 190,8µg.

Na avaliação da massa média de anticorpo monoclonal produzido em 30 mL, a média dos resultados das coletas para as réplicas 1, 2 e 3, respectivamente, 66,90µg em 30mL; 37,20µg em 30mL e 39µg em 30mL. A média total das 4 coletas das réplicas foi de $47,7 \pm 16,65 \mu\text{g}$ em 30mL (Figura25).

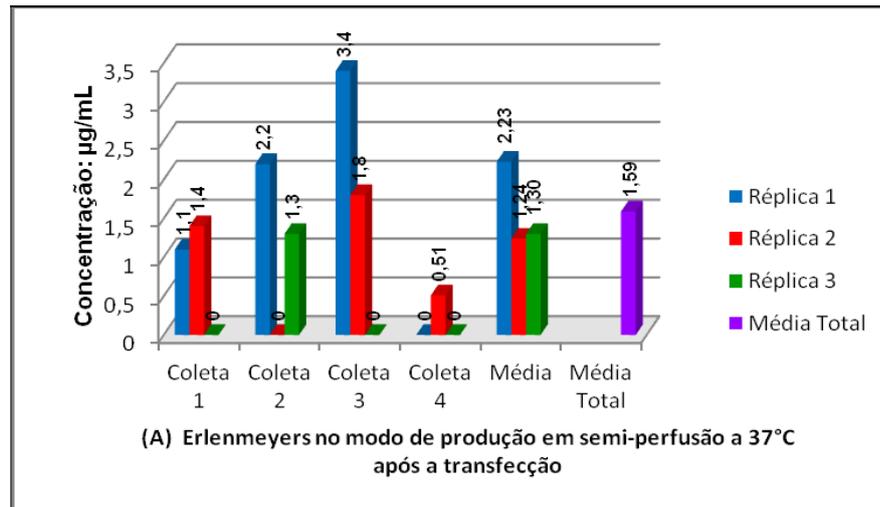


Figura 24 - Concentração em µg/mL de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a obtido no sistema em Erlenmeyers, no modo de produção em semi-perfusão a 37 °C, após a transfecção das células HEK-293 na 2ª produção.

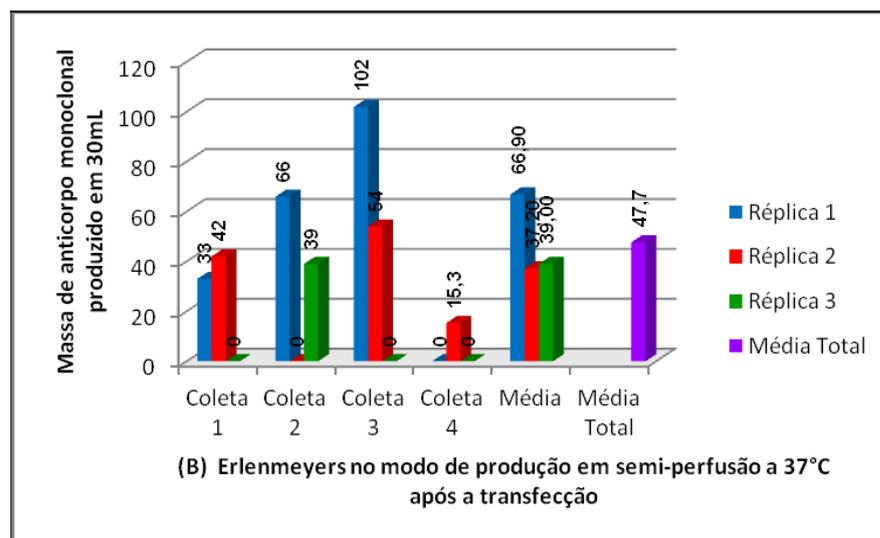


Figura 25 - Massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a produzido em µg/30mL ± 16,65 para a média total.

Com intuito de avaliar as transfecções e considerando que na primeira produção houve apenas a coleta final do sobrenadante com os anticorpos monoclonais de MRSA anti-PBP2a, enquanto que na 2ª produção ocorreram 4 trocas do meio EXPI293 com coletas paralelas dos sobrenadantes. A condição adotada para avaliação da produtividade volumétrica entre os experimentos ocorreu por meio da comparação da massa total de anticorpo monoclonal produzido ao final de cada processo.

Na primeira produção a massa média obtida no final do processo 1686µg em um volume de 30mL. Na segunda transfecção, no modo de operação em semi-

perfusão, com a troca de meio de cultura a cada três dias, foram realizadas quatro coletas, onde a concentração média alcançada foi de 1,59µg/mL. Considerando que a concentração média por coleta ficou em 1,59 ug/mL e que o volume médio por coleta encontra-se em 30mL, a massa média obtida por coleta foi 47,7 ug. Dessa forma, somando as massas médias obtidas nas quatro coletas para esta produção, obteve-se uma massa total de 190,8 µg.

Nas condições da primeira produção referência, em média o produto obtido foi de 56,2ug/mL. Enquanto, no segundo experimento a produtividade em média das quatro coletas obtidas foi de 190,8 µg com um desvio padrão $\pm 16,65$. Considerando os desvios das produtividades e calculando as condições avaliadas apresentaram diferenças estatísticas.

Através da avaliação qualitativa das duas transfecções e considerando que em ambas empregou-se o sistema de produção em Erlenmeyers a uma temperatura de 37 °C após a transfecção, pode-se concluir que o processo de troca de meio a cada três dias não melhorou a produção total final de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a quando comparado com a primeira produção.

Uma possível elucidação para esta baixa produtividade volumétrica no modo de operação em semi-perfusão, está relacionado ao fato de que a incorporação ao cultivo dos “*enhancers*” 1 e 2, deu-se apenas no momento inicial de transfecção das células HEK-293. Não ocorrendo qualquer suplementação destes reagentes ao longo das trocas de meio de cultura. Os “*enhancers*” 1 e 2 compõem o *kit* de transfecção Expi 293 (*ThermoFishe* - EUA) e têm como função, intensificar a incorporação dos genes da cadeia leve e pesada para expressão nas células HEK-293.

5.1.5 Cinética do crescimento e viabilidade celular na 3ª produção

Foi possível verificar, por meio dos resultados do ensaio imunoenzimático que a troca periódica do meio de cultura com a adoção do modo de produção em semi-perfusão, favoreceu ao crescimento celular, permitindo a retirada de subprodutos da metabolização pelas células HEK-293. Porém, não proporcionou um aumento da produtividade do anticorpo monoclonal de MRSA. A partir destes resultados a 3ª produção foi realizada utilizando-se Erlenmeyers, no modo de produção em batelada com a alteração da temperatura para 34 °C após a transfecção das células HEK-293. Segundo estudos realizados por Lin et al., (2015),

a redução da temperatura do cultivo das células pós-transfecção pode ser benéfica para o aumento da expressão proteica.

Este processo de aumento na produtividade proteica, pode estar ligado à queda do crescimento ou divisão celular induzida pela leve hipotermia, com a diminuição da temperatura para 34 °C, tendendo a favorecer a síntese ou expressão de proteínas. Conforme pode-se observar na Figura 26, posteriormente, apresentado, no início da transfecção as réplicas correspondentes de cada cultivo em Erlenmeyer apresentaram uma concentração de $2,5 \times 10^6$ células por mL a uma temperatura de 34 °C. Decorridas 17 horas da transfecção, as réplicas 1, 2 e 3 apresentaram, respectivamente, as concentrações de: $2,85 \times 10^6$; $2,87 \times 10^6$ e $2,68 \times 10^6$ células por mL.

O perfil de queda na concentração celular ocorreu gradativamente ao longo das horas nas três réplicas. Após 42 horas decorridas da transfecção, as células da réplica 1 atingiram uma concentração de $2,80 \times 10^6$ células por mL, seguido da réplica 2 com uma concentração de $2,87 \times 10^6$ células por mL e $2,68 \times 10^6$ células por mL para réplica 3.

No período correspondente a 66 horas, há uma queda na concentração celular na réplica 1. Nas réplicas 2 e 3 as concentrações foram, respectivamente, $2,65 \times 10^6$ e $2,56 \times 10^6$ células por mL. Em 90 horas após a transfecção a concentração diminui, apresentando a réplica 1 a concentração de $2,14 \times 10^6$, seguida pela réplica 2 e 3 com concentrações de $2,25 \times 10^6$ e $1,43 \times 10^6$ células por mL. Em 112 horas a réplica 1 apresentou $1,53 \times 10^6$ células por mL, seguido pela réplica 2 com $1,80 \times 10^6$ células por mL e a réplica 3 com uma concentração de $1,45 \times 10^6$ células por mL. No período correspondente a 137 horas após a transfecção há uma queda significativa na concentração celular das três réplicas. A réplica 1 apresentou $6,4 \times 10^5$ células por mL, seguida das réplicas 2 e 3 com concentrações de $0,8 \times 10^6$ e $1,09 \times 10^6$ células por mL.

Na viabilidade deste ensaio, nota-se que inicialmente todas as réplicas (R_1 , R_2 e R_3) estavam com a viabilidade acima de 95%. No período correspondente a 17 horas após a transfecção as réplicas 1 e 2 apresentaram viabilidade acima de 96%, seguido da réplica 3 com 95,85%. Entre o período de 17 e 42 horas as células das três réplicas entram em uma fase de estabilização. Em 66 horas decorridas da transfecção as células das réplicas 1, 2 e 3 iniciam uma fase de declínio, atingindo respectivamente viabilidades de 85,5%; 88,5% e 79,01%. Em 90 horas a viabilidade

na réplica 1 foi de 70,86%, seguido pelas réplicas 2 e 3 com 72,11% e 60,1% respectivamente.

No período correspondente a 112 horas ocorreu uma queda acentuada nas viabilidades das 03 réplicas. A réplica 1 obteve uma viabilidade de 47%, seguido pela réplica 2 e 3 com viabilidades de 51,72% e 53,8%. Ao final de 137 horas da transfecção, os cultivos das três réplicas apresentaram menos de 40% de viabilidade. Avaliando a cinética de crescimento da 3ª produção, observa-se que o perfil de multiplicação das células é inferior, quando comparado ao crescimento celular da 1ª produção a uma temperatura de 37 °C após a transfecção. Ocorrendo o mesmo, quando comparado a 2ª produção, apresentando a terceira produção uma taxa de crescimento celular reduzida, considerando os tempos de 89 horas e 162 horas, período correspondente, respectivamente, a 1ª e 2ª trocas de meio de cultura na semi-perfusão (Figura 27).

Possivelmente, este aspecto de sensível diminuição do crescimento celular está relacionado à nova condição de temperatura, com a indução de leve hipotermia (34 °C) das células HEK-293 após a transfecção. Estudos conduzidos Lin et al., (2015), demonstraram que a indução a leve hipotermia em células HEK-293, pode retardar a taxa do metabolismo e crescimento celular. Ficando a maquinaria da célula direcionada a síntese de proteínas. Neste caso específico, possivelmente as células estavam direcionadas para a expressão dos anticorpos monoclonais anti-PBP2a de MRSA.

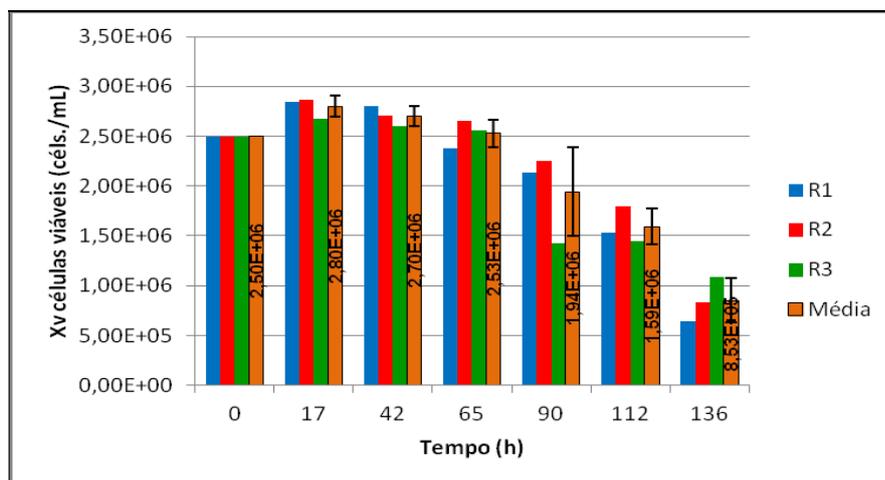


Figura 26 - Cinética de crescimento celular do cultivo em Erlenmeyers, no modo de produção em batelada, na temperatura de 34 °C após a transfecção na 3ª produção.

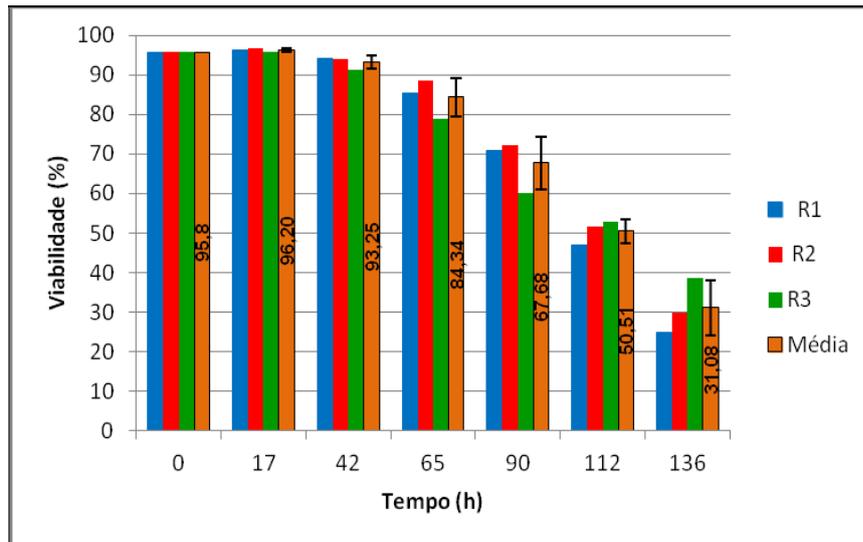


Figura 27- Viabilidade celular do cultivo em Erlenmeyers, no modo de produção em batelada, na temperatura de 34 °C após a transfecção na 3ª produção.

5.1.6 Rendimento na expressão do anticorpo monoclonal de MRSA obtido na 3ª produção.

A avaliação da produtividade volumétrica no sistema em Erlenmeyers, no modo de produção em batelada a uma temperatura de 34 °C após a transfecção ocorreu através do ensaio de ELISA. O imunoensaio apresentou como resultado na réplica 1 de Erlenmeyer a concentração de 55µg/mL; a réplica 2 de Erlenmeyer obteve uma concentração de 43,1µg/mL e a réplica 3 teve concentração de 28,1µg/mL. Conforme o Figura 28, a seguir, a média da concentração da produção de anticorpos nos sistemas Erlenmeyers fez um total de 42,1µg/mL±13,5. Já a massa de anticorpo monoclonal produzido nas réplicas 1, 2 e 3 foram respectivamente: 1650µg, 1293µg e 843µg em 30mL. Apresentando uma média total de 1262µg (± 404,4) em 30mL, (Figura 29).

A massa média de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a, obtida ao final do processo da 3ª produção foi de 1262 ±404,4µg em 30 mL (Figura 29). Comparando qualitativamente o rendimento obtido entre a 1ª produção (1686 µg/30 mL) e a 3ª produção (1262 µg/30 mL), conclui-se que as produtividades volumétricas em ambas foram similares. Avaliando o rendimento nestas duas produções, o rendimento do anticorpo monoclonal em estudo foi 1,3 vezes superior na 1ª produção em relação a terceira transfecção.

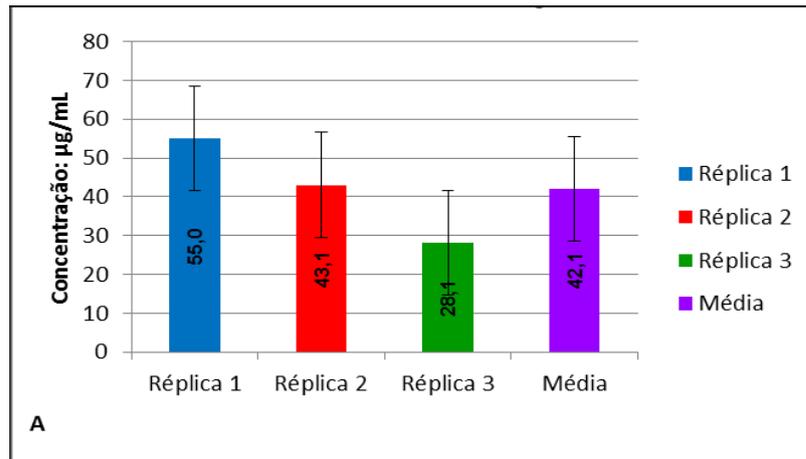


Figura 28 - Concentração de anticorpo monoclonal de MRSA produzido em µg/mL no ensaio imunoenzimático (ELISA) das réplicas 1, 2, 3 e médias das réplicas (Média±DP13,5) na 3ª produção.

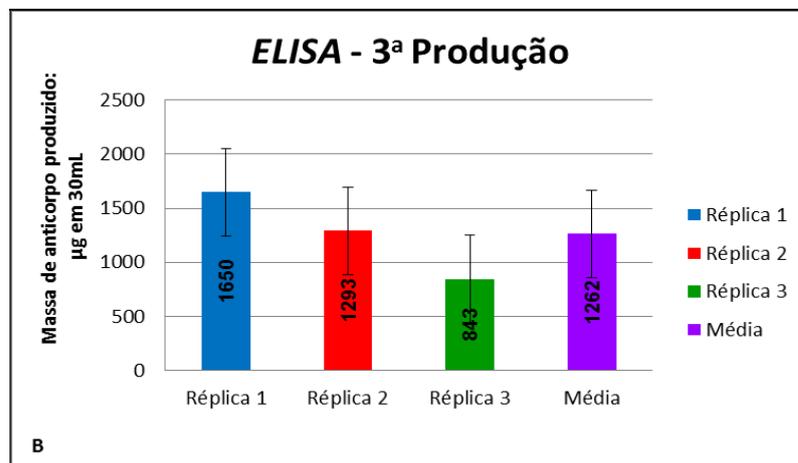


Figura 29 - Massa de anticorpo monoclonal de MRSA produzido em µg em 30mL no ensaio imunoenzimático (ELISA) das réplicas 1, 2, 3 e média (± 404,4) na 3ª produção.

Na 2ª produção ao total de quatro coletas (30mL cada) o rendimento em massa de anticorpo monoclonal foi de 190,8µg, enquanto na 3ª produção obteve-se 1262µg em 30mL ao final do processo. Quando comparando a 2ª produção, a massa final de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a expressa na 3ª produção foi 6,6 vezes superior.

A concentração média de anticorpo monoclonal obtido na 3ª produção foi de 42,1±13,5µg/mL. Quando comparado à 1ª produção, em que foi obtida a concentração média de 56,2 ± 7,5µg/ml, pode-se considerar que estas duas produções são estatisticamente próximas.

Avaliando qualitativamente as três transfecções, nota-se que as condições de cultivo da 3ª produção através o sistema de produção em Erlenmeyers, no modo

de produção em batelada, com uma mudança de temperatura para 34 °C após a transfecção, em termos de rendimento de massa de anticorpo monoclonal obteve concentrações próximas a da 1ª produção referência. Considerando a 2ª produção, mediante os resultados pode-se confirmar novamente que a troca do meio de cultura no período a cada três dias, pouco favoreceu ao aumento do rendimento produtivo do anticorpo monoclonal em estudo. Quando compara a 2ª produção com a 3ª transfecção obteve em massa de anticorpo monoclonal produzido quantidades 6,6 vezes superior.

5.1.7 Cinética do crescimento e viabilidade celular na 4ª produção

5.1.7.1 Cinética do crescimento e viabilidade celular na 4ª produção no sistema de frascos *Roller*

Os experimentos da quarta produção foram realizados em sistemas de frascos *Roller* e *Spinner*, no modo de produção em batelada e com a indução a hipotermia com alteração da temperatura para 34 °C após a transfecção. Inicialmente serão apresentados os resultados da cinética de crescimento no sistema em frasco *Roller* e em seguida a cinética de crescimento e viabilidade celular nos frascos *Spinner*.

O cultivo em sistema de produção em frasco *Roller*, foi estabelecido com uma concentração inicial em todos os frascos de $2,5 \times 10^6$ células por mL, conforme a Figura 30. Decorridos dezessete horas a transfecção na réplica 1 apresentou uma concentração de $4,47 \times 10^6$ células, seguido das concentrações de $5,63 \times 10^6$ células por mL e $7,14 \times 10^6$ células por mL para as réplicas 2 e 3, respectivamente. Logo após 42 horas de transfecção, houve um aumento da concentração celular para a réplica 1 atingindo $6,40 \times 10^6$ células/mL. Havendo um decréscimo na concentração das réplicas 2 e 3, apresentando $4,56 \times 10^6$ células/mL e $5,40 \times 10^6$ células/mL. No período correspondente a 66 horas após a transfecção é notório a queda no número de células vivas, apresentando as réplicas 1, 2 e 3 nesta ordem as seguintes concentrações de células vivas: $3,29 \times 10^6$ células por mL; $2,95 \times 10^6$ células por mL e $3,20 \times 10^6$ células por mL.

Decorridas 90 horas após a transfecção em todas as réplicas, as concentrações de células vivas por mL apresentaram uma relevante queda. A réplica 1 apresentou a concentração de $0,850 \times 10^6$ células/mL, a réplica 2 de

8,0 x 10⁶ células/mL e a réplica 3 uma concentração de 0,90 x 10⁶ células/mL.

Ao final de 112 horas após a transfecção todas as concentrações de células viáveis em todas as réplicas estão muito reduzidas. A réplica 1 possui uma concentração de 2,85 x 10⁵ células/mL; e as réplicas 1 e 2 apresentam respectivamente as concentrações de: 2 x 10⁵ células por mL e 5 x 10⁵ células/mL. Ainda na Figura 31, pode-se observar a viabilidade celular das réplicas no sistema em frasco *Roller*, no modo batelada a uma temperatura de 34 °C após a transfecção. Neste sistema, todas as réplicas iniciam com uma viabilidade acima de 95% e, assim, permanecem até 17 horas decorridas a transfecção. No período de 42 horas a viabilidade nas três réplicas está acima de 90%.

A partir de 66 horas, a réplica 1, apresenta viabilidade de 47,9%. Seguido das réplicas 2 e 3 que apresentaram, respectivamente, 58,27% e 50,83%. Se comparado ao período anterior, há um significativo declínio na viabilidade celular em 90 horas após a transfecção, a réplica 1 apresentou uma viabilidade de 27%, seguida das réplicas 2 e 3 que tiveram nesta ordem as seguintes viabilidades: 29,70% e 26,20%. Ao final de 112 horas de transfecção, a viabilidade das células encontrava-se em 20,95% (réplica 1), 18%(réplica 2) e 22,70% (réplica 3).

Avaliando o perfil da cinética de crescimento celular até o período de 42 horas de transfecção, as concentrações de células viáveis na 4^a produção (5,45x10⁶ células/mL) em frascos *Roller* foram superiores a 1^a e 3^a transfecções, apresentando, respectivamente, as seguintes concentrações: (3,42 x 10⁶ células/mL) e (2,70 x 10⁶ células/mL).

A partir de 66 horas há uma queda no número de células viáveis da 4^a produção em frascos *Roller* (3,15 x 10⁶ células/mL), alcançando neste sistema concentrações próximas à 1^a (3,33 x 10⁶ células/mL) e 3^a transfecção (2,53 x 10⁶ células/mL). Esta tendência no declínio no número de células em torno de 65-66 horas, posteriormente, a transfecção ocorre também, nos demais experimentos realizados no modo de produção em batelada e pode estar relacionado a um aumento de metabólitos gerados pelas células.

Ao longo das horas, esta queda no número de células viáveis é perceptível na 4^a produção em frascos *Roller*. Encerrando às 112 horas de transfecção com uma concentração de 3,62 x 10⁵ células/mL.

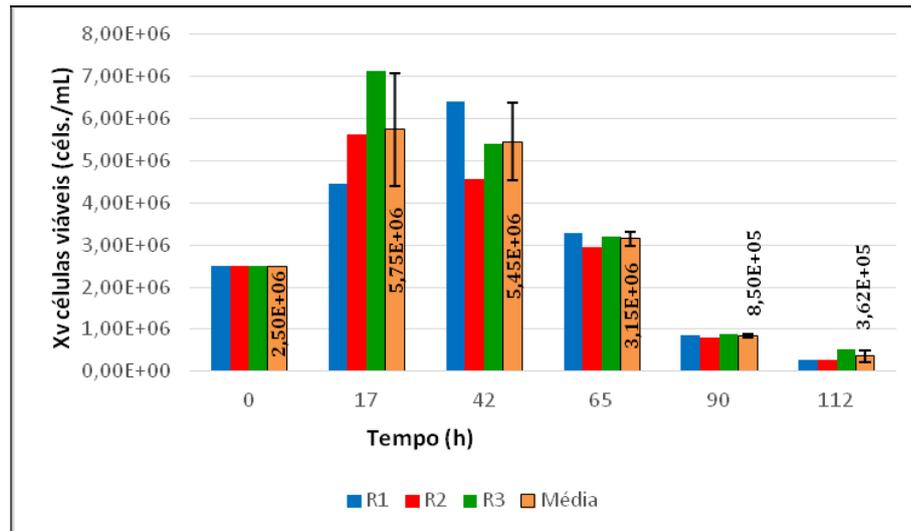


Figura 30 - Cinética de crescimento celular do cultivo em frascos *Roller*, no modo de produção em batelada, a temperatura de 34 °C após a transfecção na 4ª produção.

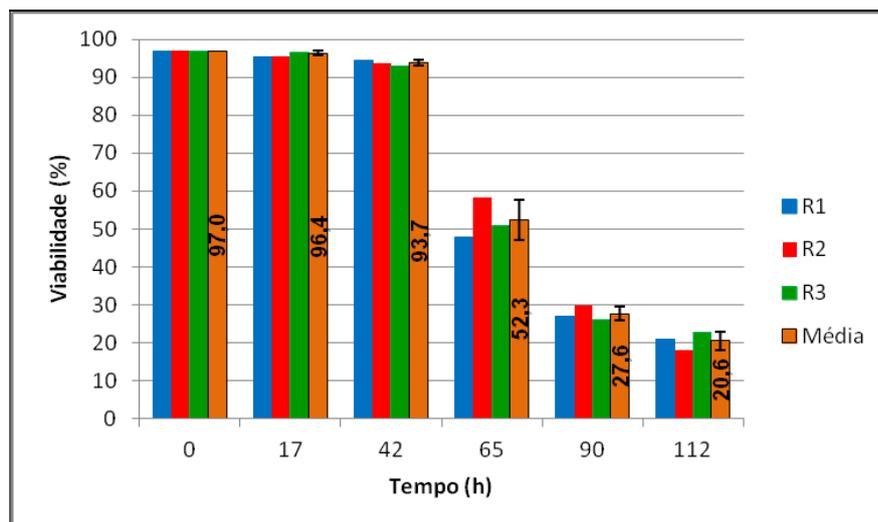


Figura 31 - Viabilidade celular do cultivo em frascos *Roller*, no modo de produção em batelada, a temperatura de 34 °C após a transfecção na 4ª produção.

5.1.7.2 Cinética do crescimento e viabilidade celular na 4ª produção em frascos *Spinner*

Conforme será exposto na Figura 32 no início do cultivo, as réplicas correspondentes ao sistema de produção em frascos *Spinner* apresentaram uma concentração acima de $2,5 \times 10^6$ células/mL a uma temperatura de 34 °C. Após dezessete horas da transfecção, a réplica 1, 2 e 3 apresentaram a concentração celular de: $5,18 \times 10^6$; $4,42 \times 10^6$ e $3,83 \times 10^6$ células/mL, respectivamente.

Após 42 horas da transfecção as células da réplica 1 atingem uma concentração de $5,26 \times 10^6$ células/mL, seguido da réplica 2 com uma concentração

de $5,89 \times 10^6$ células/mL e $3,72 \times 10^6$ células/mL para réplica 3.

No período de 66 horas logo após a transfecção, há uma queda na concentração celular na réplica 1 apresentando concentração de $2,40 \times 10^6$ células/mL. Nas réplicas 2 e 3 as concentrações foram, respectivamente, $2,74 \times 10^6$ e $3,6 \times 10^6$ células/mL. Em 90 horas após a transfecção a réplica 1 apresenta concentração de $0,7 \times 10^6$, seguida pela réplica 2 e 3 com concentrações de $5,60 \times 10^5$ e $6,0 \times 10^5$ células/mL. Em 112 horas a réplica 1 apresentou $3,65 \times 10^5$ células/mL, seguido pela réplica 2 com $4,85 \times 10^5$ células/mL e a réplica 3 com uma concentração de $3,70 \times 10^5$ células por mL.

Na Figura 33, referente a viabilidade neste ensaio, todas as réplicas (R_1 , R_2 e R_3) estavam 97% de viabilidade. No período correspondente a dezessete horas decorridas da transfecção, as réplicas 1 e 2 mostraram uma viabilidade acima de 95%, seguido da réplica 3 com 92,4%. Em 42 horas decorridas da transfecção as células das réplicas 1, 2 e 3 têm, respectivamente, viabilidades de: 87,5%, 93,6% e 84,18%. Após 66 horas, os cultivos entraram em uma fase de declínio celular apresentando a viabilidade de 53,05% na réplica 1, na réplica 2 de 55,30%, seguido pela réplica 3 com 32,57%.

Ao final de 112 horas da transfecção, todas as réplicas apresentaram viabilidades abaixo de 25%. A réplica 1 tem uma viabilidade de 24,66%, seguido pela réplica 2 e 3 com viabilidades de: 24,90% e 21,80%, respectivamente. O perfil de cinética de crescimento da 4ª produção em frascos *Spinner* ($4,96 \times 10^6$ células/mL) foi inferior ao sistema em frascos *Roller* ($5,45 \times 10^6$ células/mL) até o período de 42 horas. Em relação à 1ª, 2ª e 3ª transfecções, o sistema em frascos *Spinner* até o período de 42 horas apresentou uma maior concentração de células viáveis.

A partir da etapa de 66 horas há uma queda no número de células viáveis no sistema em frascos *Spinner* ($2,95 \times 10^6$) quando comparado às demais produções: 1ª ($3,33 \times 10^6$ células/mL), 3ª ($2,53 \times 10^6$ células/mL) e 4ª em frascos *Roller* ($3,15 \times 10^6$). A queda da viabilidade na 4ª produção em sistema de frasco *Spinner* mantém-se até ao final do cultivo em 112 horas.

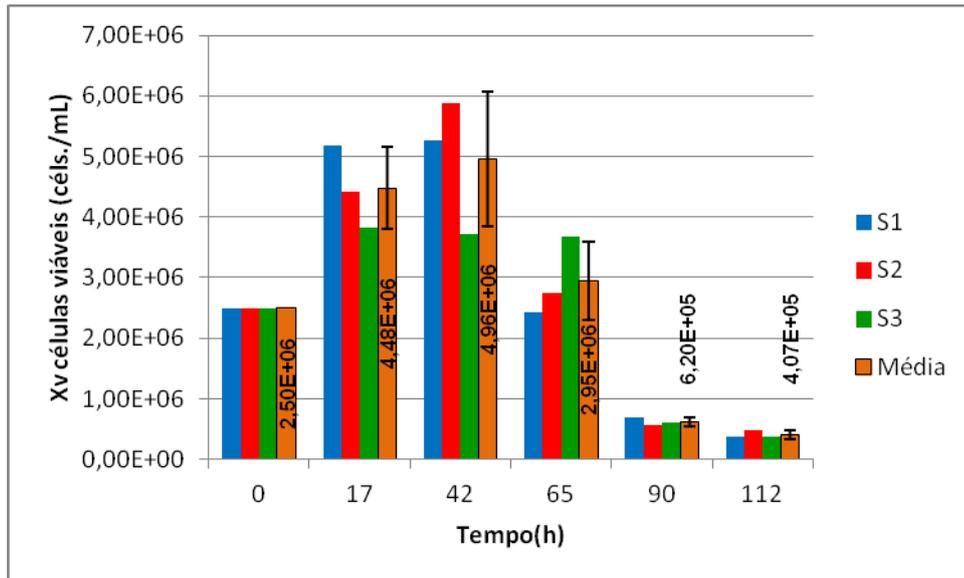


Figura 32 - Cinética do crescimento celular do cultivo em frascos *Spinner*, no modo de produção em batelada, a temperatura de 34 °C após a transfecção na 4ª produção.

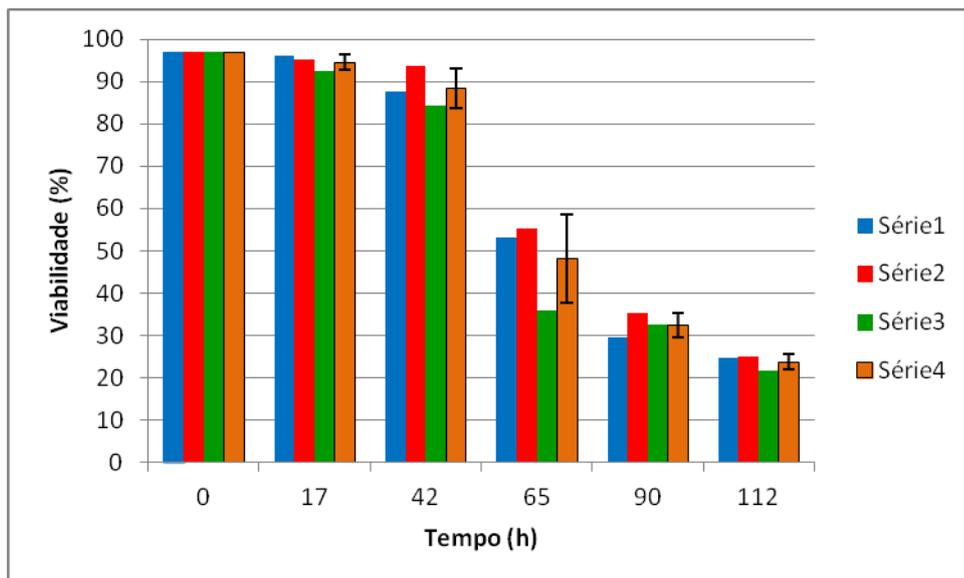


Figura 33 - Viabilidade celular do cultivo em frascos *Spinner*, no modo de produção em batelada, a temperatura de 34 °C após a transfecção na 4ª produção.

5.1.8 Rendimento na expressão do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a obtido na 4ª produção em frascos *Roller* e *Spinner*

A avaliação da produtividade volumétrica nos sistemas em frascos *Roller* e *Spinner*, no modo de produção em batelada a uma temperatura de 34 °C, após a transfecção ocorreu através do ensaio de ELISA. O imunoenensaio apresentou como resultado na réplica 1 em frasco *Roller* a concentração de 146µg/mL, a réplica 2 em

frasco *Roller* obteve uma concentração de 141,9µg/mL e a réplica 3 teve a concentração de 203,2µg/mL; perfazendo a média da concentração da produção do anticorpo no sistema de produção em frascos *Roller* foi de $163,8 \pm 34,2\mu\text{g/mL}$, conforme especificado na Figura 34 A, a seguir.

A Figura 34B expõe o ensaio imunoenzimático no sistema em frascos *Spinner*, nas mesmas condições de produção em modo batelada, com temperatura de 34 °C após a transfecção apresentou os seguintes resultados: a réplica 1 em frasco *Spinner* obteve a concentração de 89,9 µg/mL; as réplicas 2 e 3 apresentaram respectivamente as concentrações de 70,4µg/mL e 117,9µg/mL. A média de produtividade neste sistema foi de 92,7µg/mL.

A massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a produzida nas réplicas 1, 2 e 3 (Figura 35A) no sistema de produção em frascos *Rollers* foram respectivamente: 13.158µg em 90mL, 12.771µg em 90mL e 18.288µg em 90mL, apresentando uma média de 14.739µg/90mL. Quando comparado qualitativamente a média de produção de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a da 1ª produção referência com a 4ª produção em frascos *Roller*, este último apresentou um rendimento de 4913µg em 30mL. Embora os volumes das coletas finais tenham sido distintos e considerando as mesmas proporções em volume, pode-se considerar que o rendimento de anticorpo monoclonal produzido na 4ª produção em frasco *Roller* foi, aproximadamente, 3 vezes superior ao primeiro ensaio.

Avaliando a produtividade em massa de anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA e considerando as devidas proporções em volume, a 4ª transfecção apresentou o rendimento superior (103 vezes maior) à 2ª produção. Quando comparado a 3ª produção a massa produzida de anticorpo monoclonal em frascos *Roller* demonstrou cerca de 3,9 vezes superior à sua produtividade.

O rendimento em massa do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA obtida no sistema de produção em frascos do tipo *Spinner* (Figura 35B), nas réplicas 1, 2 e 3 foi, respectivamente, de: 8.091µg em 90mL, 10.611µg em 90mL e 8.343µg em 90mL. A média de rendimento em produtividade no sistema em frascos *Spinner* foi de: 9.015 µg em 90mL. Comparando qualitativamente em relação à primeira produção referência, o aumento de produtividade foi 1,78 vezes quando aplicados as devidas proporções de volume (30mL) entre as duas transfecções. A 4ª produção apresentou em relação à 2ª produção em frascos *Spinner* um aumento de 63 vezes na produtividade volumétrica na expressão do anticorpo anti-PBP2a de MRSA.

Considerando as devidas proporções em volume, a 4ª produção em frasco *Spinner* obteve um rendimento de 2,38 superior a 3ª transfeção. As Figuras 34 (A e B) e 35 (A e B) abaixo apresentam o panorama em dados comparativos de produção de anticorpo monoclonal de MRSA nas diferentes produções

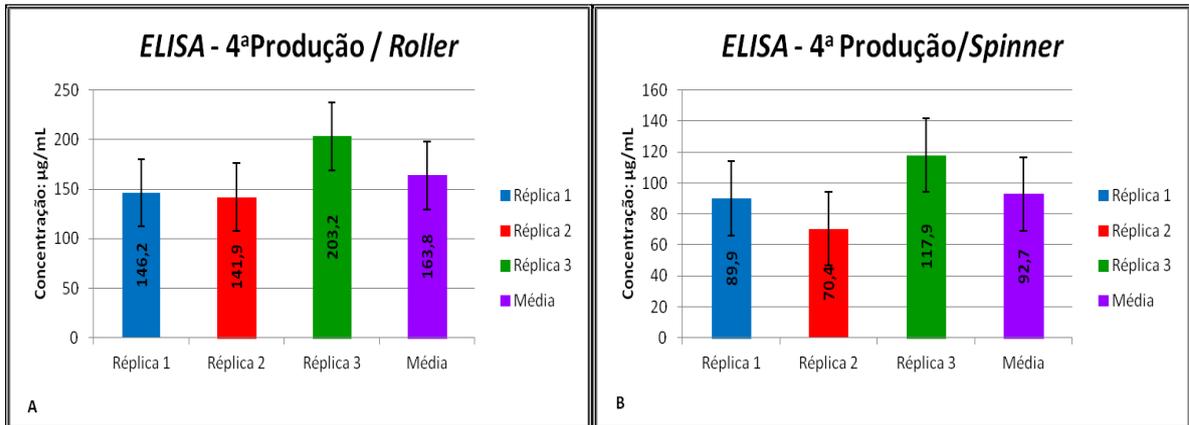


Figura 34 - (A) Concentração de anticorpo monoclonal de MRSA anti PBP2a produzido em µg/mL no ensaio imunoenzimático (ELISA) das réplicas 1, 2 e 3 na 4ª produção em sistemas de frascos *Roller*. (B) Massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti PBP2a produzido em µg/mL no ensaio imunoenzimático (ELISA) das réplicas 1, 2 e 3 na 4ª produção, em frascos *Spinner*.

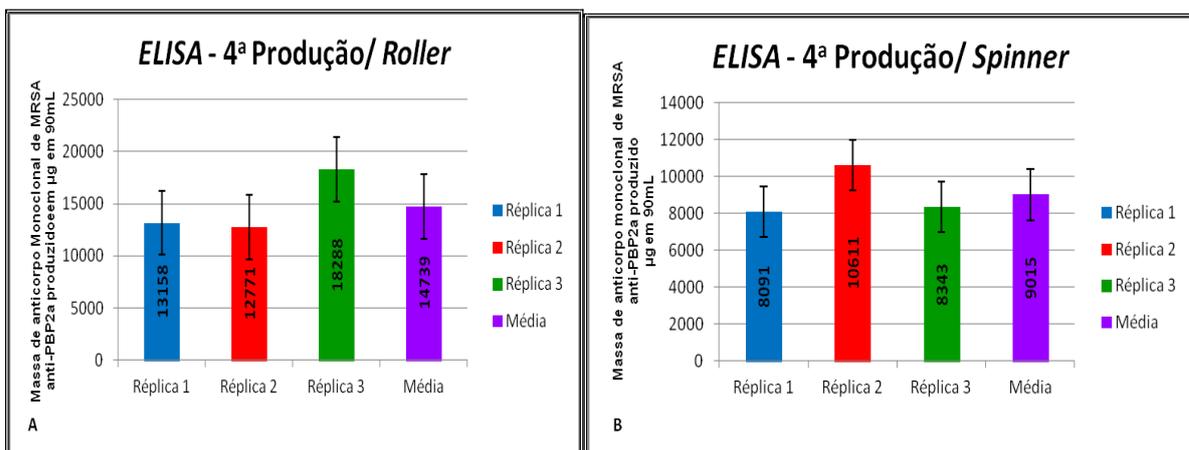


Figura 35 - (A) Massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti PBP2a produzido em µg/90mL no ELISA das réplicas 1, 2 e 3 na 4ª produção em sistema de frascos *Roller*. (B) Massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti PBP2a produzido em µg/90mL no ELISA das réplicas 1, 2 e 3 na 4ª produção em sistema de frascos *Spinner*.

Produção	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a	Massa ($\mu\text{g}/30\text{mL}$ ou $\mu\text{g}/90\text{mL}$) de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a
1ª Produção: Sistema de produção em Erlenmeyer, modo de operação em batelada a 37 °C após a transfecção	56,2 \pm 7,5 $\mu\text{g/mL}$	1686 \pm 225,2 $\mu\text{g}/30\text{mL}$
2ª Produção: Sistema de produção em Erlenmeyer, modo de operação em semi-perfusão a 37 °C após a transfecção	1,59 \pm 0,68 $\mu\text{g/mL}$	47,7 \pm 16,65 $\mu\text{g}/30\text{mL}$
3ª Produção: Sistema de produção em Erlenmeyer, modo de operação em batelada 34 °C após a transfecção	42,1 \pm 13,5 $\mu\text{g/mL}$	1262 \pm 404,4 $\mu\text{g}/30\text{mL}$
4ª Produção: Sistema de produção em frascos <i>Roller</i> , modo de operação em batelada 34 °C após a transfecção.	163,8 \pm 34,2 $\mu\text{g/mL}$	14.739 \pm 3079 $\mu\text{g}/90\text{mL}$
4ª Produção: Sistema de produção em frascos <i>Spinner</i> , modo de operação em batelada 34 °C após a transfecção.	92,7 \pm 23,9 $\mu\text{g/mL}$	9015 \pm 1387 $\mu\text{g}/90\text{mL}$

Quadro 3 - Comparativo das produtividades volumétricas de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a nos diferentes sistemas, modos de produção e influência do parâmetro temperatura a 37 °C e 34 °C.

As figuras 36 e 37 demonstram a produção de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a produzido em $\mu\text{g}/\text{mL}$ e em $\mu\text{g}/30\text{mL}$ ou $\mu\text{g}/90\text{mL}$.

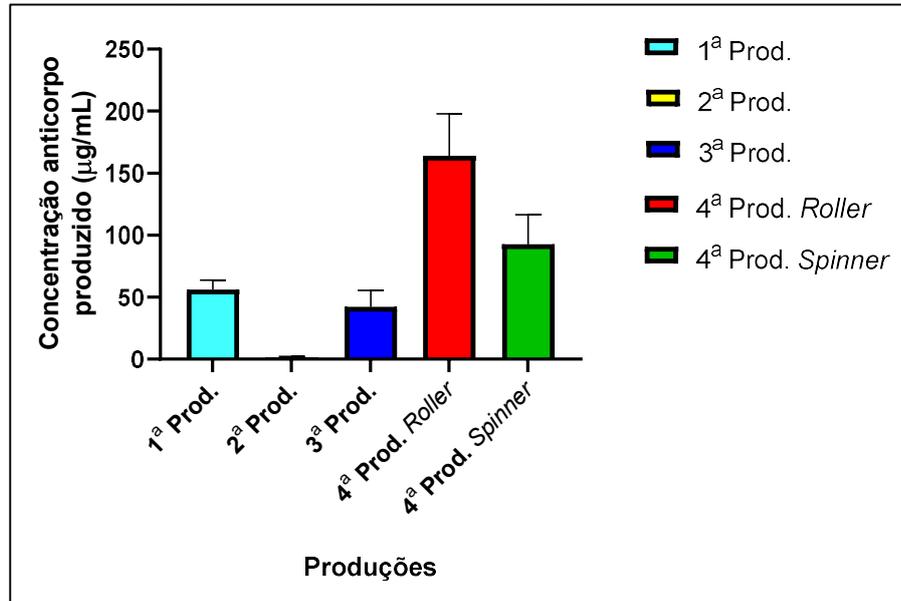


Figura 36 – Massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a secretado ($\mu\text{g}/\text{mL}$) nas produções. Destaca-se a coluna em vermelho referente a 4ª produção onde foi obtido maior concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$) expresso do anticorpo monoclonal de interesse. Na 1ª produção foi obtido uma concentração de $56,2 \pm 7,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ (coluna em azul claro); A 2ª produção (coluna em amarelo) a concentração obtida foi de $1,59 \pm 0,68 \mu\text{g}/\text{mL}$; 3ª produção (coluna em azul escuro) a concentração obtida foi de $1262 \pm 404,4 \mu\text{g}/\text{mL}$; 4ª produção em *Roller* a concentração obtida foi de $163,8 \pm 34,2 \mu\text{g}/\text{mL}$; 4ª produção em *Spinner* (coluna em verde) concentração de $92,7 \pm 23,9 \mu\text{g}/\text{mL}$.

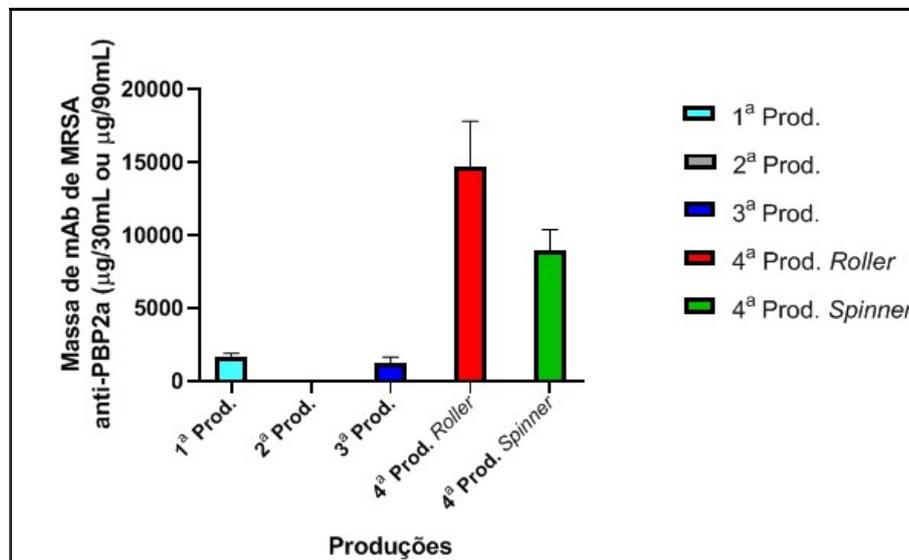


Figura 37- Massa de anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a secretado ($\mu\text{g}/30\text{mL}$ ou $\mu\text{g}/90\text{mL}$) nas produções. Destaca-se a coluna em vermelho referente a 4ª produção onde foi obtido maior concentração ($\mu\text{g}/90\text{mL}$) expresso do anticorpo monoclonal de interesse. Na 1ª produção foi obtido uma concentração de $1686 \pm 225 \mu\text{g}/30\text{mL}$ (coluna em azul claro); A 2ª produção (coluna em cinza) a concentração obtida foi de $47,7 \pm 16,65 \mu\text{g}/30\text{mL}$; 3ª produção (coluna em azul escuro) a concentração obtida foi de $42,1 \pm 13,5 \mu\text{g}/30\text{mL}$; 4ª produção em *Roller* a concentração obtida foi de $14.739 \pm 3079 \mu\text{g}/90\text{mL}$; 4ª produção em *Spinner* (coluna em verde) concentração de $9015 \pm 1387 \mu\text{g}/90\text{mL}$.

5.2 Caracterizações dos ensaios de produção do anticorpo monoclonal de MRSA

Neste tópico serão apresentados os ensaios de caracterização da primeira, terceira e quarta produções. Por apresentar um baixo rendimento, não foi possível recuperar massa suficiente na purificação para os ensaios de caracterização do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a na segunda transfecção em Erlenmeyers, no modo de produção semi-perfusão a 37 °C.

5.2.1 Ensaios de caracterização do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA na 1ª produção

A seguir serão apresentados os ensaios de caracterização do anticorpo monoclonal produzido em sistema de produção em Erlenmeyers, em batelada com uma temperatura de 37 °C após a transfecção. A avaliação eletroforética das réplicas na ausência do agente redutor, mostrou uma banda compatível com o esperado para IgG (PM aprox. 150kDa), apresentando, na réplica 1 o P.M de 157,26 kDa, na réplica 2 o peso molecular encontrado foi 155,44kDa e na réplica 3 o peso molecular foi de 140,3kDa

Esta segunda banda pode estar relacionado à microheterogeneidade na composição dos polissacarídeos do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a (Figura 38). O desvio padrão médio das medidas das amostras sem o agente redutor DTT variou entre 3-5%, o que está dentro do esperado para determinação de P.M por métodos eletroforéticos (erro <20%).

Nas condições redutoras com DTT, as réplicas exibiram duas bandas principais com pesos moleculares esperável para as cadeias polipeptídicas relativas a cadeia pesada de IgG (H aprox.50KDa) e a cadeia leve (L aprox. 25KDa), e desvio padrão de 4% para a cadeia pesada e 0,8% para cadeia leve. Os pesos moleculares das réplicas 1, 2 e 3 foram, respectivamente, de: 56,05, 55,83 e 56,27 KDa relativas à cadeia pesada. Nas réplicas 1, 2 e 3 os pesos moleculares relativos à cadeia leve apresentaram respectivamente os seguintes resultados: 23,83; 23,83 e 24,02 KDa (conforme a Figura 38).

O ponto isoelétrico (pI) foi estimado por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida (*IEF-PAGE*) em gradiente de pH 3 a 9 observa-se um perfil com uma banda, corroborando para a pequena heterogeneidade glicídica (Figura 39). A análise do perfil de focalização sugere pI de 8,7 para as três amostras com desvio

padrão de 0,01%. Algumas bandas minoritárias e difusas podem ser observadas, conforme a Figura 39. Diante das metodologias aplicadas, é possível concluir que os anticorpos monoclonais de MRSA anti-PBP2a produzidos são similares apresentando peso molecular entre 154 -157 KDa nas amostras sem agente redutor (DTT). Além disto, apresenta P.M de 53 - 56KDa para cadeia pesada e 24kDa para as cadeias leves nas amostras com DTT.

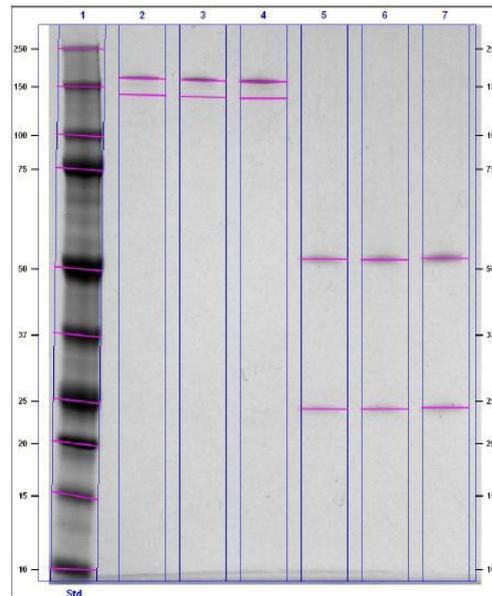


Figura 38 - Eletroforese de anticorpo anti-MRSA. Raia 1: Padrão *dual color*; Raia 2: Anticorpo réplica 1 sem DTT; Raia 3: Anticorpo réplica 2 sem DTT; Raia 4: Anticorpo réplica 3 sem DTT; Raia 5: Anticorpo réplica 1 com DTT; Raia 6: Anticorpo réplica 2 com DTT; Raia 7: Anticorpo réplica 3 com DTT.

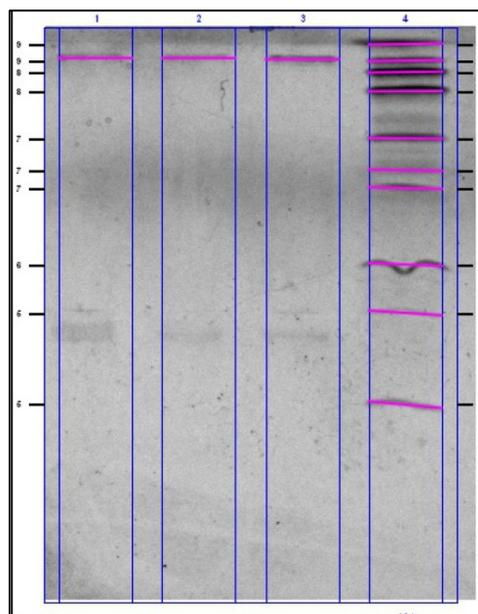


Figura 39 - Focalização isoeétrica em gel de poliacrilamida dos anticorpos anti-MRSA. Raia 1: Réplica 1; Raia 2: Réplica 2; Raia 3: Réplica 3; Raia 4: Padrão pI 5-10.

5.2.2 Ensaio de caracterização do anticorpo monoclonal MRSA anti-PBP2a 3ª produção

As amostras dos sobrenadantes da terceira produção em sistema Erlenmeyers no modo de produção em batelada a uma temperatura de 34 °C após a transfecção foram purificadas em coluna por afinidade. As amostras que não interagiram com a coluna foram coletadas e denominadas de fração não ligada. As amostras adsorvidas na matriz cromatográfica (fração ligada) foram eluídas, reunidas e neutralizadas em tampão TrisHCl 1,5M em pH 8,8 (Figura 40). Os frascos coletados, em seguida foram submetidos à análise de *SDS-Page*, por meio deste ensaio foi possível observar que as amostras do sobrenadante do cultivo apresentaram perfis heterogêneos com múltiplas bandas (Figura 41).

As frações ligadas (eluída) tiveram um perfil mais homogêneo do que o observado para as amostras não ligadas e sobrenadantes do cultivo. Na ausência do agente redutor (DTT) há a formação de uma banda principal com alto peso molecular estimado cerca de 153.32KDa a 157 KDa. Além disso, existe a presença de outras pequenas bandas com peso molecular menor que a banda principal.

Na presença do agente redutor DTT as bandas de alto peso molecular não são visualizadas e nota-se a presença de duas bandas eletroforéticas com pesos moleculares esperados para as cadeias pesada (H) e leve (L) de imunoglobulinas, com massas estimadas entre 58KDa e 61KDa (cadeia pesada) e 24.71KDa e 27.21KDa (cadeia leve). Tal resultado sugere que estas bandas correspondem ao anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a purificado na forma 2H2L, 2HL e 2H. As diferenças entre os pesos moleculares observados para as formas citadas e o experimental são menores que 20%, o que é considerado aceitável para metodologias eletroforéticas.

Na avaliação do ponto isoelétrico do anticorpo de MRSA anti-PBP2a por *IEF-PAGE* (Focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida) em gradiente de pH 3 a 9, nota-se a presença da fração ligada correspondente a mesma, correspondente ao anticorpo isolado, com a presença de duas bandas com pI igual a 8,72 e 8,68 (Figura 42).

O espectro de fluorescência apresentada na 3ª produção é um espectro típico de triptofano apresentando fluorescência máxima entre 333nm e 331nm. O triptofano é um aminoácido aromático, usado como sonda fluorescente intrínseca em proteínas, onde a absorção ocorre em 280nm e a emissão ocorre em torno de

340nm (LAVOVICKS, 2006).

Esta análise é corroborada pelos dados obtidos por Zheng et al., (2011) no qual a detecção de pico máximo de fluorescência deste anticorpo monoclonal estudado se encontra na faixa de 330-345nm.

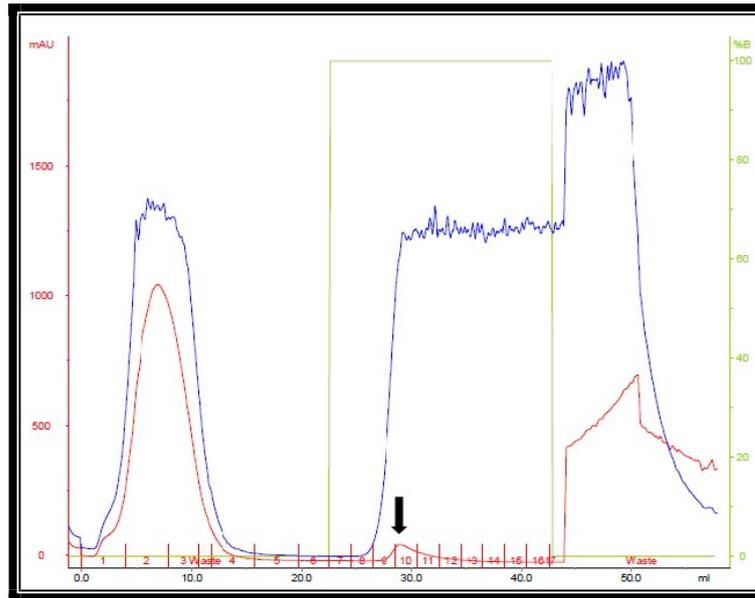


Figura 40- Perfil cromatográfico do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a na 3ª produção. Linha vermelha: absorvância a 280nm. Linha verde: eluente solução tampão B.

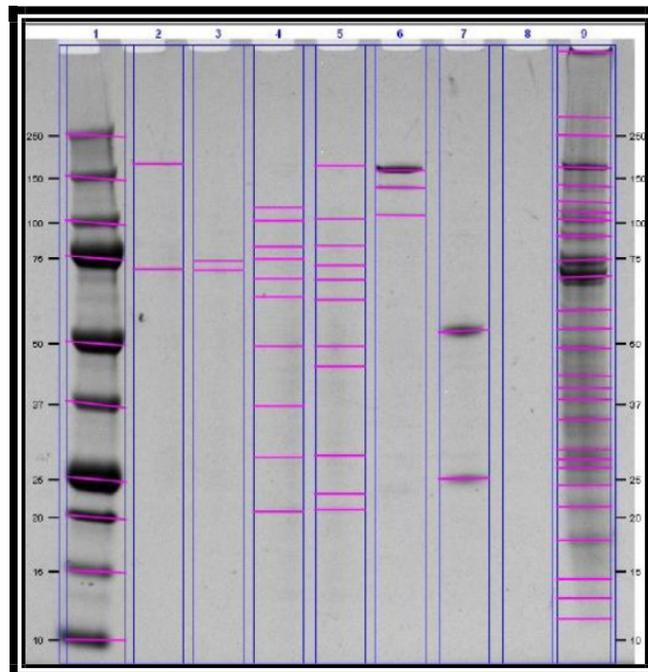


Figura 41- SDS-PAGE das frações cromatográficas provenientes da purificação de IgG MRSA anti-PBP2a na 3ª produção. Raia 1: Padrões de peso molecular *Precision Dual Color (Bio-Rad)*; Raia 2: Sobrenadante bruto (amostra não purificada) a 1 sem DT; Raia 3: Sobrenadante bruti com DTT; Raia 4: Fração não-ligada.

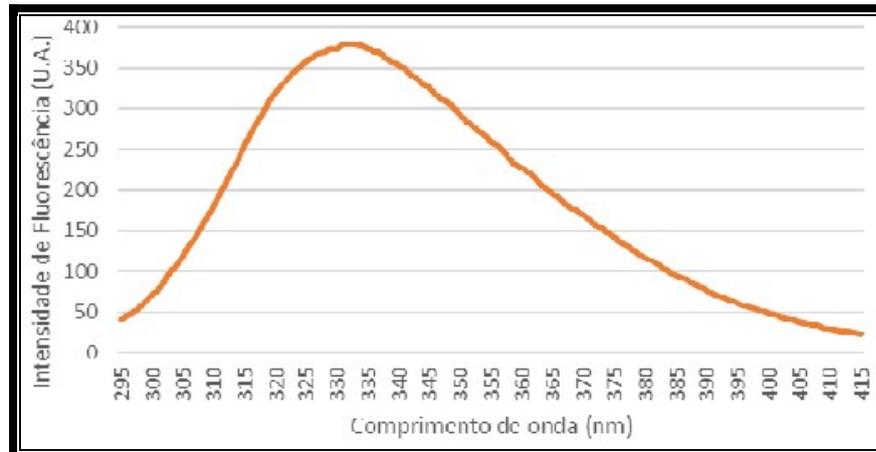


Figura 42 - Espectro de fluorescência do anticorpo monoclonal de MRSA anti- PBP2a na 3ª produção.

5.2.3 Ensaio de caracterização do anticorpo monoclonal MRSA anti-PBP2a na 4ª produção em frascos *Roller*

As amostras da 4ª produção em frascos *Roller*, no modo batelada a uma temperatura de 34 °C após a transfecção, foram purificadas em coluna de afinidade (Figura 43). A fração que não foi adsorvida à matriz representam os tubos de 1 a 4. A amostra adsorvida na matriz cromatográfica (Figura 43: tubos de 9 a 12) foi eluída com a solução tampão B (citrato de sódio 100mM pH 3,0).

As frações dos sobrenadantes que interagiram com a coluna cromatográfica, após a neutralização do pH com solução de Tris HCL 1,5M pH 8,8 foi avaliada em SDS-PAGE4-12%, juntamente com as frações que não foram adsorvidas e o sobrenadante (“amostra mãe”). As amostras do sobrenadante do cultivo (Figura 44, raia 2) e a fração não ligada (Figura 44, raias 3 e 4), apresentaram perfis complexos similares com múltiplas bandas e uma banda principal próximo a 68,5kDa, compatível com o esperado para as albuminas. A fração adsorvida na coluna apresentou um perfil mais homogêneo do que o observado nas raias 2, 3 e 4, e com ausência de banda relativa a albumina (Figura 44, raia 5 e 6). Na ausência de agente redutor observou-se uma banda principal com alto peso molecular estimado em 148kDa (Figura 44, raia 5) e outras três bandas minoritárias com peso molecular de 131,84kDa; 103,2kDa e 74,23kDa.

Na presença do agente redutor constatou-se a presença de duas bandas eletroforéticas com pesos moleculares compatíveis para as cadeias pesada (H) e leve (L) de imunoglobulinas, com massa molecular estimadas em 53kDa e 26kDa

(Figura 44 raia 6).

Na avaliação do ponto isoelétrico em gel de poliacrilamida (*IEF-PAGE*) pH 3-9 do anticorpo de MRSA anti-PBP2a realizada em duplicata e comparada com as bandas dos padrões proteicos do ponto isoelétrico (pI), foi observado apenas uma banda eletroforética para o anticorpo monoclonal com pI de 8,9 (Figura 45). O resultado da análise de fluorescência intrínseca do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a, foi analisada e pode-se concluir que o espectro de amostra é típico da fluorescência de triptofano, apresentando a fluorescência máxima de 332nm (Figura 46). Valor de detecção máxima encontrada em estudos realizados por Zheng et al., (2011), para anticorpos monoclonais foi na faixa de 330-345nm.

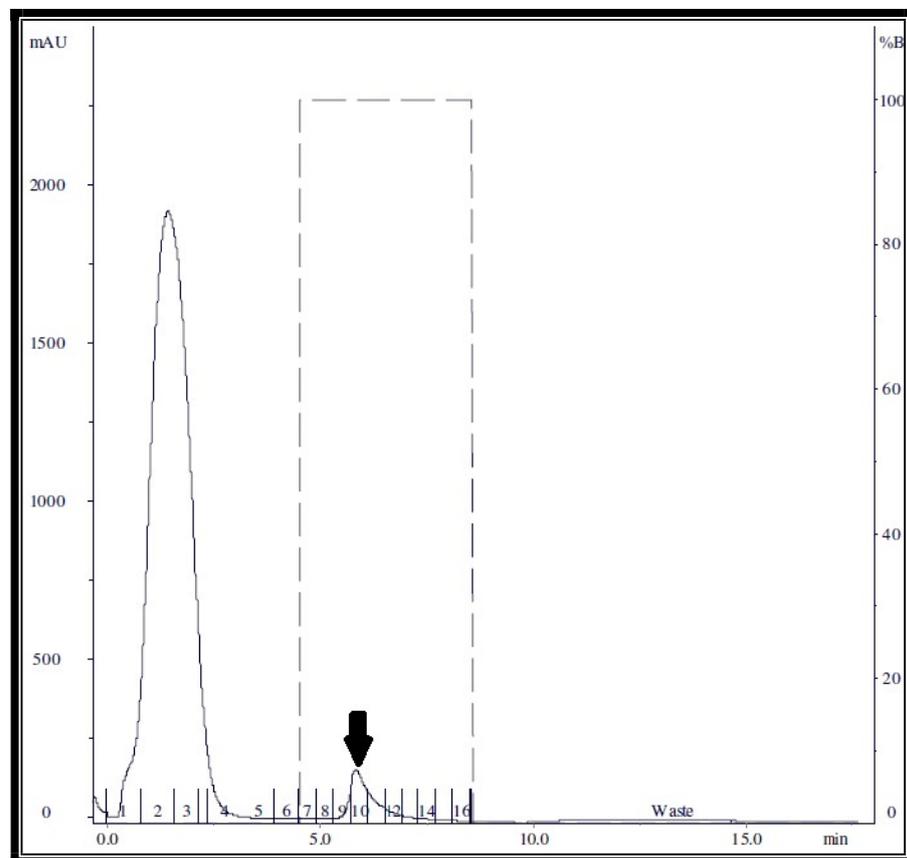


Figura 43 - Perfil cromatográfico do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a na 4ª produção em sistema *Roller*. Linha preta contínua: absorvância a 280nm. Linha preta tracejada: eluente tampão solução B.

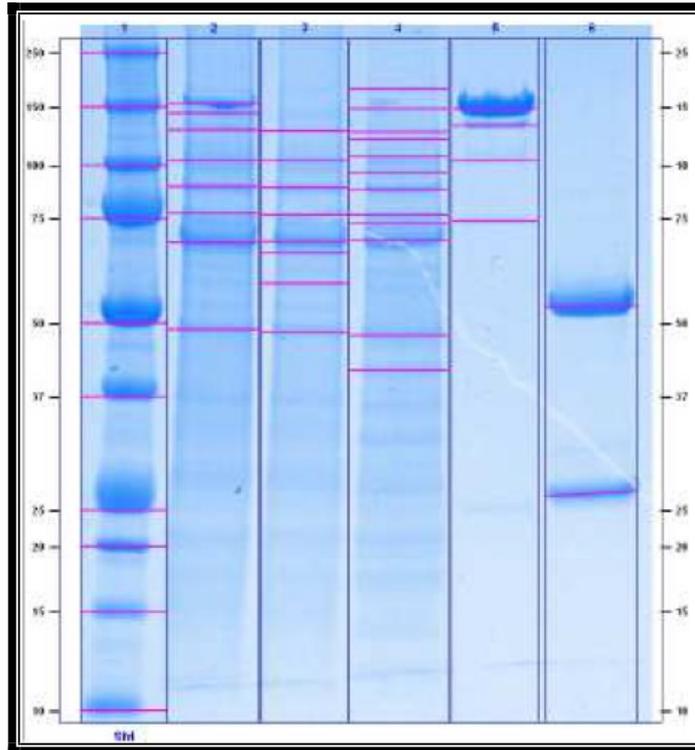


Figura 44- SDS-PAGE 4-12% das frações cromatográficas provenientes da purificação do anticorpo MRSA na 4ª produção em sistema Roller. Raia 1: padrão de peso molecular *Precision Dual Color* (Bio-Rad); Raia 2: Sobrenadante de AcM (“amostra mãe”) sem DTT; Raia 3: fração não ligada (IgG) sem DTT; Raia 4: fração não ligada (IgG) com DTT; Raia 5: fração ligada sem DTT e Raia 6: fração ligada com DTT.

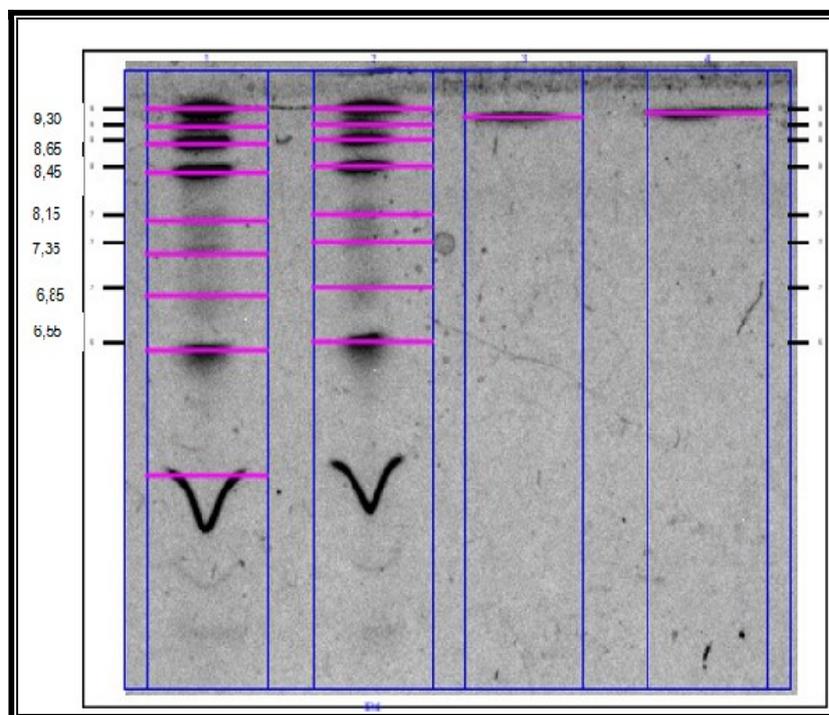


Figura 45 - IEF-PAGE pH 3-9 para estimativa do pI do anti-MRSA. Raia 1 e 2: padrões de pI 5-10 (*High*). Raias 3 e 4: anticorpo monoclonal de MRSA purificado na 4ª produção em sistema *Roller*.

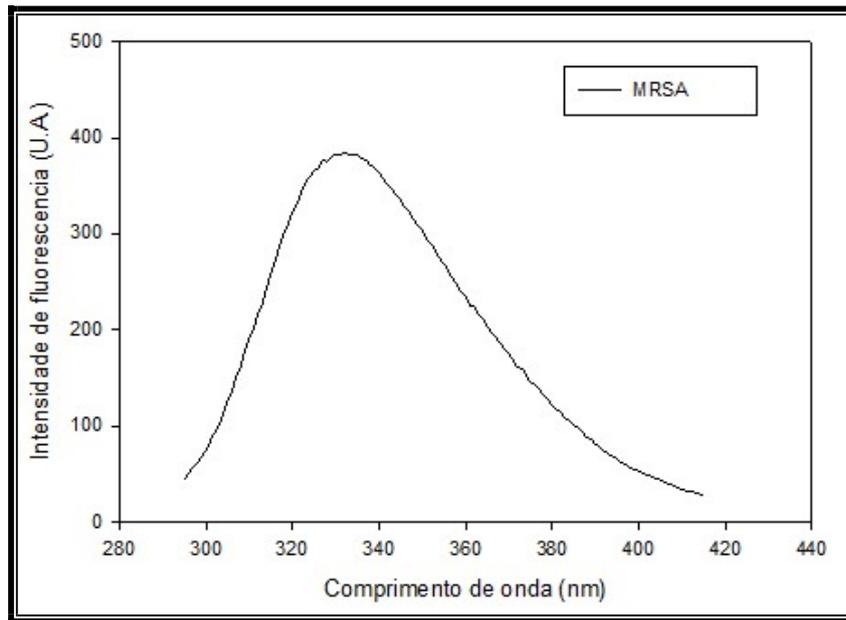


Figura 46 - Espectro de fluorescência do anticorpo monoclonal de MRSA anti- PBP2a na 4ª produção em sistema *Roller*.

5.2.4 Ensaio de caracterização do anticorpo monoclonal MRSA anti-PBP2a na 4ª produção em frascos *Spinner*

As amostras da 4ª produção em frascos *Spinner*, no modo batelada a uma temperatura de 34 °C após a transfecção foram purificadas em coluna de afinidade. A fração que não interagiu com a coluna foi coletada e denominada de fração não ligada. A amostra adsorvida na matriz cromatográfica (tubos de 11 a 12) foi eluída em único pico, com 100% da solução tampão B (citrato de sódio 100mM pH 3,0). As frações que se ligaram a matriz cromatográfica foram neutralizadas em solução tampão Tris-HCL 1,5M pH 8,8 e denominada fração eluída.

As frações coletadas (fração não ligada e fração eluída) foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE, como mostrado na Figura 47. O sobrenadante e a fração não ligada apresentaram uma banda principal com peso molecular de, aproximadamente, 70kDa, sugerindo ser albumina, que está ausente nas raia 4 e 5 (Figura 47). Na ausência do agente redutor, o anticorpo monoclonal purificado apresentou uma banda principal com peso molecular de 153,82kDa e duas bandas minoritárias com pesos moleculares estimados em: 138,97kDa e 117,71 kDa (Figura 47, raia 4).

Na presença do agente redutor as bandas de alto peso molecular não são

visualizadas e observa-se a presença de duas bandas eletroforéticas com pesos que podem corresponder às cadeias leve (H) e pesada (L) de imunoglobulinas, com massas moleculares estimadas em 64,33kDa e 27,53kDa (Figura 47, raia 5). Tal resultado sugere que as bandas observadas na raia 4 correspondem ao anticorpo monoclonal purificado na forma 2H2L, 2HL e 2H.

A avaliação do ponto isoelétrico anti-MRSA por *IEF-PAGE* (focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida) em gradiente de pH 3 a 9 apresentou apenas uma banda eletroforética com *pI* estimado em 8,6 (Figura 48). A análise da fluorescência intrínseca (Figura 49) na amostra da produção em frascos *Spinner* é um espectro típico de triptofano, apresentando fluorescência máxima de 332nm, ou seja, a fluorescência intrínseca em sistema de produção em frasco *Spinner* corresponde a faixa de absorção de proteínas que ocorre em 280nm e a emissão que ocorre em torno de 340nm.

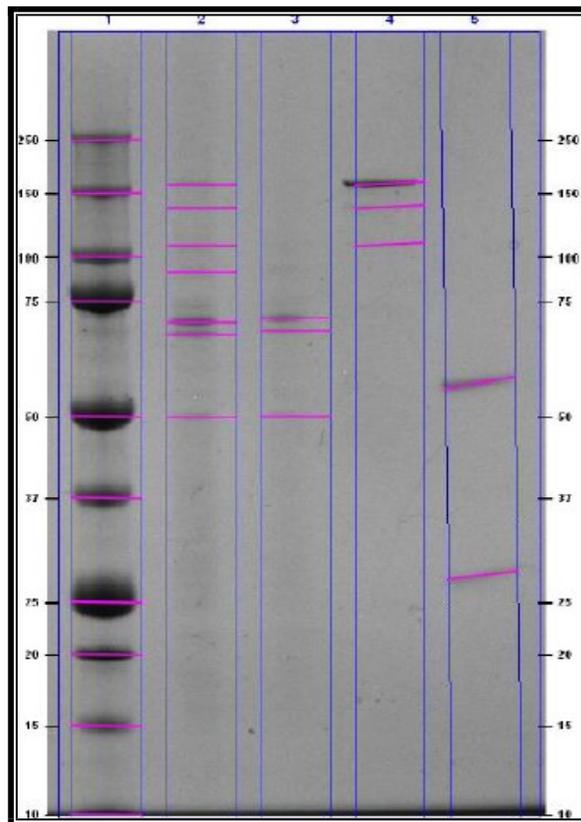


Figura 47 - *SDS-PAGE* da purificação de anticorpo anti-MRSA na 4ª produção em *Spinner* cromatografia por afinidade por proteína A. Raia 1: padrão de peso molecular *Precision Dual Color Standard* (Bio-Rad); Raia 2: sobrenadante sem DTT; Raia 3: Não ligado sem DTT; Raia 4: fração eluída sem DTT; Raia 5: fração eluída com DTT. A marcação em rosa indica a presença de uma banda.

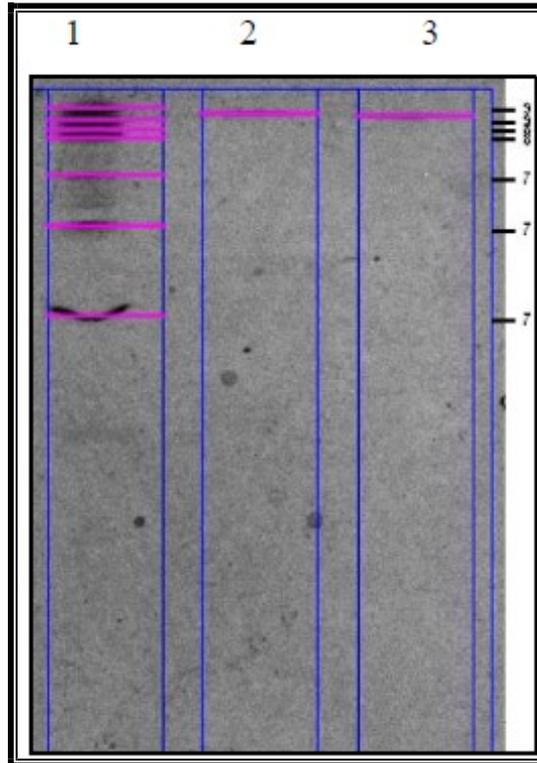


Figura 48 - Focalização isoelétrica do MRSA na 4ª produção em *Spinner*. Raia 1: *high pI Calibration Kit* pH 5-10,5 (GE Healthcare); Raias 2-3: anticorpo de MRSA.

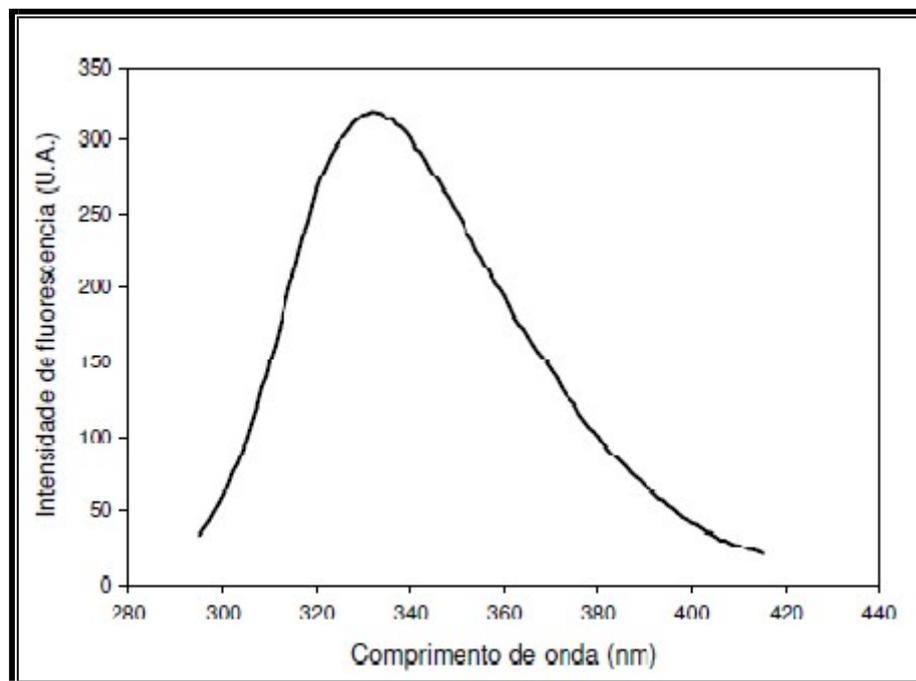


Figura49 - Espectro de fluorescência do Anticorpo Monoclonal na 4ª produção em *Spinner* em temperatura de 25°C. A amostra foi excitada a 280 nm.

6.0 CONCLUSÃO

Foram avaliados os resultados obtidos em concentração do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA. E dentre os modos de operação aplicados, a produção em batelada apresentou o melhor rendimento volumétrico quando comparado ao modelo de semi-perfusão, com trocas de meio de cultivo a cada três dias. O sistema de expressão em frasco *Roller* proporcionou um aumento na produtividade volumétrica do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA quando associado a temperatura de 34 °C induzindo as células HEK-293 a uma condição de leve hipotermia. Desta forma, pode-se concluir que o modo de produção em batelada, utilizando o sistema de expressão em frasco *Roller* foi capaz aumentar a expressão do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA.

A caracterização do anticorpo monoclonal obtido nas transfecções teve como objetivo reconhecer e identificar a molécula produzida. Os ensaios realizados, através do ELISA, da eletroforese *SDS-PAGE*, fluorescência intrínseca e focalização isoelétrica demonstraram que a proteína expressa pelas células HEK-293 de fato corresponde às características compatíveis com o anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA, não havendo mudança nessas características entre os diferentes sistemas avaliados.

Para complementar os resultados obtidos sugere-se como atividades futuras: A realização de ensaios de neutralização do anticorpo monoclonal anti-PBP2a de MRSA produzido, com finalidade de determinação da atividade biológica. Será necessário a realização de experimentos adicionais no modo de operação em semi-perfusão na temperatura de 34 °C, com objetivo de verificar a expressão do anticorpo sob esta condição, suplementando a cada troca de meio de cultura com os *enhancers* 1 e 2. Ensaios complementares para determinação dos níveis de glicose e lactato, com objetivo de obter maiores informações do metabolismo das células e expressão do anticorpo monoclonal de MRSA anti-PBP2a sob influências das temperaturas de 37 °C e 34 °C.

Os experimentos realizados foram conduzidos em escala de bancada e considerando futuras aplicações, será necessário para o início de um projeto piloto para escalonamento, a análise e avaliação das variáveis que envolvem o processo.

7.0 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Brasil: Elsevier, 2015.

ABBOTT, W. M.; MIDDLETON, B. KARTBERG, F.; CLAESSON, J.; ROTH, R.; FISHER, D. Optimisation of a simple method to transiently transfect a CHO cell line in high-throughput and at large scale. **Protein Expression and Purification**. 2015.116:113-9.

ACTIP- Animal Cell Technology Industrial Platform. Monoclonal antibodies approved by the EMA and FDA for therapeutic use. 2007. Disponível em: <<http://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use/>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.html>. Acesso em: 20 maio 2018.

ARAÚJO, A. C. C. de. **Obtenção de anticorpos monoclonais humanizados anti-MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) empregando o sistema de expressão transitória EXPI293™ e avaliação da sua reatividade à proteína PBP2a**. Dissertação de mestrado, Rio de Janeiro, MPTI-BioManguinhos;2017.

BETTINARDI, I. W. **Desenvolvimento de estratégias de alimentação com meios concentrados para cultivo de células animais em perfusão**. Dissertação de mestrado, Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia-UFRJ.2016. 115 p.

BIBILA, T., ROBINSON, D. In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. **Biotechnology Progress**, v. 11, p. 1-13, 1995.
BOULIANNE, G. L.; HOZUMI, N.; SHULMAN, M. J. Production of Functional Chimaeric mouse/human antibody. **Nature**. 1984.312(5995):643–6.

Brun-Graepi AKAS, Richard C, Bessodes M, Scherman D, Merten O-W. **Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers**. Journal of Controlled Release 2011; 149(3):209-24.

CASTILHO, L.; MEDRONHO, R. A. Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures. **Tools and applications of Biochemical Engineering Science**, 2002; 74: 129-169.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. New concepts in antibody-mediated immunity. **Infection and Immunity**. 2004; 72(11):6191-6196.

CHAMES, P.; REGENMORTEL, M. V.; WEISS, E.; BATY, D. Therapeutic antibodies:

successes, limitations and hopes for the future. **British Journal of Pharmacology**. 2009, may, 157(2):220-233.

CHARTRAIN, M.; CHU, L. Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. 2008. 9(6): 447-67.

CHICO, E.; RODRIGUES, G.; FIGUEIREDO, A. **Biorreatores para células animais**. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Roca, 2008.

CORRÊA, A. L. Obtenção de anticorpos monoclonais anti-PBP2a *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina através do cultivo de células de hibridomas em frasco do tipo *Spinner*. Dissertação de mestrado, Rio de Janeiro, MPTI-BioManguinhos; 2013.

CORRÊA, A. L.; SENNA, J. P.; DE SOUSA, A. P. Effects of passage number on growth and productivity of hybridoma secreting MRSA anti-PBP2a monoclonal antibodies. **Cytotechnology**. Rio de Janeiro, 2016. 68(3):419-27.

CORONEL, J. et al. **Valeric acid supplementation combined to mild hypothermia increases productivity in CHO cell cultivations**. Brasil: Elsevier, 2016, v. 114, p.101-109.

DELOITTE. 2016. **Global life sciences Outlook**: Moving forward with cautious optimism. Boston, Massachusetts.

DEL FIOLE, F. de S. et al. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. São Paulo: Sorocaba, 43(1):68-72, 2010.

ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. 2015. **The therapeutic monoclonal antibody market**. *Journal of Monoclonal Antibodies - MAb*. 7(1):9-14.

ELBAKRI, A.; NELSON, P. N.; ODEH, R. O. A. The state of antibody therapy. **Rev. Human Immunology**. Elsevier. 2010. 71:1243-1250.

FLOSS, D. M.; FALKENBURG, D.; CONRAD, U. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: An overview. **Transgenic Research**. 2007. 16(3):315-32.

GOFFIN, C.; GHUYSEN, J. M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 1998. 62(4):1079-93.

GAUGHAN, C.L. The present state of the art in expression, production and characterization of monoclonal antibodies. **Molecular Diversity**. 2016. 20(1):255-70.

HONG, M. S.; KRISTEN, A. S.; JIANG, M.; AMOS E. L.; LOVE, J. C.; BRAATZ, R. C.

Challenges and opportunities in biopharmaceutical manufacturing control. Elsevier. 2017.106:114.

JAIN, E.; KUMAR, A. **Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters.** Elsevier. 2008.46:72.

JONES, P. T.; DEAR, P. H.; FOOTE, J.; NEUBERGER, M. S.; WINTER, G. Replacing the complementary- determining regions in a human antibody with those from a mouse. **Nature.** 1986. 321(6069):522-5.

KADOSAKI, L. L.; SOUSA, S. F.; BORGES, J. C. M. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. **Rev. Bras. Farm.** 2012. Rio de Janeiro.3(2):128-135.

KUYSTERMANS, D.; AL-RUBEAI, M. **Bioreactor systems for producing antibody from mammalian cells.** In: AL-RUBEAI, M. *Antibody Expression and Production*, v. 7. 1.ed. cap. 2. London:Springer Dordrecht Heidelberg, 2011.

KAUFMANN, S. H. E. Emil Von Behring: translational medicine at the dawn of immunology. **Nat.Rev. Immunology**, jun. 2017(6): 341-343.

KUMAR, S.; WITTMANN, C.; HEINZLE, E. Minibioreactors. **Biotechnology Letters.** 2004.26(1):1-10.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy.** Springer.3. ed. University of Maryland School of Medicine Baltimore, Maryland, USA. 2006.

LIN, C-Y.; HUANG, Z.; WEN, W.; WU, A.; WANG, C.; NIU, L. Enhancing Protein Expression in HEK-293 Cells by Lowering Culture Temperature. **PLoS ONE.** 2015. 10(4): e0123562.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial. Processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Blucher. v. 3, 1. ed. 2002. 616p.

LITTMANN, Jasper; RID, Annette; BUYX, Alena. Tackling anti-microbial resistance: ethical framework for rational antibiotic use. **The European Journal of Public Health**, [S.l.], Vol. 28, No. 2, p. 359–363.cv

MELLADO, M. C. M.; CASTILHO, L. R. Recombinant therapeutic proteins. In: CASTILHO, L. R.; MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. **Animal Cell Technology: from biopharmaceutic also gene therapy.** 1. ed., cap. 16. New York: Taylor&Francis, 2008.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica.** 1. ed. São Paulo: Roca. 2008. p. 15-41.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz. J. Resanim.** São Paulo. 2005. 42(6):465-470.

MURAD, A. B. **Avaliação de alternativas de meio de cultivo para a produção da eritropoetina humana recombinante expressa em células CHO em suspensão.** Dissertação Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2015. 103 p.

OLEKSIEWICZ, M. B.; NAGY, G.; NAGY, E. Anti-bacterial monoclonal antibodies: back to the future? **Arch Biochem Biophys.** 2012. 526(2):124-31.

O'NEILL, J. **Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations - The Review on Antimicrobial Resistance.** may 2016.

ONZI, P. S.; HOFFMAN, S. P.; CAMARGO, A. L. Avaliação do consumo de antimicrobianos injetáveis de um hospital privado no ano de 2009. **Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde.** São Paulo, v. 2, n. 2, p. 20-25. 2011.

Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. **Technological progresses in monoclonal antibody production systems.** *Biotechnology Progress* 2010;26(2):332-51.

SANTOS, R. V.; LIMA, P. M. G.; NITSCHKE, A.; MARTH, F. M.; MELO, F. Y.; AKAMATSU, H. T.; LIMA, H. C. Aplicações terapêuticas de anticorpos monoclonais. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia.** 2006. v. 29(2):77-85.

SENNA, J. P.; TEXEIRA, M. G.; SANTIAGO, M. A.; BATORÉU, N. M.; VALADARES, N.; GALLER, R. Generation and Characterization of Murine Monoclonal Antibodies anti-PBP2a of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **RG Journal Impact.** Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy. Rio de Janeiro. 2015. 34(4):257-62.

SHIMIZU, H.; NAKAGAWA, M.; TODAKA, N.; IMAIZUMI, K.; KUROSAWA, Y.; MARUYAMA, T.; OKUMURA, C. J.; SHIBATA, T.; TANAKA, Y.; SATO, Y.; ONO, Y.; AKUTA, T. Improving the quality of a recombinant rabbit monoclonal antibody against PLXDC2 by optimizing transient expression conditions and purification Method. **Protein Expr Purif.** 2018. 146:27-33

TAMASHIRO, W. M.; AUGUSTO, E. F. P. Monoclonal antibodies. In: CASTILHO, L. R.; MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. **Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to gene therapy**, 1. ed. cap. 11. New York: Taylor&Francis, 2008.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. Expi293TM Expression System *Kit*. Disponível em: <<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A14635>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

Véliz EC, Rodríguez G, Cardero AF. Biorreatores para Células Animais. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR. (eds.), **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica.** Editora Roca, São Paulo; 2008. p. 216-54

WALSH, G. Second-generation biopharmaceuticals. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** 2004. 58(2):185-196.

Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. **Nature Biotechnol**, 2014 Oct; 10(32):992-1000.

ZANATTA, A. S. **Obtenção do anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2 em diferentes meios e sistemas de cultivos**. Instituto Oswaldo Cruz. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Pós-graduação em Biologia celular e molecular. Dissertação de mestrado profissional em Tecnologia de Imunobiológicos. Rio de Janeiro. 2009. 80 p.

ZHANG, L.; SHEN, H.; ZHANG, Y. Fed-batch culture of hybridoma cells in serum-free medium using an optimized feeding strategy. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 2004. 79:171–181.

ANEXO A ANTICORPOS MONOCLONAIS

Nome comercial	Nome internacional	Companhia	Alvo	Tipo	Primeira aprovação na União Europeia (EMA – agência europeia de medicamentos)	Primeira aprovação nos Estados Unidos (FDA – agência de drogas e alimentos)	Linhagem celular	Indicações terapêuticas
Amjevita®	Adalimumab	Amgen Europe	TNF α	IgG1 Humano	2017	2016	CHO	Artrite; artrite reumatóide juvenil e colite; doença de Crohn ulcerativa; psoríase; espondilite; anquilosante
Zinplava™	Bezlotoxumab	Merck Sharp & Dohme Limited	C. difficile toxina B	Anticorpo antitoxina monoclonal humana	2017	2016	CHO	Enterocolite; pseudomembranosa
Bavencio®	Avelumab	Merck Sharp & Dohme Limited	PD-L1	Humano IgG1/ κ	Não aprovado	2017	CHO	Célula metastática de Merkelcarcinoma
Dupixent®	Dupilumab	Regeneron Pharmaceuticals Inc	IL-4R α	Humano IgG4	Não aprovado	2017	CHO	Asma; dermatite
Imfinzi®	Durvalumab	Astrazeneca UK	PD-L1	Humano IgG1/ κ	Não aprovado	2017	CHO	Carcinoma urotelial metastático
Ocrevus™	Ocrelizumab	Genentech (Roche)	CD20	Humanizado IgG1 κ	Não aprovado	2017	CHO	Esclerose múltipla
Siliq	Brodalumab	Valeant Pharmaceuticals internacional	IL-17RA	Humano IgG2/ κ	Carcinoma urotelial metastático	2017	CHO	Psoríase
Cinqair™	Reslizumab	Teva Pharmaceuticals Limited	IL-5	Humano IgG4/ κ	2016	2016	NSO	Asma
Lartruvo	Olaratumab	Eli Lilly	PDGFR- α	Humano IgG1	2016	2016	CHO	Sarcoma
Darzalex®	Daratumumab	Janssen-Cilag	CD38	Humano IgG1/ κ	2016	2015	CHO	Mieloma múltiplo
Empliciti	Elotuzumab	Bristol-Myers Squibb	SLAMF7	Humano IgG1	2016	2015	NSO	Mieloma Múltiplo

Nome comercial	Nome internacional	Companhia	Alvo	Tipo	Primeira aprovação na União Européia (EMA – agência europeia de medicamentos)	Primeira aprovação nos Estados Unidos (FDA – agência de drogas e alimentos)	Linhagem celular	Indicações terapêuticas
Portrazza	Necitumumab	Eli Lilly	EGFR	Humano IgG1	2016	2015	NS0	Carcinoma pulmonar de células
Inflixtra	Infliximab	Hospira UK Limited	TNF α	Quimérico humano murino IgG1	2013	2016	Sp2/0-Ag14	Espondilite; anquilosante; artrite; colite reumatóide; artrite ulcerativa; doença de Crohn psoriática; psoríase
Anthim®	Obiltoximab	Elusys Therapeutics INC	PA component of B. anthracis toxin	Quimérico (camundongo/humano) IgG1/ κ	Não aprovado	2016	NS0	Infecção por Antrax
Tecentriq®	Atezolizumab	Genentech (Roche)	PD-L1	Humano IgG1	Não aprovado	2016	CHO	Câncer de pulmão de células não pequenas metastático
Cosentyx™	Secukinumab	Novartis Europharm	interleucina-17A	Humano IgG1/ κ	2015	2015	CHO	Artrite; psoríase psoriática; espondilite; anquilosante
Nucala	Mepolizumab	GlaxoSmithKline	IL-5	Humano IgG1/ κ	2015	2015	CHO	Asma
Opdivo	Nivolumab	Bristol-Myers Squibb Pharma	PD-1	Humano IgG4	2015	2015	CHO	Carcinoma; carcinoma pulmonar de células não pequenas; melanoma da doença de Hodgkin da célula renal
Praluent	Alirocumab	sanofi-aventis groupe	PCSK9	Humano IgG1	2015	2015	CHO	Dislipidemias
Praxbind®	Idarucizumab	Boehringer Ingelheim International GmbH	dabigatran etexilate	Humano FaB	2015	2015	CHO	Hemorragia
Repatha®	Evolocumab	Amgen	LDL-C / PCSK9	Humano IgG2	2015	2015	CHO	Dislipidemias; hipercolesterolemia
Unituxin (1)	Dinutuximab	United Therapeutics Europe	GD2	Humano IgG1/ κ	2015	2015	Sp2/0	Neuroblastoma
Blincyto®	Bevacizumab	Amgen Europe	CD19	BiTEs	2015	2014	CHO	Leucemia Linfoma Linfoblástica Precursora
Keytruda®	Pembrolizumab	Merck Sharp & Dohme Limited	PD-1	Humano IgG4	2015	2014	CHO	Melanoma

Nome comercial	Nome internacional	Companhia	Alvo	Tipo	Primeira aprovação na União Européia (EMA – agência europeia de medicamentos)	Primeira aprovação nos Estados Unidos (FDA – agência de drogas e alimentos)	Linhagem Celular	Indicações terapêuticas
Cyramza	Ramucirumab	Eli Lilly	VEGF	Humano IgG1	2014	2014	NS0	Neoplasias gástricas
Entyvio®	Vedolizumab	Takeda Pharma	Integrin- $\alpha4\beta7$	Humanizado IgG1	2014	2014	CHO	Colite; doença de Crohn ulcerativa
Sylvant®	Siltuximab	Janssen-Cilag International	cCLB8	Quimérico IgG1 κ	2014	2014	CHO	Hiperplasia linfonodal gigante
Lemtrada®	Alemtuzumab	Sanofi	CD52	Humanizado IgG1	2013	2014	CHO	Esclerose múltipla
Kadcyla®	Trastuzumab emtansine	Roche	HER2	Humanizado IgG1 as ADC	2013	2013	CHO	Câncer de mama
Perjeta®	Pertuzumab	Roche	HER2	Humanizado IgG1	2013	2012	CHO	Câncer de mama
Remsima®	Infliximab	Celltrion Healthcare	TNF-alpha	Quimérico IgG1 Ab	2013	Não aprovado	CSC-Ps0006	Espondilite; artrite anquilosante; colite reumatóide; doença de Crohn ulcerativa; artrite; psoríase psoriásica
Gazyvaro®	Obinutuzumab	Roche	CD20	Humanizado IgG1	Não aprovado	2013	CHO	CLL
Adcetris®	Brentuximab	Seattle Genetics	CD30 (conjugate of Mab and MMAE)	Quimérico IgG1 como ADC (conjugado de anticorpo e fármaco)	2012	2011	CHO	Linfoma de Hodgkin (HL), linfoma anaplásico de grandes células (ALCL)

Nome comercial	Nome internacional	Companhia	Alvo	Tipo	Primeira aprovação na União Européia (EMA – agência européia de medicamentos)	Primeira aprovação nos Estados Unidos (FDA – agência de drogas e alimentos)	Linhagem celular	Instruções terapêuticas
ABthrax®	Raxibacumab	HGS (Human Genome Sciences Inc.)	Antígeno protetor do Bacillus anthracis	Humano IgG1	Não aprovado	2012	NS0	Prevenção e tratamento de antraz por inalação
Benlysta®	Belimumab	HSG, GSK	BLyS	Humano IgG1	2011	2011	NS0	Lúpus eritematoso sistêmico (LES)
Vervoy®	Ipilimumab	BMS	CTLA-4	Humano IgG1	2011	2011	CHO	Melanoma
Xgeva®	Denosumab	Amgen	RANKL	Humano IgG2	2011	2011	CHO	Prevenção de SREs em pacientes com metástases ósseas de tumores sólidos
Prolia®	Denosumab	Amgen	RANKL	Humano IgG2	2010	2010	CHO	Osteoporose
Arzerra®	Ofatumumab	Genmab and GSK	CD20	Humano IgG1	2010	2009	NS0	Leucemia linfocítica crônica
Scintimun® (Diagnostic)	Besilesomab	CIS Bio	NCA-95	Murino IgG1	2010	Não aprovado	Hibridoma	Diagnóstico <i>in vivo</i> de sítios de inflamação /infecção por imagem cintilográfica -> não- terapêutico
RoActemra®	Tocilizumab	Chugai (Roche)	IL-6 receptor	Humanizado IgG1	2009	2010	CHO	Artrite reumatóide
Ilaris®	Canakinumab	Novartis	IL-1β	Humano IgG1	2009	2009	Sp2/0	Síndromes periódicas associadas à criopirina, incluindo Síndrome autoinflamatória familiar do resfriado e Síndrome de Muckle-Wells; Síndrome periódica associada ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAPS) ; Síndrome de hiperimunoglobulina D (HIDS) deficiência de mevalonato quinase (MKD) e febre familiar mediterrânea (FMF)

Nome comercial	Nome internacional	Companhia	Alvo	Tipo	Primeira aprovação na União Européia (EMA – agência europeia de medicamentos)	Primeira aprovação nos Estados Unidos (FDA – agência de drogas e alimentos)	Linhagem celular	Indicações terapêuticas
Simponi®	Golimumab	Centocor Ortho Biotech (Johnson & Johnson)	TNF α	Humano IgG1	2009	2009	Sp2/0	Artrite reumatóide; artrite psoriática; espondilite anquilosante
Stelara®	Ustekinumab	Centocor Ortho Biotech (Johnson & Johnson)	IL-12 / IL-23	Humano IgG1	2009	2009	Sp2/0	Placa psoríase
Cimzia®	Certolizumab pegol	UCB	TNF α	Humanizado IgG Fab fragmento	2009	2008	E. coli	Doença de Crohn; artrite reumatóide
Removab®	Catumaxomab	Fresenius	EpCAM and CD3	Trifuncional MAb IgG2a / IgG2b	2009	Não aprovado	Hibridoma híbrido Rato-camundongo	Ascite maligna em pacientes com carcinomas EpCAM-positivos
Soliris®	Eculizumab	Alexion Pharmaceuicala	Complemento C5	Humanizado IgG2/4	2007	2007	NS0	Hemoglobinúria paroxística noturna
Lucentis®	Ranibizumab	Genentech (Roche)	VEGF-A	Humanizado IgG1 Fab fragmento	2007	2006	E. coli	Degeneração macular neovascular (úmida) relacionada à idade; edema macular após oclusão da retina
Vectibix®	Panitumumab	Amgen	EGFR	Humano IgG2	2007	2006	CHO	Carcinoma colorretal metastático
Tysabri®	Natalizumab	Biogen Idec and Elan	VLA-4	Humanizado IgG4	2006	2004	Mieloma Murino	Esclerose múltipla (recaída); Doença de Crohn

Nome comercial	Nome internacional	Companhia	Alvo	Tipo	Primeira aprovação na União Européia (EMA –agência européia de medicamentos)	Primeira aprovação nos Estados Unidos (FDA - agência de drogas e alimentos)	Linhagem celular	Indicações terapêuticas
Proxinium®	Catumaxomab	Viventia (Eleven Biotherapeutics)	EpCAM	Humanizado MAb	2005	2005	CHO	Câncer de cabeça e pescoço
Avastin®	Bevacizumab	Genentech (Roche)	VEGF	Humanizado IgG1	2005	2004	CHO	Câncer colorretal metastático; cancro do pulmão de células não pequenas; câncer de mama metastático; hlioblastoma multiforme; carcinoma de células renais metastático
Xolair®	Omalizumab	Genentech (Roche) and Novartis	IgE	Humanizado IgG1	2005	2003	CHO	Asma
Erbix®	Cetuximab	ImClone (Eli Lilly), Merck Serono and BMS	EGFR	Quimérico IgG1	2004	2004	Sp2/0	Câncer de cabeça e pescoço; câncer colorretal
Raptiva®	Efalizumab	Merck Serono, Genentech (Roche)	CD11a	Humanizado IgG1	2004 (2)	2003 (2)	CHO	Psoríase
Zevalin®	Ibritumomab tiuxetan	Biogen Idec	CD20	Murino IgG1	2004	2002	CHO	Linfoma não-Hodgkin
NeuroSpec® (Diagnostic)	Fanolesomab	Palatin	CD15	Murino MAb	Não aprovado	2004	Hibridoma	Imagem de apendicite equívoca -> não terapêutica
Humira®	Adalimumab	Abbott	TNFα	Humano IgG1	2003	2002	CHO	Artrite reumatóide; artrite idiopica juvenil; artrite psoriática; espondilite anquilosante; Doença de Crohn, psoríase em places

Nome comercial	Nome internacional	Companhia	Alvo	Tipo	Primeira aprovação na União Européia (EMA – agência européia de medicamentos)	Primeira aprovação nos Estados Unidos (FDA – agência de drogas e alimentos)	Linhagem celular	Indicações terapêuticas
Bexxar®	Tositumomab and iodine 131 tositumomab	Corixa and GSK	CD20	Murino IgG2a	Não aprovado	2003	Hibridoma	Linfoma não –Hodgkin
Campath®	Alemtuzumab	Millennium Pharmaceuticals and Genzyme	CD52	Humanizado IgG1	2001	2001	CHO	Leucemia linfocítica crônica de células B
Herceptin®	Trastuzumab	Genentech(Roche)	HER-2	Humanizado IgG1	2000	1998	CHO	Câncer de mama; adenocarcinoma gástrico metastático ou junção gastroesofágica
Mylotarg®(3)	Gemtuzumab ozogamicin	Wyeth	CD33	Humanizado IgG4 / toxina conjugado	Não aprovado	2000 (3)	NS0	Leucemia mieloide aguda (LMA))
Remicade®	Infliximab	Centocor Ortho Biotech (Johnson & Johnson)	TNF α	Quimérico IgG1	1999	1998	Sp2/0	Doença de Crohn; Colite ulcerative; artrite reumatóide; espondilite aquilosa
Synagis®	Palivizumab	MedImmune, Abbott	F-protein of RS virus	Humanizado IgG1	1999	1998	NS0	Vírus sincicial respiratório (RSV)
Daclizumab	Necitumumab	Roche	CD25 (a chain of IL2 receptor)	Humanizado IgG1	1999 (4)	1997 (4)	Sp2/0	Reversão da rejeição de transplante
Simulect®	Basiliximab	Novartis	CD25 (a chain of IL2 receptor)	Quimérico IgG1	1998	1998	NS0	Reversão da rejeição de transplante
Rituxan® MabThera®	Rituximab	Biogen Idec, Genentech (Roche)	CD20	Quimérico IgG1	1998	1997	CHO	Linfoma não-Hodgkin; Leucemia linfocítica crônica; artrite reumatóide

Nome comercial	Nome internacional	Companhia	Alvo	Tipo	Primeira aprovação na União Européia (EMA – agência européia de medicamentos)	Primeira aprovação nos Estados Unidos (FDA – agência de drogas e alimentos)	Linhagem celular	Indicações terapêuticas
Humaspect® (Diagnostic) (5)	Votumumab	Organon Teknica	Antígeno associado a citoqueratina-tumor		1998 (5)	Não aprovado	Linha celular linfoblástica humana transformada com EBV	Deteção de carcinoma do cólon ou reto -> não terapêutico
LeukoScan® (Diagnostic)	Sulesomab	Immunomedics	NCA90	Murino Fab fragmento	1997	Não aprovado	NS0	Diagnóstico por imagem para forosteomielite -> não terapêutico
CEA-scan® (Diagnostic) (6)	Arcitumomab	Immunomedics	CEA humano (antígeno carcinoembrionário)	Fragmento Fab murino	1996 (6)	1996	Hibridoma	Deteção de câncer colorretal -> não terapêutico
MyoScint® (Diagnostic) (7)	Imicromab	Centocor	Miosina cardíaca humanóide	Fragmento Fab murino	Não aprovado	1996 (7)	Ascites murinos	Agente de imagem de enfarte do miocárdio -> não terapêutico
ProstaScint® (Diagnostic)	Capromab	Cytogen	Antígeno de superfície tumoral PSMA	Murine MAb	Não aprovado	1996	Hibridoma	Deteção de adenocarcinoma da próstata -> não terapêutico
Verluma® (Diagnostic)	Nofetumomab	Boehringer Ingelheim, NeoRx	Antígeno Associado ao Carcinoma	Fragmento Fab murino	Não aprovado	1996	Hibridoma	Diagnóstico por imagem de câncer de pulmão de pequenas células -> não terapêutico
ReoPro®	Abciximab	Centocor Ortho Biotech (Johnson & Johnson), Eli Lilly	GPIIb/IIIa	Quimérico IgG1 Fab	1995 (8)	1994	Sp2/0	Angioplastia de alto risco (prevenção de coágulos sanguíneos)
OncoScint®	Satumomab	Cytogen	TAG-72	Murino MAb	Não aprovado	1992	Hibridoma	Deteção de cânceres colorretal e ovariano -> não terapêutico
Orthoclone OKT3®	Muromonab-CD3	Centocor Ortho Biotech (Johnson & Johnson)	CD3	IgG2a	1986 (8)	1986	Hibridoma	Rejeição de transplante

ANEXO A - Anticorpos monoclonais aprovados pela Agência Europeia de Medicina (EMA) e *Food and Drug Administration* (FDA) para uso terapêutico (2017). Fonte: **ACTIP**- Animal Cell Technology Industrial Platform. Monoclonal antibodies approved by the EMA and FDA for therapeutic use. 2007. Disponível em: < <http://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use/>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

Nota:

- (1) Unituxin foi retirado de uso na União Européia.
- (2) O Raptiva® foi aprovado em 2003 pelo FDA e em 2004 pela EMA. Foi voluntariamente retirado do mercado na União Européia e nos Estados Unidos em 2009.
- (3) O Mylotarg® foi aprovado em 2000 pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Foi voluntariamente retirado do mercado nos EUA em 2010.
- (4) Zenapax® foi aprovado em 1997 pela *Food and Drug Administration* (FDA) e em 1999 pela Agência Européia de Medicamentos (EMA). Foi retirado do mercado por razões comerciais na União Européia em 2009 e nos Estados Unidos em 2009.
- (5) O Humaspect® foi aprovado em 1998 pela Agência Européia de Medicamentos (EMA). Foi retirado do mercado na União Européia em 2003.
- (6) O CEA-scan foi aprovado em 1996 pelo *Food and drug administration* (FDA) e pela Agência Européia de Medicamentos EMA. Foi retirado do mercado na União Européia em 2005.
- (7) Myoscint® foi descontinuado.
- (8) Aprovação específica do país (antes do procedimento centralizado da Agência Européia de Medicamentos (EMA)).