

Joaquim Miguel dos Santos Fonseca

**Impacto dos Biorreatores de perfusão na Produção de  
Biofármacos**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2018



Joaquim Miguel dos Santos Fonseca

Impacto dos Biorreatores de perfusão na Produção de  
Biofármacos

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto 2018

Joaquim Miguel dos Santos Fonseca

## Impacto dos Biorreatores de perfusão na Produção de Biofármacos

Trabalho original realizado por:

---

(Joaquim Miguel dos Santos Fonseca)

Trabalho apresentado à  
Universidade Fernando Pessoa  
como parte dos requisitos da  
obtenção do grau de mestre em  
Ciências Farmacêuticas.



## Resumo

Os biorreatores têm um papel central na indústria biofarmacêutica, como sistemas artificiais de crescimento e manutenção das culturas celulares. Este facto motivou contínuos esforços nos últimos 50 anos com vista ao seu aperfeiçoamento em termos de desenho e operacionalidade visando a obtenção de unidades processuais cada vez mais eficientes.

Apesar das configurações *batch* e *fed-batch* serem ainda as mais utilizadas pela indústria apresentam várias limitações como: elevado tempo de inatividade entre lotes; volumes finitos de cultura; custos mais elevados e análises prévias exaustivas de microrganismos e células animais para entender os seus requisitos em relação à sua formulação e produtividade.

Assim gradualmente a indústria biofarmacêutica tem procurado alterar o paradigma para a produção em modo contínuo em perfusão. A perfusão é o processo contínuo de alimentação da fermentação, com cultura permanentemente fresca, enquanto as células ficam retidas em dispositivos de retenção no biorreator.

A colheita em modo contínuo; a remoção contínua dos produtos instáveis; a maior produtividade de volume; modelos *scale-down* mais compactos; densidade celular maior dos produtos; operação de fabrico durante períodos mais longos e a redução dos custos operacionais são algumas das vantagens que os biorreatores de perfusão apresentam face aos modelos tradicionais *batch* e *fed-batch*.

No momento já existem diversas empresas como a Sanofi©, Merk© e Bayer© que já utilizam o bioprocesso de perfusão, nas suas unidades fabris para a produção de biofármacos.

O presente trabalho, apresenta uma visão do processo biotecnológico que utiliza os biorreatores em contínuo no modo perfusão procurando antecipar qual irá ser o seu impacto, na indústria farmacêutica.

**Palavras-chave:** Biorreatores, Biofármacos, Perfusão, Bioprocesso contínuo

## **Abstract**

Bioreactors play a central role in the biopharmaceutical industry, as artificial systems for growing and maintaining cell cultures. This has led to continuous efforts over the last 50 years to improve its design and operation in order to obtain more efficient units.

Although batch and fed-batch reactor configurations are still the most used by the industry, they present several limitations such as: high batch downtime; finite volumes of culture; higher costs and a thorough pre-analysis of microorganisms and animal cells in order to understand their requirements in terms of formulation and productivity.

Gradually the biopharmaceutical industry has sought to change the paradigm for continuous production in perfusion configuration, a continuous fermentation feed process, with a permanently fresh culture, while the cells are retained in retention devices in the bioreactor.

Continuous harvesting; the continuous removal of unstable products; higher volume productivity; more compact scale-down models; higher cell density of the products; manufacturing operation for longer periods and the reduction of operational costs are some of the advantages that the perfusion mode presents.

At the moment, there are already several companies such as Sanofi©, Merck© and Bayer© that already use the perfusion bioprocess, in their plants for the production of biopharmaceuticals.

The present work presents a vision of the biotechnological process that uses bioreactors in continuous mode in perfusion seeking to anticipate what will be its impact in the pharmaceutical industry.

**Keywords:** Bioreactors, Biopharmaceuticals, Perfusion, Continuous Bioprocessing

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Sérgio Barreira, pela disponibilidade, compreensão, simpatia e apoio prestado, ao longo de todo o meu percurso académico.

À minha mãe, irmãos e Mafalda!

*“The past, like the future, is  
indefinite and exists only as a  
spectrum of possibilities”*

*Stephan Hawking*



## Índice de Conteúdos

Resumo.....	I
Abstract.....	II
Índice de figuras.....	VI
Índice de tabelas.....	VIII
Lista abreviaturas.....	IX
Objetivos.....	1
Metodologia.....	1
I. Introdução .....	2
1.1 Breve perspetiva histórica da indústria biofarmacêutica .....	3
1.2 Biofármacos (Classes; variações, aplicações).....	4
1.3 Biossimilares .....	8
II. Processo de produção de biofármacos .....	11
2.1. Processos de produção em biotecnologia .....	11
2.2. Esquema do processo e avaliação .....	12
2.3. Fabrico do principio ativo.....	13
2.4. Produção de produtos biofarmacêuticos .....	15
2.5 Fatores-chave para avaliação de bioprocessos.....	16
2.6. Sistemas de expressão.....	17
2.7. Fermentação .....	22
2.8. Esterilidade e tecnologia de esterilização .....	24
2.9. Equipamento e tecnologia.....	25
2.10. Purificação .....	27
2.11. Tecnologia para separação celular e isolamento do produto .....	27
2.12. Concentração e estabilização da proteína alvo .....	28
2.13. Tecnologia para purificação final .....	29
III. Design e tipos de bioprocessos.....	31
3.1. Bioprocesso.....	31
3.2. Tipos de bioprocessos.....	31

3.3. Produção em contínuo de produtos biológicos .....	34
IV. Bioprocesso contínuo em modo perfusão .....	37
4.1. História.....	38
4.2. O regresso da perfusão.....	39
4.3. Caracterização do bioprocesso de perfusão .....	40
4.4. Produtividade do processo de perfusão.....	43
4.5. Dispositivos de retenção celular .....	45
4.6. Definição de estado estacionário .....	47
4.7. A perfusão .....	48
4.8. Formatos inovadores de perfusão .....	50
4.9. Tipos de biorreatores para culturas em contínuo modo perfusão.....	53
4.10. Estratégias para o desenvolvimento do meio de cultura em perfusão .....	56
4.11. Requisitos específicos da linhagem celular .....	58
4.12. Modelos <i>scale-down</i> para processos em perfusão .....	59
4.13. Vantagens do bioprocesso em contínuo em modo perfusão.....	60
4.14. Bioprocessos que já utilizam o modo perfusão.....	61
4.15. Interpretação dos casos .....	67
V. Conclusão.....	68
Referências Bibliográficas.....	72

## Índice de Figuras

Figura 1. Edição de genes.....	3
Figura 2. Diferentes classes de biofármacos.....	5
Figura 3. Esquema global do bioprocesso.....	12
Figura 4. Sequência de produção de um Biofármaco.....	13
Figura 5. Biofármaco na forma líquida.....	15
Figura 6. Fase final do processo de fabrico de um biofármaco.....	16
Figura 7. Banco de armazenamento de células para produção de Biofármacos.....	18
Figura 8. Exemplo de um sistema de expressão microbiano.....	19
Figura 9. Merkmillipore Cellvento™ CHO-100 líquido para <i>batch</i> e perfusão.....	20
Figura 10. Esquema simplificado que expressa a interação de vários parâmetros do bioprocesso no ambiente da célula.....	22
Figura 11. Gráfico do ciclo de vida celular no processo de fermentação.....	23
Figura 12. Desenho típico de um biorreator de agitação no modo <i>batch</i> .....	25
Figura 13. Instalação de um <i>scale-up</i> de biorreatores de agitação GE Healthcare ©.....	27
Figura 14. Esquema dos dispositivos de retenção ATF e TFF usados no modo perfusão.....	29
Figura 15. Esquema geral da fase <i>downstream</i> .....	30
Figura 16. Esquema representativo do modo <i>fed-batch</i> ; contínuo; híbrido.....	32
Figura 17. Configuração do biorreator Sartorius® 2000 L em modo contínuo.....	34
Figura 18. GE KUBIO® fábrica modular para a produção de biofármacos.....	39
Figura 19. a) esquema representativo de um modo perfusão com um sistema ATF de retenção celular acoplado b) Repligen© Xcell™ ATF System.....	46
Figura 20. Esquema típico de dispositivos de retenção celular acústico (Biosep Acoustic perfusion system®).....	47
Figura 21. Esquema típico do modo perfusão.....	48

Figura 22. Sistema de cromatografia multicolumna para biorreatores bioprocesso modo perfusão(CadenceBioSMB).....	51
Figura 23. Biorreatores GE Healthcare ©.....	53
Figura 24. Biorreator WAVE® GE Healthcare ©.....	54
Figura 25. Biorreator icellis®.....	55
Figura 26. Biorreator Hollow Fiber.....	55
Figura 27. Linhagem celular CHO.....	59
Figura 28. Configuração do bioprocesso contínuo em modo perfusão de USP-DSP....	63
Figura 29. Imagem 360° do laboratório Merck©.....	64
Figura 30. Biorreatores Mobius ® 1000L.....	65
Figura 31. Possível abordagem para integração de bioprocessos em contínuo desde USP a DSP. ....	71

## Índice de Tabelas

Tabela 1. O Top 10 de vendas mundial de Biofármacos.....	7
Tabela 2. Biossimilares em pipeline e respetiva empresa produtora.....	9
Tabela 3. Características do bioprocesso em modo <i>fed-batch</i> vs perfusão.....	35
Tabela 4. Biofármacos em comercialização produzidos pelo modo perfusão.....	36
Tabela 5. Comparação dos rendimentos entre <i>Fed-batch</i> e Perfusão.....	44
Tabela 6. Biorreatores disponíveis no mercado para o bioprocesso contínuo em modo perfusão.....	56
Tabela 7. Interpretação dos casos apresentados.....	67

## Lista de abreviaturas

- $C_{p,i}$  – Concentração do produto no instante  $i$
- $CSPR_{stat}$  - Taxa de perfusão celular específica
- $CSPR_{crit}$  - Taxa de perfusão celular crítica
- $CSPR_{min}$  - Taxa de perfusão celular mínima
- $q_{p,i}$  - Produtividade celular no dia  $i$
- $q_s$  - Taxa de consumo específica de substrato
- $X_{max}$  - Densidade celular máxima
- API – Substância ativa
- ATF- Dispositivo de retenção celular
- CAPEX - Investimento em capital
- CFB - Fed-batch concentrado
- CHO - Células dos ovários do Hamster Chinês
- BHK - Células dos rins do Hamster bebê
- CRDs - Dispositivos de retenção celular
- CSPR - Taxa de retenção celular específica
- Da - Dalton
- DHFR - Dihidrofolato redutase
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- EPO - Fator de crescimento
- F - Caudal
- FDA - Food and drug administration
- FSH - Hormona estimulante do folículo
- G-CSF - Fator estimulante de granulócito
- GE - General Eletrics©
- IFN - Interferões
- IL - Interleucinas
- SiRNA - Small interfering RNA
- GMP - Boas práticas de fabrico
- TFF - Filtração de fluxo tangencial
- GS - Glutamina sintetase

***H*** - Volume de colheita

**HPV** - Papiloma vírus Humano

**LC-MS** - Cromatografia líquida com espectro de massa

**mAbs** - Anticorpos monoclonais

**MCB** - Banco de células central

**NGS** - Nova geração de sequenciação

**NSo** - Linha celular de ratos

**OPEX** - Investimento operacional

***P*** - Taxa de perfusão

**PAT** - Tecnologia de monitorização analítica

**PCO<sub>2</sub>** - Pressão parcial de dióxido de carbono

**QDP** - Qualidade por desenho

***r*** - Taxa de reação

***RT*** - Tempo de residência

***RT<sub>max</sub>*** - Tempo máximo de residência

***S*** - Margem de segurança

**STR** - Biorreator de tanque agitado

***STY*** - Cultura celular no espaço temporal de fermentação

**USP** - Upstream

**DSP** - Downstream

**HCP** - Proteínas hospedeiras

***VCD*** - Taxa de troca média

***VP*** - Produtividade volumétrica

***vvvd*** - Taxa específica de volume

**WCB** - Células de trabalho

***X*** - Densidade celular

***Y*** - Rendimento da produção

## **Objectivos**

Pretende-se com este trabalho descrever o que são biorreatores de perfusão, as suas vantagens e o impacto que a sua utilização está ter na produção de biofármacos. Serão também apresentados e analisados exemplos de bioprocessos que já utilizam o modo perfusão.

## **Metodologia**

A metodologia utilizada é a descritiva nível I. Teve por base artigos científicos pesquisados em vários motores de busca como o Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>), b-on (<http://www.b-on.pt/>), UpToDate (<http://www.uptodate.com/pt/home>), assim como o Google Académico (<http://scholar.google.pt/>).

Utilizaram-se como palavras-chave “perfusion bioreactors”, “continuous upstream and downstream bioprocessing”, “continuous processing in pharmaceutical industry”, “bioengineering”, “biopharmaceuticals”, “value creation in pharmaceutical industry”, “proteins into drugs”. Foram ainda consultadas publicações de órgãos oficiais, bem como livros técnicos especializados na área da biotecnologia farmacêutica.

Com base na pesquisa bibliográfica efetuada elaborou-se este trabalho de revisão.

## I. Introdução

### 1.1. Breve perspectiva histórica da indústria biofarmacêutica

Pode dizer-se que foi a descoberta acidental da penicilina por Alexander Fleming (Fleming, 1929) e a sua posterior produção à escala industrial, juntamente com outros antibióticos durante a 2ª Guerra Mundial, que constituem o marco fundador da indústria biofarmacêutica. Desde 1950, mais de 1000 diferentes antibióticos foram isolados e usados para o tratamento de doenças, crescimento de animais e protecção de plantas (Newman & Setford, 2006).

Desde os anos 50, o uso de enzimas e posteriormente de anticorpos, iniciou outro campo importante da biotecnologia, a imunoterapia. O primeiro biossensor de glucose foi introduzido por Leland C.Clark em 1954, iniciando o conceito de monitorização de glucose no sangue, que nos dias de hoje está presente num mercado de vários milhares de milhões de dólares (Newman & Setford , 2006).

No final da segunda metade do séc. XX, a revelação das estruturas proteicas, a elucidação dos mecanismos de reparação celular e síntese proteica, incluindo o isolamento das enzimas de replicação do DNA, enzimas de restrição e polimerases, levou a um rápido desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante (Kohler & Milstein, 1975).

A tecnologia de DNA recombinante (*in vitro*), permitiu a clonagem e expressão de proteínas em vectores bacterianos com grande eficiência (Schimd *et al.*, 2016). Esta vantagem tecnológica fornece um maior número de proteínas, candidatas a agentes terapêuticos. Em paralelo desenvolveram-se, através da técnica de hibridoma, anticorpos monoclonais com locais de ligação específicos a antígenos, facilmente preparados e purificados em larga escala, (Kohler & Milstein, 1975).

Estes progressos culminaram na produção economicamente viável da chamada insulina humana recombinante em 1982 (Valonzuela *et al.*, 1982)).

Outro exemplo notável da aplicação dos vectores plasmídicos foi a transformação e produção em massa, de vacinas com o antígeno da Hepatite B, economicamente viável, chamada insulina humana recombinante. Tecnologia similar, é hoje usada para produzir a vacina Gardasil® (HPV) na prevenção do cancro do colon do útero (Zhou *et al.*, 1991).

Um dos marcos recentes na indústria biofarmacêutica foi a descoberta do método de edição do genoma CRISPR “*Science's 2015 Breakthrough of the Year*” (Travis, 2015). Foi concebido após uma empresa de iogurtes em 2007, identificar um mecanismo de defesa inesperado que a bactéria usa para combater os vírus. Esta técnica permite criar genes e poderá a vir ser decisiva para erradicar doenças. Já foi sugerida a edição deliberada do DNA de embriões humanos (Figura 1) (Condliffe, 2016).



**Figura 1.** Edição de genes (adaptado <https://www.jointhehealthmagazine.com/gene-therapy-arthritis.html>)

Presentemente a indústria farmacêutica produz um número diverso de moléculas, desde fatores de coagulação, hormonas, enzimas, anticorpos monoclonais e vacinas. Devido à sua complexa estrutura tridimensional, cada processo aplicado à produção tem configuração específica, resultando em moléculas com propriedades físico-químicas distintas.

## 1.2. Biofármacos (Classes; variações; aplicações)

As pequenas moléculas de síntese química, conhecidas como os medicamentos tradicionais, apresentam, normalmente um peso molecular de 500 Da. O seu pequeno tamanho está diretamente relacionado com a sua atividade biológica, e uma pequena alteração na sua configuração química, implica, alterações na sua atividade terapêutica, traduzindo-se na prática, num novo fármaco (Strachen *et al.*, 2013).

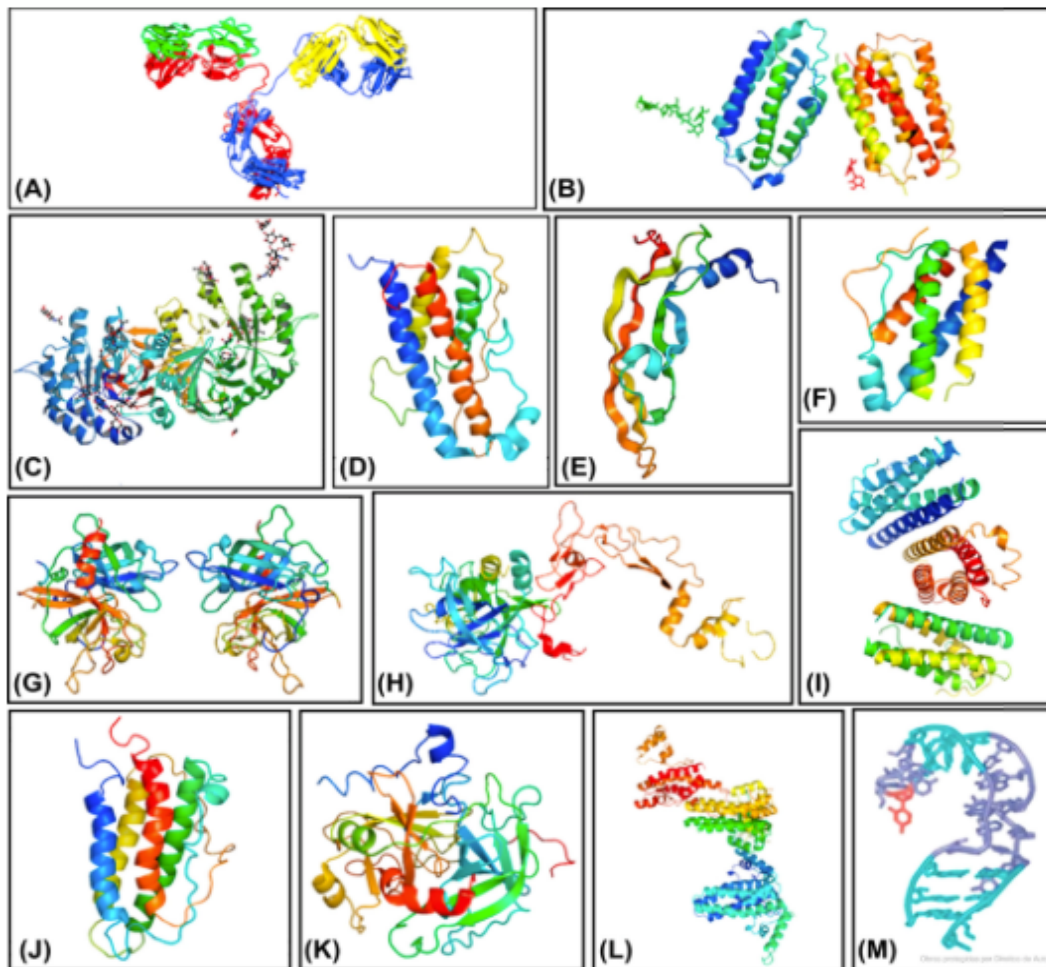
As proteínas e péptidos naturais constituem a maior classe de biofármacos. Trata-se, portanto, de moléculas de peso molecular superior ( $> 1000$  Da) e por norma, apresentam o mesmo nome comercial, mesmo com pequenas diferenças em 1 ou 2 aminoácido (Strachen *et al.*, 2013).

Como se referiu acima, a insulina humana recombinante, foi o primeiro biofármaco a chegar ao mercado em 1982 (Strachen *et al.*, 2013). Ao longo dos anos seguintes, foram introduzidos outros sistemas biológicos para expressar proteínas recombinantes, fungos, insectos, plantas e células de mamíferos, criando assim várias classes de biofármacos.

O ritmo de identificação de biomoléculas candidatas a biofármacos aumentou muito e hoje, com a relativamente baixa taxa de introdução no mercado de moléculas de síntese química candidatas a medicamentos de referência, as principais empresas da indústria farmacêutica e novas empresas biotecnológicas, estão cada vez mais a investir no desenvolvimento de medicamentos biológicos (EFPIA, 2017).

A *Food and Drug administration (FDA)*, aprovou até 2013, 60% de biofármacos, que foram desenvolvidos para o tratamento de cancro, infeções, doenças inflamatórias e cardiovasculares (Bioplan Associates, 2012).

Os péptidos, proteínas e ácidos nucleicos são os principais componentes dos biofármacos agrupados em classes distintas (Chen *et al.*, 2013)



**Legenda.** A) mAb B) IFNs C) Enzima D) Somatropina E) Fator de crescimento celular F) IL-2 G) Tecido activador do plasminogénio H) Factor de coagulação IX I) G-CSF J) EPO K) Anticoagulante Hirudin L) Vacina Hepatite B M) Aptâmero. (adaptado <https://www.rcsb.org> ).

**Figura 2.** Diferentes classes de biofármacos

Na classe de medicamentos biológicos à base de proteínas, os anticorpos monoclonais (mABS), são aqueles que apresentam, em termos de estrutura e farmacocinética, maior complexidade. São produzidos através de técnicas *in vitro*, hibridoma, e sistemas biológicos de expressão em biorreatores. Grande parte desta classe é usada para tratamento de cancros (Rituximab®, *Bencazimab*®, por exemplo) e doenças autoimunes (*Adalimumab*®; *Influxinal*®. *Golimunab*®) Os anticorpos monoclonais constituem a classe terapêutica de biofármacos em maior expansão. 7 dos 10 biofármacos mais vendidos em 2015, são anticorpos monoclonais.

As enzimas são outro grupo complexo, incluindo moléculas como a glucocerosidase,  $\alpha$ -galactosidase e asparaginase, entre outras.

No caso das hormonas, a complexidade estrutural ainda é maior e pode ir desde uma cadeia polipeptídica simples a proteínas heterodiméricas. A hormona de crescimento (Somatotripona), a hormona folicular (FSH), a insulina, o glucagon, os factores sanguíneos, compostos por factores de coagulação, como o factor VII e IV, aplicados no tratamento da hemofilia A e B respectivamente são exemplos de biofármacos desta classe.

As proteínas trombolíticas, o tecido activador do plasminogénio, anticoagulantes, factor de crescimento (EPO) e (G-CSF), usados no tratamento de doenças cardiovasculares constituem outra classe. Factores de crescimento de tipos de células não sanguíneas, também são usadas como moléculas terapêuticas (factor de crescimento endotelial; proteínas osteogénicas), por exemplo, para regenerar tecido ósseo.

Por último, as citocinas, importantes moléculas do sinal modelar da resposta imune são compostas por duas subclasses, os interferões (IFN), como IFN- $\alpha$ ; IFN- $\beta$ ; IFN- $\delta$ , usados no tratamento da hepatite B e C, esclerose múltipla, e alguns tipos de cancro; e as interleucinas (ILs); IL-1; IL-2; IL-12”), usadas para activar as células do sistema imunológico, em especial as células T, no tratamento de doenças autoimunes.

Muitas das proteínas das diferentes classes terapêuticas, são usadas na prevenção de doenças e assim classificadas como vacinas. Diversas vacinas profiláticas, compostas por péptidos, DNA, e proteínas recombinantes encontram-se disponíveis no mercado.

Um grupo de biofármacos ainda com menor expressão no mercado, mas cuja importância está a crescer gradualmente com a evolução e no avanço nos estudos na área da genómica e medicina personalizada são os ácidos nucleicos; vacinas de DNA; siRNA; formulações baseadas em oligonucleótidos (Aptâmeros). O desenvolvimento mais lento desta classe deve-se, eficácia e mecanismo de ação pouco conhecidos e a questões de ética.

Na Tabela 1 apresentam-se os biofármacos mais vendidos na atualidade (Walsh, 2010; Nelson *et al.*, 2010; Swich *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012).

**Tabela 1.** O Top 10 de vendas mundiais de Biofármacos

<b>Empresa</b>	<b>Biofármaco</b>	<b>Vendas 2015(M\$)</b>	<b>Vendas 2016(M\$)</b>
AbbVie©	Humira®	\$14,012	\$16,078
Gilead Sciences©	Harnovi®	\$13,864	\$9,081
Amgen/Pfizer©	Enbrel®	\$8,697	\$8,874
Roche/©Biogen©	Rituxam®	\$8,354	\$8,583
Johnson&Johnson©/Merk©	Remicade®	\$8,760	\$7,829
Celgene©	Revlimid®	\$5,801	\$6,974
Roche©	Avastin®	\$6,654	\$6,752
Roche©	Heceptin®	\$6,509	\$6,751
Sanofi©	Lantus®	\$6,054	\$6,770
Pfizer©	Prevenar 13®	\$6,245	\$5,718

Considerando todas as classes e sub-classes de medicamentos biológicos desenvolvidos até à data, estes podem ser divididos em diversos tipos de acordo com as modificações na sua estrutura. Estas modificações aumentam a sua aplicação terapêutica, eficácia, segurança e precisão do mecanismo de acção. As variações no local activo da molécula, são consideradas para produzir biofármacos com qualidade, com melhor farmacocinética, chamados biofármacos de 2ª e 3ª geração (Kohno *et al.*, 2007).

As variações na sua estrutura, em geral, resultam na redução da imunogenicidade, alterações no perfil farmacocinético, aumento do tempo de semi-vida, ou geração de novas proteínas (proteínas híbridas), como as proteínas de fusão, compostas por diferentes cadeias polipeptídicas (Etanescept®), composto por um receptor de citoquina constituído por uma região com um anticorpo em fusão com o seu carbono terminal (Kohno *et al.*, 2007).

As proteínas terapêuticas como, mAbs, FSA, EPO ou G-CSF, são glicoproteínas. O perfil de glicosilação, que é, a adição de açúcares de larga cadeia polipeptídica nos locais de glicosilação, pode influenciar positivamente ou negativamente a molécula produzida, modificando a sua nomenclatura ou nível de actividade (Kohno *et al.*, 2007).

Novas tecnologias e sistemas terapêuticos, como nanoestruturação, já são utilizados para aumentar o tempo de semi-vida, conduzir o fármaco pelo corpo. Outra abordagem é a ligação de proteínas a estruturas farmacológicas já existentes para aumentar a especificidade e aumentar a atividade biológica e melhorar as propriedades físico-químicas. (Gebauer *et al.*, 2009).

Com o desenvolvimento tecnológico dos biofármacos, aumenta também a sua segurança, na prevenção, controlo e cura de doenças como o cancro, artrite reumatóide, doença de Alzheimer, diabetes, dermatites, doença e Crohn, esclerose múltipla, fibrose cística, hemofilia, trombose, lepra, lupus e diversas doenças cardíacas.

O tratamento da esclerose múltipla usando o IFN- $\beta$  recombinante, aumenta a qualidade de vida de muitos pacientes, reduzindo o número de recaídas em 30 % dos indivíduos (Aggernal, 2013). Na artrite reumatoide, a nova bioterapia, reverte a degeneração da ligação apenas 48h após o início do tratamento. Diversos Biofármacos, já demonstram actuar seletivamente em células cancerígenas apresentando menos efeitos tóxicos do que os procedimentos quimioterapêuticos mais comuns. (A.G Roche).

Devido ao seu tamanho e sensibilidade, grande parte dos biofármacos, são administrados via parentérica, absorvidos em primeiro, pelo sistema linfático. (Reis *et al.*, 2011; Amgen, 2012).

### **1.3. Biossimilares**

A progressiva expiração de patentes levou à produção de uma segunda geração de produtos biofarmacêuticos, os chamados biossimilares (Fryklind, *et al.*, 2014). Em termos gerais, pois pode mudar de país para país de acordo com agência reguladora, um biossimilar corresponde a um biofármaco que é idêntico ao biofármaco referência (Tsuruta *et al.*, 2015).

Os biossimilares são produzidos através de bioprocessos que apresentam diferenças, nas linhas celulares ou sistemas de expressão em relação ao bioprocessos do biofármaco de referência, para produzir maior concentração de produto final com atividade biológica aumentada (Mellstad *et al.*, 2008).

O grande problema, na produção desta classe é a dificuldade de demonstrar que é um bioproduto similar ao biofármaco de referência, incluindo, diferenças estruturais e diferenças no processo de produção. É necessária uma avaliação específica para cada novo biossimilar (Fryklind *et al.*, 2014).

**Tabela 2.** Biossimilares em pipeline e a respectiva empresa

<b>Molécula</b>	<b>Empresa</b>
G-CSF	Teva Pharmaceuticals
G-CSF	Mochida/Fuji Pharma
Somatropin	JCR Pharmaceuticals
Trastuzumab	Celltrion
Infliximab	Celltrion
alfa-Follitropin	Dong-A Pharmaceuticals
alfa-Follitropin	Teva Pharmaceuticals
alfa-Follitropin	Finox Biotech
Etanercept	Celltrion
Etanercept	LG Life Sciences
Etanercept	Merk
alfa-Darbepotin	Avestagen
Eritropoítina	Hospira
Interferão-beta	Reliance Life Sciences
Interferão-alfa-2b	Amoytop Biotech
Trastuzumab	GreenCross

Nos últimos anos, a indústria biofarmacêutica tem demonstrado o interesse crescente em comercializar biossimilares, (Tabela 2) (Wilson & Wood, 2015). Em 2015, 47 novos biossimilares estavam em fase de estudo clínico (Sackman *et al.*, 2014).

## II. Processo de produção de biofármacos

### 2.1. Processo de produção em biotecnologia

Em comparação com a indústria farmacêutica tradicional, de síntese química, as moléculas produzidas pela indústria biofarmacêutica são singulares por dois aspetos: são muito grandes e são produzidas em organismos vivos, o que resulta numa variabilidade notável (Jozala *et al.*, 2016):

- As moléculas de sequências peptídicas podem ter diferentes estruturas (primárias; secundárias; terciárias; isoformas; locais de glicosilação).
- A mesma molécula interage com diferentes substâncias em locais específicos com diferentes mecanismos de interação.
- As proteínas são muito sensíveis às perturbações mecânicas e térmicas.
- Os produtos biológicos são difíceis de caracterizar.

A grande dificuldade de caracterização de um fármaco proteico é a principal razão para a complexidade do seu processo de produção. É virtualmente impossível gerar a proteína alvo pura devido aos seus subprodutos e impurezas (Valente *et al.*, 2015).

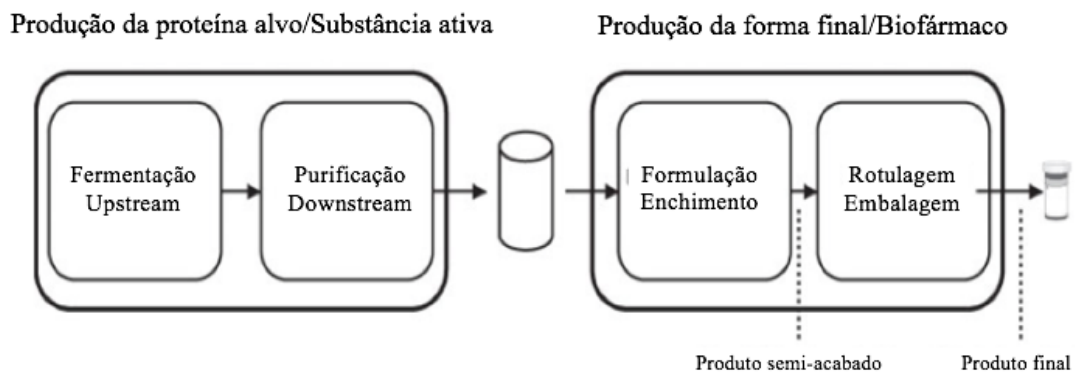
Na purificação, a diferença entre os produtos de interesse e ou produtos indesejáveis, geralmente é pequena, pois o tamanho e configuração são similares. A escolha dos métodos de separação aplicáveis é limitada devido à baixa estabilidade química, diversidade dos pesos moleculares e similaridade e uniformidade dos mecanismos de interação (Valente *et al.*, 2015).

Assim sendo, o produto que emerge do processo é constituído por uma mistura de substâncias em que a proteína alvo constitui o ingrediente essencial, mas em que os restantes componentes são determinados pelo próprio processo (Valente *et al.*, 2015).

Um problema adicional que os biofármacos apresentam é a complexidade do produto em si, constituído por diversas substâncias. Normalmente é impossível de obter uma análise precisa da mistura formada no final do processo. Se houver desvios significativos do processo de fabrico estabelecido, a identidade dos subprodutos do bioprocessamento é geralmente impossível de determinar e eles não são detetados pelos métodos analíticos implementados. Na fase do ensaio clínico, será difícil declarar a segurança e eficácia destas novas substâncias. A qualidade do produto não pode se definir sem qualquer dúvida. Em biotecnologia a máxima “o processo determina o produto” aplica-se (Cohen *et al.*, 2018).

## 2.2. Esquema do processo e avaliação

São duas as principais áreas do processo, a fermentação (produção da biomolécula alvo), e a purificação (purificação da biomolécula alvo). A produção da substância ativa resulta numa substância medicamentosa não formulada, em que a biomolécula está presente numa solução adequada para armazenamento a longo prazo (Behme, 2015).

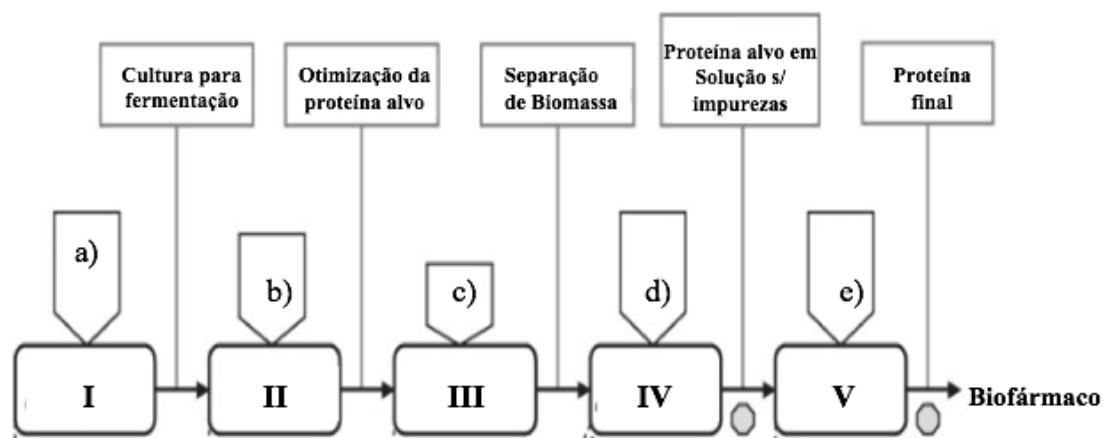


**Figura 3.** Esquema global do bioprocessamento

A etapa subsequente é a transformação das substâncias ativas num fármaco (obtenção da forma farmacêutica segura). Aqui, os aspetos clínicos (tolerância, dose), segurança (grau de pureza), logística (transporte, armazenamento), e embalagem, têm que ser considerados (Behme, 2015).

Na produção farmacêutica, as áreas de formulação/enchimento e embalagem podem ser distinguidas. A formulação envolve, normalmente o tamponamento ou liofilização da forma. Quando é introduzido no recipiente final (ampola, seringa), é criado o produto final. Enquanto o produto não for rotulado, é considerado semi-acabado. Assim o último passo do processo de fabrico do biofármaco, engloba a rotulagem e embalagem final (Behme, 2015).

### 2.3. Fabrico do princípio ativo



Legenda: I. Inoculação cultura celular II. Fermentação III. Separação celular IV. Isolamento/Concentração V. Polimento; a) Cultura da linha celular b) Meio de cultura c) Água d) Água/tampão/géis e) Água/tampão/géis

**Figura 4.** Sequência da produção de um biofármaco.

O processo de produção inicia-se com a cultivação de células. Uma alíquota contendo material celular, retirado do banco de células viáveis, é incubado num balão de agitação. De seguida uma sequência de etapas *scale-up*, tipicamente diferentes em volume (1:10), vai gerar uma cultura de inoculação para incubar no fermentador (Brod *et al.*, 2009). As células são propagadas e a proteína alvo é produzida na etapa de fermentação. Os nutrientes necessários para o metabolismo celular, são fornecidos através do meio de cultura. Após a colheita das células do biorreator, o sobrenadante é separado da massa celular; a separação pode se feita por centrifugação ou filtração (Brod *et al.*, 2009).

Se a expressão do produto é intracelular em corpos de inclusão, as células têm que ser lisadas, para as proteínas alvo serem dissolvidas em meio aquoso. Pode ser necessário um processo de reformulação que restaurar a estrutura tridimensional e, portanto, a funcionalidade terapêutica da proteína (Brod *et al.*, 2009).

Após reformulação, a solução existente, contém a biomolécula na forma correta e as impurezas das etapas precedentes. Estes procedimentos são similares, para produtos de expressão extracelular após separação da biomassa. Neste caso a biomolécula, não reside nas células, mas sim no sobrenadante aquoso. O isolamento e concentração podem ser efetuados por cromatografia de captura ou ultrafiltração; um tampão aquoso (suplementado com estabilizadores proteicos) é adicionado para condicionar a solução para subsequente purificação (Borys *et al.*, 2015).

Antes do processo *downstream* se iniciar, existe frequentemente um processo de retenção, para desacoplar os processos de fermentação (*upstream*) e purificação. Depois do isolamento/concentração, a proteína é obtida em uma solução, livre de impurezas. Todas estas etapas constituem o *upstream* do processo (Borys *et al.*, 2015).

A purificação final, *downstream*, recorre a uma variada gama de cromatografias. O objetivo desta fase é a remoção de impurezas semelhantes ao produto, como proteínas hospedeiras (HCPs), formas desnaturadas da proteína ou outros subprodutos. O fim da cadeia de processos é marcado, mais uma vez, por uma ultrafiltração para preparar o produto para as etapas seguintes (Oien *et al.*, 2017).

É necessária especial atenção ao enchimento dos volumes necessários, pois é uma operação que exige precauções de esterilização e higiene. No final obtemos uma proteína dissolvida, mais pura possível, com ótima estabilidade para armazenamento a longo prazo em condições moderadas. Na forma mais usual de procedimentos industriais (processo descontínuo), depois da purificação final, é novamente necessária uma fase de retenção para separar o processo de fabrico da proteína da etapa de fabrico do biofármaco (Oien *et al.*, 2017).

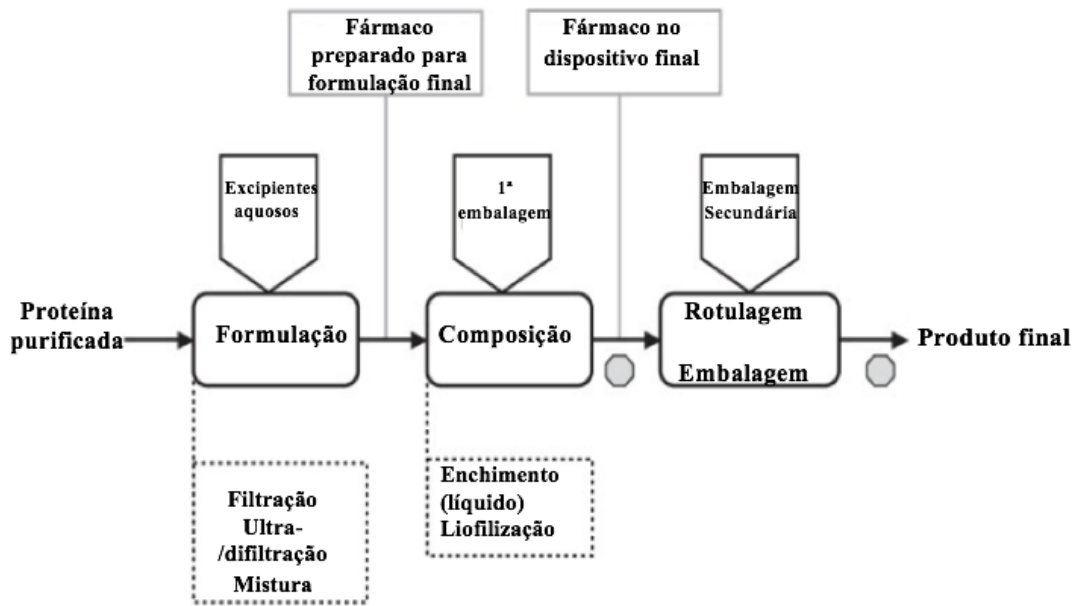
## 2.4. Produção de produtos biofarmacêuticos

Na produção biofarmacêutica, a solução que contém a proteína alvo é transformada em um biofármaco apropriado para tratamento terapêutico, fácil de utilizar por médicos e pacientes. As formas farmacêuticas mais comuns dos biofármacos são forma líquida (Figura 4) ou liofilizada, como um pó. Para injeção via parentérica, o pó é reconstituído com água purificada ou uma solução fisiológica (Fischer *et al*, 2016).



**Figura 5.** Biofármacos na forma líquida

Na formulação (Figura 6), o tampão de armazenamento, pode ser substituído por um tampão adequado para a injeção. Se o produto tiver que ser liofilizado, um agente crioprotector deve ser adicionado ao líquido para evitar a degradação da proteína durante o processo de congelamento. O ajuste do pH, também é comum. Na composição subsequente, o líquido é preenchido no recipiente primário, que é muitas vezes um frasco de vidro; são também utilizados outros tipos de recipientes, como seringas pré-cheias, campânulas ou cartuchos. O produto é liofilizado se a estabilidade da forma líquida não estiver garantida (Fischer *et al*, 2016).



**Figura 6.** Fase final do processo de fabricação de um biofármaco

No último passo, rotulagem e embalagem, o biofármaco recebe o “make-up” específico de cada país, incluindo as informações relevantes para a segurança, bem como as embalagens de venda e transporte (Fischer *et al*, 2016).

## 2.5. Fatores-chave para avaliação de bioprocessos.

Questões relacionadas com a performance global do processo são frequentemente avaliadas, sendo os custos e a reprodutibilidade do processo, as principais preocupações.

Quando um conceito de bioprodução é implementado, o desenvolvimento do processo tem que delinear metas bem definidas abordando os seguintes fatores (González & Woodely, 2010):

- **Concentração de fermentação:** é a concentração de produto que se atinge em gramas por litro de volume no final da fermentação. Para determinado processo, esta depende, do tempo, taxa de crescimento celular, densidade celular e a produtividade celular individual.
- **Rendimento global:** cada uma das etapas do processo *downstream* está associada a uma perda de produto mais ou menos significativa.

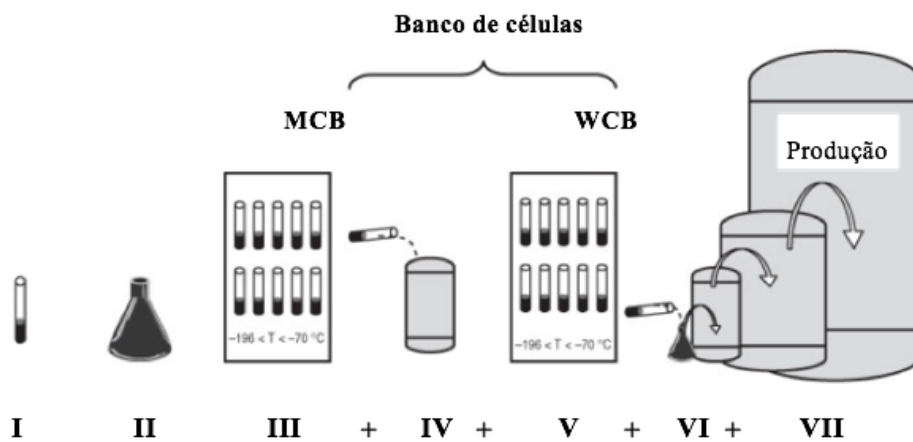
- **Tipo e capacidade do processo:** o tipo e a capacidade das etapas do processo determinam a configuração e tempo necessário. A capacidade individual de cada etapa indica a frequência com que essa etapa deve ser realizada para o fabrico da quantidade desejada de produto.
- **Tempo do processo:** é o principal fator para a avaliação da melhor configuração e otimização da fábrica de produção.
- **Dados analíticos:** têm que ser claros e bem tratados, para um controlo e monitorização contínua de todas as etapas.
- **Robustez do processo:** um processo consistente tem que ser robusto, isto é, o produto apresenta qualidade constante dentro dos parâmetros de avaliação, para ser tecnicamente controlado e validado. A maior tolerância a variações diminui os riscos de rejeição. Para avaliar a robustez do processo, devem-se observar os intervalos específicos dos *inputs* (velocidade de agitação; taxa de fluxo de gás; intervalos de temperatura; fluxo de volumes) como parâmetros críticos.
- **Matérias-primas e instrumentos tecnológicos:** as matérias-primas mais importantes são o meio de cultura e as soluções tampão, géis de cromatografia, água farmacêutica, e material de embalagem.
- **Estabilidade do produto:** a estabilidade do produto é a capacidade de manter as suas propriedades inalteradas, durante um longo período de tempo, em determinadas condições ambientais. Por norma, os biofármacos tendem a degradar-se com o tempo e são sensíveis a condições ambientais extremas. A estabilidade do produto tem impacto significativo, no desenho do processo, bem como, no transporte e armazenamento.

## 2.6. Sistemas de expressão

A célula é central no processo biotecnológico. É o “micro reator” no qual o princípio ativo é produzido. A sua performance, determina o tamanho do processo de fermentação e o tipo de purificação. A proteína alvo é sintetizada pela célula selecionada a partir da sua expressão proteica. A totalidade da célula hospedeira e a sua informação genética modificada são designados o sistema de expressão (Subramanian, 2018).

Os sistemas de expressão podem ser classificados como sistemas microbianos, de mamíferos e transgênicos. As células de insetos, eucariotas, não têm um papel significativo a produção em grande escala (Subramanian, 2018).

As células que são usadas para inocular o fermentador são armazenadas num banco de células (Figura 7). O banco de células é o material inicial mais importante de um processo biotecnológico, sendo necessário, testes, identificação e estabilidade do conteúdo com frequência (Subramanian, 2018).



Legenda: I. Produção de substrato celular II. Expansão celular III. Aliquota e congelamento IV. Descongelamento e expansão celular V. Aliquota e congelamento VI. Descongelamento e expansão VII. Amplificação celular

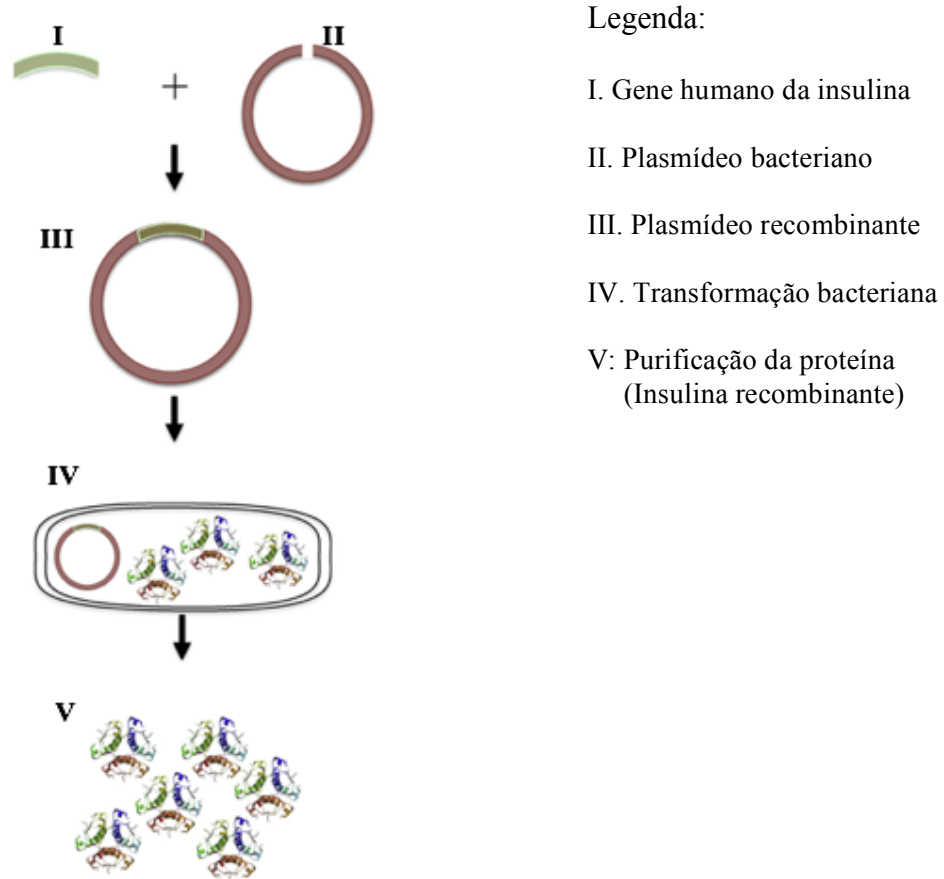
**Figura 7.** Banco de armazenamento de células para produção de biofármacos

#### i. Sistemas de expressão microbianos

Os sistemas de expressão microbiana são constituídos por bactérias (Figura 7) (*Escherichia coli* e outras espécies de *bacillus*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*), e fungos (*Aspergillus niger*). Mas particularmente a *E.coli* e a *S.cerevisiae* (Demain, Vaishnav, 2009).

O código genético para a expressão, o vetor expressão, da proteína alvo pode ser ativo fora do genoma da célula hospedeira ou integrado no genoma. A forma integrada é a

mais estável, pois não se degrada tanto como a forma epissômica. Contudo a transformação genética da forma epissômica normalmente gera um maior número de cópias na célula, o que aumenta a performance da síntese (Demain, Vaishnav, 2009).



**Figura 8.** Exemplo de um sistema de expressão microbiano

O código genético para a expressão, o vetor expressão, da proteína alvo pode ser ativo fora do genoma da célula hospedeira ou integrado no genoma. A forma integrada é a mais estável, pois não se degrada tanto como a forma epissômica. Contudo a transformação genética da forma epissômica normalmente gera um maior número de cópias na célula, o que aumenta a performance da síntese (Demain, Vaishnav, 2009).

Todos os sistemas de expressão microbianos, são caracterizados por grande robustez e meio de cultura baratos. Podem ser fermentados até escalas de 100.000 L e atingir concentrações de  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ .

A grande vantagem destes sistemas é o seu rápido crescimento e fácil manipulação. Por outro lado, a principal desvantagem é a incapacidade de criar modificações pós-traducionais, como a glicosilação (Demain, Vaishnav, 2009).

Vários biofármacos já estão presentes no mercado, produzidos através de sistemas de expressão microbianos, como Humulin®, Protropin®, Betaferon®, Novolin®, Revasc®, entre outros.

## ii. Sistema de expressão mamíferos

As células dos mamíferos podem-se aproximar do padrão de glicosilação humana, a expressão de glicoproteínas. Os sistemas mais usados são as células dos ovários do hamster chinês (CHO) (Figura 8), células do rim do hamster bebé (BHK) e as linhas celulares de ratos (NSo) para produzir anticorpos monoclonais (Noé *et al*, 1998).



**Figura 9.** Merkmillipore Cellvento™ CHO-100 líquido para batch e perfusão

As células dos mamíferos necessitam de um meio de cultura mais complexo comparado com os sistemas microbianos. Este meio de cultura é constituído por hormonas e fatores de crescimento, de origem animal (Noé *et al*, 1998).

Outra diferença importante é o seu maior tempo de duplicação; enquanto que a *E.coli* leva 20 minutos para a fissão binária, as células de mamíferos replicam-se em 20-30 horas (Noé *et al*, 1998).

De referir que praticamente todas as linhagens celulares podem ser cultivadas, para além, do produto final apresentar grande densidade celular na cultura suspensa no biorreator e não depender de nenhuma matriz sólida para o seu crescimento (Noé *et al*, 1998).

Os sistemas de expressão de células de mamíferos têm expressão extracelular e podem concentrações de vários mil miligramas por litro. Os valores mais comuns descritos a partir da produção das linhas celulares, para processos comerciais, no momento não passam os 2000  $mg\ l^{-1}$ ; os volumes de fermentação podem chegar ao 25000 l. Os vetores de expressão mamíferos podem ser integrados ou episossómicos (Jianwei, 2012).

Concluindo, as grandes vantagens dos sistemas de expressão mamíferos são a possibilidade de modificações pós-translacionais essenciais para as funcionalidades da proteína, as desvantagens incluem a lenta taxa de crescimento e as exigentes condições das culturas (Jianwei, 2012).

Biofármacos produzidos através das linhas celulares CHO como, Epogen®, Recombinate® e anticorpos Herceptin® e Avastin® e produzidos pelas linhas celulares BHK, Kogenate® e NovoSeven®, já estão disponíveis para uso humano.

### **iii. Sistemas transgénicos**

Os sistemas transgénicos são animais ou plantas geneticamente modificados. Estes sistemas, como a planta do tabaco ou o milho, não estão desenvolvidos como os sistemas microbianos e mamíferos. A sua elevada produtividade leva-os a serem considerados como competidores dos sistemas mamíferos, mas questões sobre a sua estabilidade genética e boas práticas de fabrico (GMP) constituem entraves à sua generalização (Bertolini *et al*, 2016).

## **2.7. Fermentação**

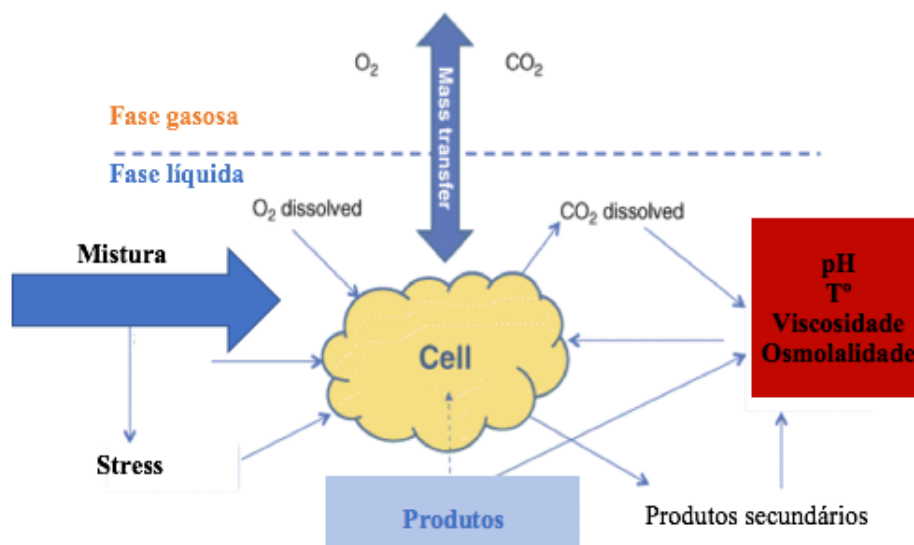
Na fermentação, as células são cultivadas no biorreator, o fermentador, para produzir a biomolécula alvo. Quanto o maior número de células disponíveis no volume de

fermentação, maior o rendimento do produto. Para atingir os objetivos da fermentação, devem estar reunidas as seguintes condições (Larroche *et al*, 2008):

- um ambiente favorável para o crescimento celular, com o objetivo de alcançar uma grande densidade celular.
- otimizar a expressão com o objetivo de atingir uma grande produtividade celular.

Em paralelo, a biofarmácia e tecnologia ditam os seguintes requisitos adicionais (Larroche *et al*, 2008):

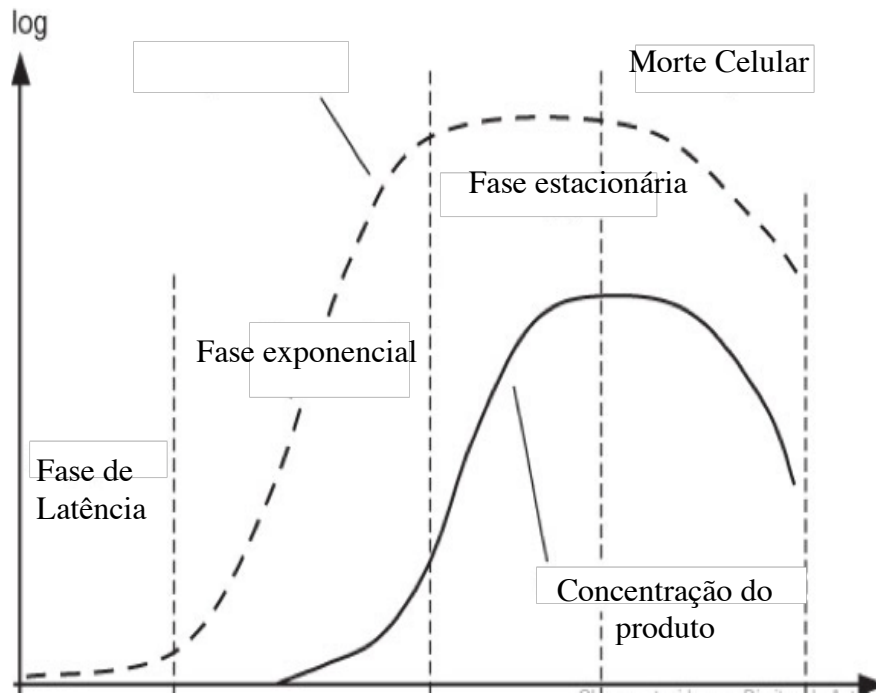
- A gama de subprodutos expressos pelas células deve ser a menor possível. É conseguido com a criação de condições para uma fermentação homogênea.
- A gama de produtos e subprodutos, relacionadas com o processo, deve ser bem definida e de fácil separação.



**Figura 10.** Esquema simplificado que expressa a interação de vários parâmetros do bioprocessamento no ambiente da célula

O rendimento global da fermentação depende da extensão de impurezas. Estas devem ser eliminadas em etapas de purificação, etapas essas que estão associadas a perdas de biomolécula alvo (Larroche *et al*, 2008).

A atividade celular (Figura 9), crescimento e metabolismo, depende de vários parâmetros como, a quantidade de nutrientes, o valor do pH, a temperatura, a densidade celular, concentração e toxicidade dos produtos celulares e disponibilidade de oxigénio. As células multiplicam-se por divisão; depois de atingirem o fim do seu ciclo de vida, morrem, acumulando biomassa no reator (Larroche *et al*, 2008).



**Figura 11:** Gráfico do ciclo de vida das células na fermentação

No processo típico (Figura 11), após inoculação do biorreator no ponto zero, as células necessitam de tempo para se adaptar às novas condições do meio; aqui não se deteta crescimento. Esta fase de latência, é seguida por uma fase de crescimento exponencial em que há aumento da biomassa por meio de divisão celular. Depois da fase exponencial, segue-se a fase estacionária e é caracterizada, por um equilíbrio entre célula novas e células mortas. Esta limitação no crescimento<sup>1</sup> pode se causada por um consumo excessivo de um nutriente específico ou formação de um subproduto tóxico (Larroche *et al*, 2008).

<sup>1</sup> Num sistema fechado, em *batch*, o processo termina na fase de morte celular, devido à limitação de substratos.

Assim que um número razoável de células é alcançado, uma quantidade de produto pode ser detetada no volume de fermentação; o pico da fermentação é atingido quando o número de células é elevado e a taxa de expressão desejada. O declínio da concentração do produto é geralmente uma consequência da baixa estabilidade da proteína, que pode perder a sua estrutura tridimensional ou sofrer degradação proteolítica (Larroche *et al*, 2008).

## **2.8. Esterilidade e tecnologia de esterilização**

É fundamental a esterilização prévia do fermentador. No entanto, a esterilização completa não é essencial nesta fase, só na purificação é que existe esse estreito controle.

Quanto mais “aberto” um processo é para o meio ambiente, mais rigorosos são os requisitos. Por exemplo, a produção do banco de células, é necessário que o processo seja realizado numa bancada com ar ultra purificado para evitar contaminações. No caso dos biorreatores, é só suficiente garantir a esterilidade dentro da cuba de fermentação. De referir que todos os produtos, matérias e superfícies, têm que ser estéreis (Chen *et al.*, 2015).

Existem três grandes tipos de esterilização em processo biotecnológicos:

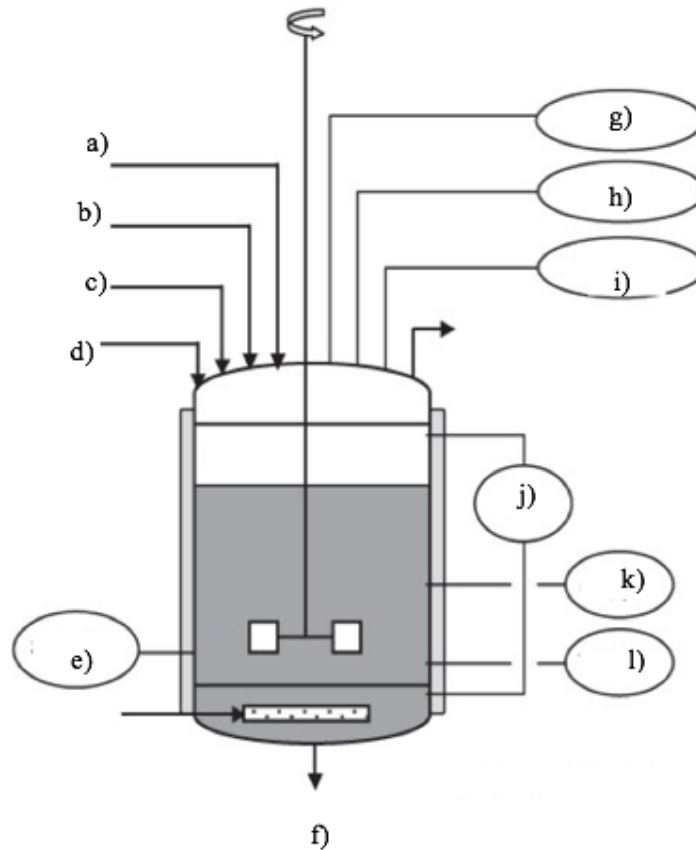
- Esterilização por calor
- Filtração esterilizante
- Esterilização por radiações

O método aplicado depende do bioprocesso a ser realizado.

## **2.9. Equipamento e tecnologia**

Tradicionalmente a fermentação é executada em biorreatores de agitação (Figura 12). Este tipo de reator é ainda o mais usado pela indústria biofarmacêutica, tanto com sistemas microbianos como mamíferos (Eibl & Loffelholz, 2014).

**Biorreator de tanque c/agitação**



**Legenda:** a) agente anti espuma e/ou ajuste do pH b) Meio de cultura c) Ligação à bomba d) Inoculação e) Amostra f) Válvula inferior g) Pressão h) Temperatura i) Controlo por visualização j) Nível da cultura k) Oxigénio l) Turbidez

**Figura 12.** Desenho típico de um biorreator de agitação no modo *batch*

Estes reatores estão disponíveis numa gama de volumes que vai dos poucos litros (escala laboratorial) até 75000L para produção industrial (Behme, 2015) (Figura 13). A fermentação inicia-se depois da esterilização do vaso do biorreator com a inoculação do meio de cultura e caldo celular. O oxigénio é alimentado durante todo o processo por um sistema arejamento; o ar residual é purgado por um tubo na cabeça do vaso. Uma porta adicional é necessária para adicionar os agentes espuma e controlar o pH com adição de hidróxido de sódio ou ácido fosfórico. A proteína final da fermentação é colhida pela válvula inferior (Behme, 2015).

O agitador serve para homogeneizar as condições de fermentação, dispersar bolhas de gás, melhorar a transferência de calor e o movimento fluido, evitar a agregação de células e de biomassa nas paredes do tanque. O biorreator é equipado com uma manta de aquecimento, que pode ser utilizada, também, no modo de refrigeração após a esterilização para uma fermentação exotérmica (Behme , 2015).

Agentes de limpeza, como o hidróxido de sódio diluído ou água, são introduzidos pela porta de limpeza e distribuídos pelo tanque através de bolas de pulverização (Behme , 2015).

Para além da temperatura e pressão, o nível de capacidade, o oxigénio dissolvido e turvação (como medida da densidade celular), são dados de interesse monitorizados, que podem ser analisados por uma porta de vidro e/ou acoplados a computadores com software sofisticados, capazes de realizar medições em tempo real. Uma porta de amostra é indispensável para rastrear todo o processo de fermentação para a sua validação e implementação em processos futuros (Behme , 2015).

Todos os processos de fermentação em biorreatores de agitação são compostos pelas seguintes etapas:

- ✓ Preparação
  - i) Pré-limpeza
  - ii) Esterilização
  - iii) Preparação do meio de cultura
  - iv) Se necessário: testes de filtragem para o processo de *downstream*
  - v) Se necessário: testes de pressão no caso de montagem de outros dispositivos e controlo de limpeza.
- ✓ Bioprocesso
- ✓ Limpeza do equipamento



**Figura 13.** Instalação de um scale-up de biorreatores de agitação (GE Healthcare Life Sciences)

Normalmente os processos podem ser realizados paralelamente para melhor otimização das práticas de fabrico industrial (Clemens *et al.*, 2009)

## 2.10. Purificação

Na purificação, o processo *downstream* (Figura 15), podem ser consideradas as seguintes etapas (Graumnan & Jungbauer, 2012):

- **Separação das células:** separação das células da colheita
- **Isolamento/concentração:** redução do volume a ser purificado e facilitar a separação de impurezas.
- **Purificação final:** purificação da biomolécula alvo de substâncias difíceis de separar.

### **2.11. Tecnologias para separação celular e isolamento do produto**

Após a colheita do biorreator, efetua-se a separação celular. Esta separação de partículas sólidas do líquido aquoso é conseguida por filtros, centrífugas ou decantadores. O processo de filtração pode ser efetuado pelo método clássico como filtrações de fluxo normal ou alternativamente no modo de fluxo tangencial<sup>2</sup> (Coffman *et al.*, 2017).

A centrífugas e decantadores, são mais fáceis de operar do que as unidades com filtros e são mais vezes utilizados como a primeira etapa para a separação celular. Perdas de produto durante a separação celular são causadas pela água residual ligada às células descarregadas que a proteína está dissolvida. Os rendimentos típicos desta etapa são na ordem dos 95% a 98% (Clincke *et al.*, 2013).

### **2.12. Concentração e estabilização da proteína alvo**

Nesta fase do processo, obtida uma proteína alvo na sua forma biologicamente ativa numa solução isenta de impurezas sólidas, duas etapas permanecem por se realizar (Clincke M. *et al.*, 2013) :

- Estabilização da proteína<sup>3</sup>
- Redução do volume a ser processado na purificação final para que o equipamento seja menor e mais económico.

A proteína pode ser estabilizada por inativação<sup>4</sup> ou separação das substâncias desintegrantes. A inativação pelo calor de curta duração, pode ser a alternativa mais viável, que não afeta o rendimento do processo, mas também pode alterar a estabilidade da proteína (Clincke M. *et al.*, 2013).

O processo mais eficiente é eliminar as proteases o mais rápido possível. Como também são proteínas, são relativamente semelhantes à proteína alvo. Podemos conseguir separar as duas se existirem diferenças moleculares significativas ou na solubilidade em

---

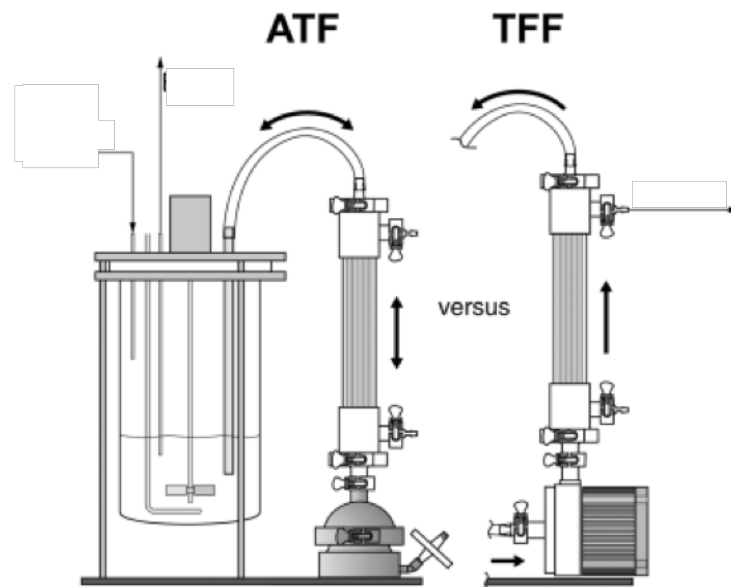
<sup>2</sup> Ultrafiltração.

<sup>3</sup> Prevenção da degradação da proteína por proteases.

<sup>4</sup> implica mais perdas de rendimento em etapas de purificação subsequentes.

água. Para o primeiro caso a técnica de adsorção ou cromatografia será o mais indicado, para o segundo uma extração de 2 fases. Ao mesmo tempo estas operações concentram o produto (Clincke M. *et al.*, 2013).

Os processos cromatográficos que ligam a proteína alvo e são implementados antes da concentração da colheita são designados como etapas de captura direta (Clincke M. *et al.*, 2013).



**Figura 14.** Esquema dos dispositivos de retenção ATF e TFF usados em modo de perfusão.

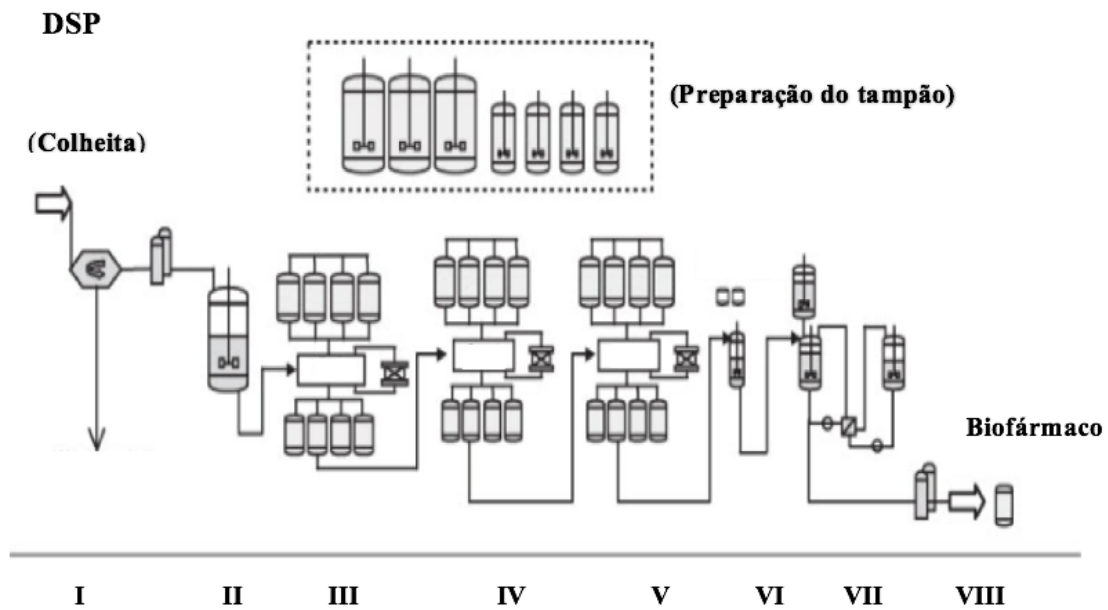
Um dos métodos mais importantes para a concentração e clarificação da colheita celular é a filtração de fluxo tangencial (TFF), também conhecida como filtração de fluxo cruzado, utilizando uma membrana filtrante (Figura 14). A filtração de fluxo cruzado impede a formação de uma camada de impurezas que impede o fluxo transmembranar, apesar que a formação de uma pequena camada de impurezas à superfície da membrana, aumenta a eficiência da filtração (Clincke M. *et al.*, 2013).

### 2.13. Tecnologias para a purificação final

A concentração e isolamento têm como objetivo e remover as substâncias relacionadas com o processo de fermentação. No final desta etapa geralmente, é apresentada uma

solução que está livre de células e partículas sólidas e tem uma aparência incolor. Esta solução contém a proteína alvo, bem como impurezas de baixo e alto peso molecular. O objetivo da purificação final é a remoção dessas impurezas (Morbidelli *et al.*, 2016).

A purificação final é principalmente baseada em princípios de cromatografia, mas a cristalização, precipitação e processos de membrana também são utilizados (Morbidelli *et al.*, 2016).



**Legenda:** I. Centrifugação II. Inativação das Proteases III/IV/V. Cromatografia VI. Inativação de vírus VII. Nanofiltração VIII. Filtração esterelizante

**Figura 15.** Esquema geral da fase *downstream*

Do polimento resulta a proteína alvo na pureza máxima, biofármaco, para tratamento dos pacientes, assim, os aspectos de segurança são muito importantes nesta área do processo. Outra tarefa crucial da purificação final é garantir a pureza biológica do produto final, antes de ser transferido para a formulação e enchimento estéril (Morbidelli *et al.*, 2016).

Embora existam caminhos típicos para a purificação de proteínas, há uma grande variedade de processos *downstream* (Morbidelli *et al.*, 2016). Os valores típicos do rendimento global desta etapa variam entre 45% a 80% (Li & Qiu, 2013).

### III. Design e tipos de bioprocessos

#### 3.1. Bioprocesso

O bioprocesso tecnológico inclui o *upstream*, biorreator, e processo *downstream*. Os biorreatores são o elemento central do bioprocesso seja para a produção de biomassa, biossíntese de metabolitos, ou biotransformação. Os bioprocessos são influenciados por vários parâmetros que têm que ser otimizados com vista a desenvolver um processo económico (Tomaz-Soccol *et al.*, 2016).

O bioprocesso usualmente requer menos energia do que a síntese química tradicional e, frequentemente, matérias-primas mais baratas; além disso pode ser usado para obter produtos que não podem ser produzidos pelos métodos baseados em síntese química. Um processo que é altamente controlado e monitorizado, tem o potencial para produzir os produtos desejados de forma rápida e consistente com maiores rendimentos; este rendimento é alcançado se controlarmos e monitorizarmos as principais variáveis e desenvolvermos estratégias de controlo de gestão (Tomaz-Soccol *et al.*, 2016).

O biorreator mais comum utilizado pela indústria é o de agitação, em que a parte central, o tanque, contém as células em crescimento no meio de cultura (Figura 12).

Normalmente o biorreator é equipado com uma sonda de pH, regulador da temperatura, e oxigénio dissolvido e monitorizado por uma sonda e pela taxa de agitação (Tomaz-Soccol *et al.*, 2016).

No modo de cultura em contínuo o meio de cultura fresco, é adicionado e paralelamente a cultura é retirada continuamente, enquanto no modo perfusão, o meio de cultura é adicionado e retirado quando as células são removidas do reator (Larroche *et al.*, 2016).

#### 3.2. Tipos de Bioprocesso

Consoante o tipo de biorreactor usado existem três tipos de fermentação: *batch*, *fed-batch* e fermentação em contínuo.

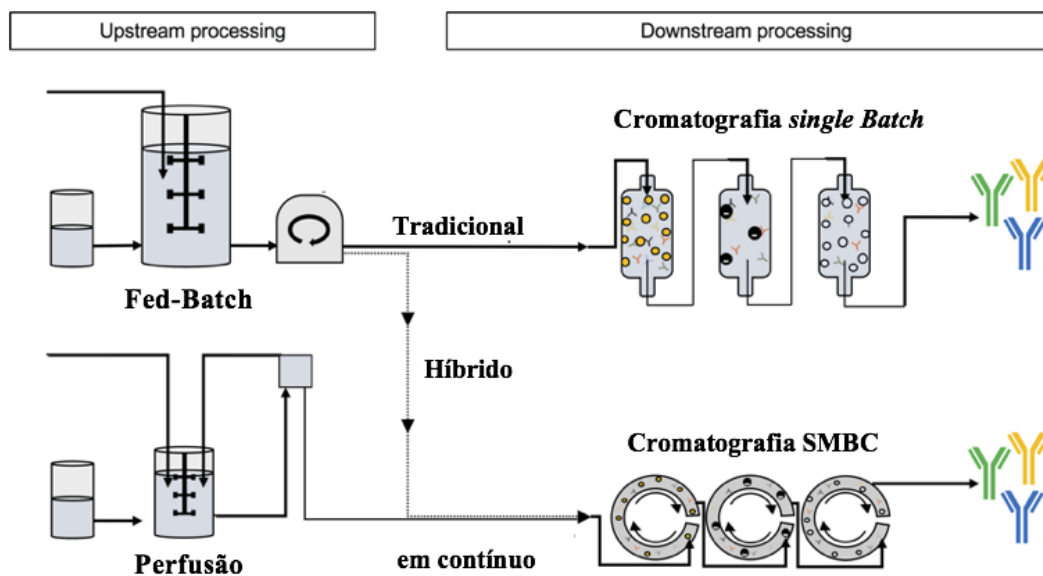
### i. *Batch*

A fermentação em *batch* decorre num sistema parcialmente fechado, em que as matérias são carregadas para o biorreator, descontaminadas antes do processo começar, e removidas no fim. Neste tipo, as condições da operação estão em constante mudança ao longo do tempo. O único material que é adicionado ou removido durante a fermentação são os gases ( $O_2$ ;  $CO_2$ ) e soluções de controlo de pH. Os produtos intracelulares e extracelulares, são recolhidos no final do processo.

A principal desvantagem do processo em *batch* é o elevado tempo de inatividade entre lotes, tempo que inclui, a carga e descarga do biorreator, limpeza, esterilização, e o recomeço do processo. A otimização do pH e temperatura pode melhorar a performance, comparando com operações de pH e temperatura constante (Martins & Souto-Maior, 2003; Cora *et al.*, 2008).

### ii. *Fed-batch*

O bioprocesso diz-se em modo *fed-batch* (Figura 15), quando um ou mais nutrientes são alimentados para o biorreator durante a cultura e os produtos da síntese proteica permanecem no reator até ao final do processamento.



**Figura 16.** Esquema representativo do modo *fed-batch*; contínuo em perfusão; híbrido.

Uma das vantagens deste método é que a concentração do substrato que alimenta o meio celular, pode ser mantida nos níveis desejados (Yamane, 1978). A cultura *fed-batch* mais simples, é a aquela em que a taxa de alimentação de um substrato limitante é constante. Este é o processo mais utilizado pela indústria biofarmacêutica, para atingir células de grande densidade em que as fontes, são alimentadas de forma intermitente ou contínuo

A operação em *fed-batch*, é uma estratégia única de regular a concentração de compostos que são chave, para controlar as taxas de reação o que é uma vantagem competitiva em relação ao modo em *batch*.

Existem duas abordagens clássicas para a fermentação em modo *fed-batch*; volume fixo e volume variável. No modo volume fixo o substrato limitante é alimentado sem diluição do volume. O volume de cultura é mantido constante. No modo de volume variável, este varia de acordo com o tempo de fermentação (Yamane & Shimizu, 1984).

Existem vantagens e desvantagens no modo *fed-batch*; as vantagens são a produção de células de grande densidade, devido à extensão do tempo de trabalho; condições controladas de substrato durante a fermentação; controlo sobre a produção de subprodutos; repressão catabólica como resultado da limitação de substratos para a formação de produtos; a substituição de água perdida por evaporação. Existem algumas limitações, nomeadamente por necessitar de técnicos altamente especializados para operar o biorreator e uma análise prévia exaustiva de microrganismos e células animais, para entender os seus requisitos em relação à sua formulação e produtividade.

Existem diversas *guidelines* para operar no modo *fed-batch* para produzir diversos produtos, tais como, aminoácidos, antibióticos, enzimas e biomassa microbial (Minihane & Brown, 1980).

### **iii. Bioprocesso em modo contínuo**

Na fermentação em contínuo (Figuras 16 e 17), uma ou mais correntes de alimentação com nutrientes, são alimentadas continuamente ao biorreator e a corrente de efluente

que contém, as células, produtos e resíduos é também removida continuamente. A fase estacionária é mantida, ajustando uma taxa de fluxo volumétrica igual, para as correntes de alimentação e efluente de colheita.

A produção industrial em modo contínuo está geralmente associada com a utilização económica em escala de produtos. A transferência de qualquer tecnologia de produção, de um modo em *batch* para um em contínuo é sinónimo de maturidade de determinada indústria. Já se observou na indústria automóvel, com a revolução de *Henry Ford* nos anos 20 e 30 do século XX, na indústria petrolífera nos anos 50 e 60, na indústria alimentar 50-60, e agora, na indústria farmacêutica e biofarmacêutica.



**Figura 17.** Configuração do biorreator Sartorius 2000 L em modo contínuo

O estabelecimento da parceria de desenvolvimento Novartis /MIT (Instituto tecnológico de Massachusetts) para a estratégia de produção contínua de princípios ativos de síntese química (Larroche *et al.*, 2016), resultou numa transferência de conhecimento para a produção em contínuo de biofármacos (Thomaz-Soccol *et al.*, 2016).

### **3.3. Produção em contínuo de produtos biológicos**

Até recentemente não foi dada atenção especial à produção em contínuo de biofármacos, apesar da produção de proteínas de origem animal ter já atingido uma dimensão de grande escala industrial, em volumes de milhares de litros. No início, estudos teóricos sobre estruturas de custo foram conduzidos, apontando benefícios em menor CAPEX e menor OPEX em maiores concentrações (Sinclair & Brown, 2013).

No presente os estudos focam-se na etapa *downstream*, para produtos de grande volume, como os mAbs na escala de 1000-2000 kg/ano; outros, procuram chamar especial atenção ao benefício de produtos de baixo volume como biofármacos de quantidade de 10-100 kg/ano (Sinclair & Brown, 2013) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Características gerais do bioprocesso em modo *fed-batch* vs perfusão

Características	Fed-batch	Contínuo (perfusão)
Tipo de biorreator	Uso único ou aço inoxidável	Uso único ou aço inoxidável
Escala	2000-20000 L	50-2000 L
Densidade celular	5-30 ×10 <sup>6</sup> células/ml	30-120 ×10 <sup>6</sup> células/ml
Duração da cultura	12-20 dias	20-60 dias
Concentração do produto	0,5-0,8 g/l	20% de fed-batch
Colheita	No final de batch	Diário/contínuo
Acumulação de resíduos	Sim/alta	Não/residual
Tempo de residência	Durante todo o período da cultura	2-4 dias
Estabilidade do produto	Alta	Baixa
Complexidade	Moderada	Elevada
Controlo do processo	Moderada	Elevado
Skills operacionais	Moderada	Sofisticado
Qualidade do produto	Grande	Baixa
Risco de contaminação	Moderado	Moderado
Consumo de meio de cultura	Moderado/elevado	Muito elevado
Custos operacionais	Moderado/elevado	Moderado
Capacidade de purificação	Baixa	Muito elevada
Investimento inicial	Elevado	Moderado

*Riske (2012)* refere que na produção de concentrações levadas os maiores custos estão associados ao processo *downstream*.

A indústria biofarmacêutica é tradicionalmente conservadora. O investimento em inovação é mais dedicado ao produto, do que ao processo/tecnologia do processo em si. Contudo, novos cenários de negócios, criam fortes necessidades de melhoria, preferencialmente inovações disruptivas (Sinclair & Brown, 2013; Johnson, 2015).

Atualmente há cada vez mais produtos no mercado e ainda mais candidatos em ensaios clínicos, que já estão a ser fermentados em contínuo no modo perfusão (Sinclair & Brown, 2013; Johnson, 2015) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Biofármacos em comercialização produzidos através do modo perfusão

<b>Biofármaco</b>	<b>Indicação clínica</b>	<b>Empresa</b>	<b>Introdução no mercado (US)</b>	<b>Capacidade do Biorreator (L)</b>
<b>Reopro®</b>	Antitrombótico	Jassen Biotech©	1994	500
<b>Remicade®</b>	Artrite reumatoide	Jassen Biotech©	1998	500/1000
<b>Simulect®</b>	Rejeição de transplantes	Novartis©	1998	250
<b>Simponi®</b>	Artrite reumatoide	Jassen Biotech©	2009	500/1000
<b>Stelara®</b>	Doença de Crohn	Jassen Biotech©	2009	500
<b>Xigris®</b>	Sépsis	Eli Lilly©	2001	1500
<b>Rebif®</b>	Esclerose múltipla	Merk-Sereno©	1998	75
<b>Kogenate-FS®</b>	Hemofilia A	Bayer©	2000	200
<b>Fabrazyme®</b>	Doença de Fabry	Genzyme©	2003	2000

## IV. Bioprocesso contínuo em modo perfusão

A perfusão designa o processo contínuo de alimentação da fermentação com cultura permanente fresca, enquanto as células ficam retidas no biorreactor num dispositivo de retenção. O processo de perfusão consegue ser altamente produtivo, devido à capacidade de produzir células com grande densidade, com a contínua adição de nutrientes em simultâneo com a remoção de metabolitos do bioprocesso. Neste modo conseguem-se atingir valores de densidade até  $2 \times 10^8$  células /ml consoante a taxa de perfusão, linhagem celular e tipo de cultura (Ozturk, 2006; Xie & Zhou, 2006).

Os processos de perfusão, controlados por operadores especializados, estão em funcionamento durante meses e o produto final são proteínas frágeis produzidas em grande quantidade e reprodutibilidade (Wurm, 2004).

Este modo de produção apresenta, baixos níveis de impurezas, devido há grande viabilidade celular, a possibilidade de integrar a etapa *downstream* em contínuo, a compatibilidade *Quality by Design* (QbD) e a tecnologia de monitorização analítica (PAT) (Wurm, 2004).

A produção em contínuo de proteínas em modo de perfusão com integração da cromatografia já foi aplicada e operou ininterruptamente durante 30 dias (Warikoo *et al.*, 2012).

O tempo médio do processo dura em média de 2 semanas até vários meses. Para atingir, grande densidade celular no estado estacionário, parte das células é removida, para aumentar a viabilidade e prevenir a acumulação de células-mortas (Deschênes, 2006).

As grandes vantagens do modo de operação em perfusão são:

- Grande volume de produção;
- Qualidade celular no estado estacionário;
- Baixo tempo de residência do produto final no biorreator.

Por outro lado, é um processo de complexo a nível de equipamento e controlo e com elevada taxa de insucesso. Em perfusão existe um grande consumo de cultura, principal custo associado a esta operação, e o volume de colheita final contém níveis baixos de produto concentrado, logo é necessário o tratamento deste em *downstream* (Pollock *et al.*, 2013).

#### 4.1. História

A primeira produção industrial em perfusão foi descrita nos anos 80 e apresentava, comparativamente ao processo em *batch*, maiores níveis de concentração celular e produtividade (Himmelfarb & Martin, 1969). Nesta época os dispositivos de retenção mais usados eram os “gravimetric settlers”, com baixas capacidades de retenção celular, e os filtros de rotação, com baixa viabilidade e dificuldade de scale-up, aumentando os custos de manutenção, o que levou à interrupção do processo industrial em perfusão (Woodside *et al.*, 1998). A necessidade de fornecer em contínuo cultura fresca conduz à necessidade de dispositivos fiáveis para atingir os volumes e densidade, para uma produção rentável.

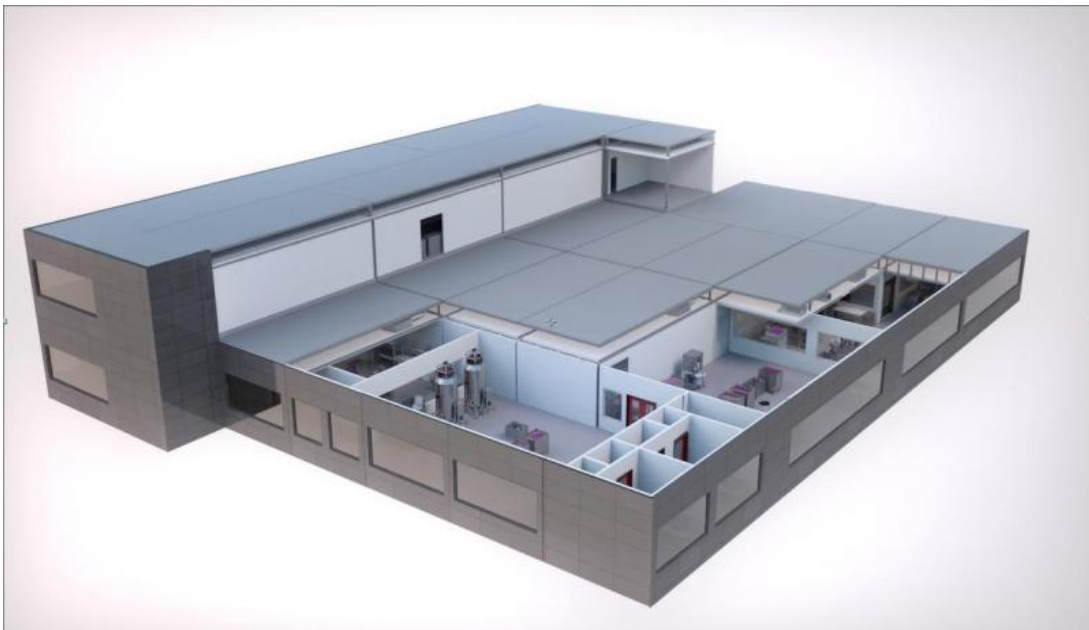
Nos anos 90, com a evolução da tecnologia e a disponibilidade de linhas celulares mais avançadas, o processo de *fed-batch* já conseguia atingir concentrações de produto na ordem de 1g/l com menor complexidade técnica e maior facilidade de operação em biorreatores até 20 m<sup>3</sup>. O sucesso do bioprocessamento em *fed-batch* desacelerou o desenvolvimento da tecnologia dos spins filters e outros dispositivos de retenção. A culturação *fed-batch* é o método dominante em *upstream* das últimas décadas (Langer & Rader, 2014). Nos últimos 25 anos, o rendimento do volume aumentou 20 vezes nos processos industriais. As bases para este desenvolvimento, foram o aumento na qualidade das linhas celulares, sistemas de expressão mais fortes, meios de cultura mais avançados e específicos e o maior controlo analítico do processo (Wurm, 2004).

Contudo o modo em perfusão continuou a ser utilizado para produzir moléculas como, fator VIII, interferões e enzimas terapêuticas (Pollock *et al.*, 2013).

#### 4.2. O regresso da perfusão

Nos últimos anos verificou-se um regresso aos biorreatores de perfusão. Em comparação com o processo em *fed-batch*, a grande viabilidade celular e elevada produtividade em biorreatores relativamente pequenos em culturas em contínuo ao longo do tempo, são as principais vantagens (Eibl *et al.*, 2009, 2010).

A tendência em utilizar a tecnologia *single-use*, com a configuração de perfusão, tem a vantagem de baixo investimento inicial, custos mais baixos de operação, e permite maior flexibilidade nos riscos de contaminação, apesar da capacidade máxima de volume de trabalho estar limitada a 2000 L (Eibl *et al.*, 2009, 2010). No modo de perfusão, os sistemas *single-use* relativamente pequenos, atingem concentrações comparáveis com o modo *fed-batch* (10-20 m<sup>3</sup>) (Pollock *et al.*, 2013).



**Figura 18.** GE© KUBIO™ fábrica modular para produção de biofármacos

Com a capacidade de produzir biofármacos estáveis e instáveis, combinado com o uso de sistemas *single-use* e meios de cultura melhorados (o que permitiu um maior volume de produção e menor quantidade destes), o modo perfusão está a tornar-se numa tecnologia válida para a indústria biofarmacêutica, pois consegue, com menor investimento, integrar unidades de produção mais pequenas e flexíveis com grandes

níveis de performance na taxa de crescimento, viabilidade e evitar limitações de produção (Vijayasankaran *et al.*, 2009; Konstatinov *et al.*, 2006).

### 4.3. Caracterização do bioprocesso de perfusão

A taxa de perfusão ( $P$ ), é definida como a taxa fornecimento de meio de cultura ao biorreator. Para atingir um volume de colheita ( $H$ ),  $H = P$ . Normalmente, estas taxas são expressas por taxas específicas (V meio de cultura/ V do bioreator / dia) (vvd)). Se for aplicada uma estratégia de purgas do meio de cultura celular, esse volume ( $B$ ) também deve ser reabastecido, aumentando a taxa de perfusão  $P$  ( $dia^{-1}$ ) em comparação com a taxa de colheita  $H$  ( $dia^{-1}$ ) (Xie & Zhou, 2006; Ozturk, 1996).

$$P = B + H$$

Para dispositivos “abertos” de retenção de células ( $CRDs$ ) com capacidade de retenção  $< 100\%$ , a taxa de colheita pode ser dividida matematicamente em colheita livre células e uma corrente de purga igual à densidade celular no biorreator, o que permite simular, o desempenho dos  $CRDs$  “abertos”, utilizando  $CRDs$  “fechados” com uma linha celular descartável para detetar as possíveis perdas celulares dos sistemas “abertos”, facilitando assim o processo de transferência de uma tecnologia para a outra (Xie & Zhou, 2006; Ozturk, 1996).

A taxa de perfusão celular específica ( $CSPR$ ) é um parâmetro importante para descrever a quantidade de nutrientes por célula num bioprocesso em contínuo e permite, controlar de forma precisa, as operações em perfusão (Xie & Zhou, 2006; Ozturk, 1996). A taxa de perfusão e a densidade celular viável são necessárias para calcular a  $CSPR$ , como demonstrado na equação,

$$CSPR = \frac{P}{X}$$

em que  $CSPR = taxa\ de\ perfusão\ específica$  (nl/célula/dia),  $P = taxa\ de\ perfusão$  ( $dia^{-1}$ ),  $X = densidade\ celular$  ( $10^6\ células/ml$ )

A  $CSPR$  descreve o volume disponível de cultura por célula e dia e é um indicador, da quantidade de nutriente necessário por célula. A quantidade ótima e mínima de  $CSPR$ , varia consoante a cultura e linhagem celulares utilizadas, entre 50-500 (nl/célula/dia) (Konstatinov *et al.*, 2006). O  $CSPR_{min}$  define-se como a taxa de fluxo mínima, de cultura celular fresca para uma determinada linhagem celular. Uma pequena alteração no  $CSPR_{min}$ , mesmo temporária, através de um crescimento descontrolado da cultura ou interrupção do fornecimento de meio de cultura, pode diminuir a taxa de crescimento, viabilidade, e produtividade específica.

Controlar a  $CSPR$  a um nível constante ( $CSPR_{stat}$ ), permite concentrações consistentes de nutrientes com a alteração das densidades celulares, por exemplo, durante a fase exponencial de crescimento (Ozturk, 1996). A redução da  $CSPR$ , para taxas de perfusão no limite do  $CSPR_{min}$ , permite atingir concentrações de produtos similares ao processo *fed-batch*, através da redução do caudal, reduzindo o volume médio necessário de meio de cultura (Konstatinov *et al.*, 2006).

O volume de meio de cultura é referido como a quantidade de nutrientes adicionados e consumidos durante o processo de perfusão. Um bom aproveitamento do meio de cultura é indicado por concentrações residuais de nutrientes (i.e, glucose, aminoácidos, etc.) no sobrenadante no biorreator, e colheita final. Aumentar a eficiência do processo de perfusão passa por aumentar o aproveitamento do meio de cultura, apesar de ser necessário, que alguns nutrientes mantenham concentrações mínimas para evitar respostas celulares limitantes do processo (Adams *et al.*, 2007).

A composição nutricional do meio, condiciona a densidade celular máxima que pode ser cultivada com determinada taxa de perfusão de meio de cultura recíproca  $CSPR_{min}$ . A  $CSPR$  mínima pode ser determinada, permitindo às células crescerem a uma taxa de perfusão absoluta. À medida que a densidade celular aumenta, a  $CSPR$  irá diminuir até se atingir a  $CSPR_{min}$  (Konstatinov *et al.*, 2006). O ótimo será sempre aumentar a composição nutricional do meio e diminuir a  $CSPR$  para atingir uma densidade celular constante e utilizar a menor quantidade possível de meio nutritivo, ou aumentar a

densidade celular do processo para melhorar a produtividade. Estes valores são características importantes para comparar vários meios de cultura, no modo de perfusão,

$$\text{Medium depth} = \text{CSPR min}^{-1} = X_{\text{max}} \times P^{-1},$$

se  $\text{CSPR}$  = taxa de perfusão celular específica (nl/célula/dia),  $P$  = taxa de perfusão ( $\text{dia}^{-1}$ ),  $X$  = densidade celular ( $10^6$  células/ml).

Se o estado estacionário for atingido, o processo de perfusão deverá ser configurado com uma margem de segurança ( $S$ ), com uma  $\text{CSPR}_{\text{min}}$ , para facilitar uma taxa de crescimento ótima, grande viabilidade, e grande especificidade de produção. Este valor é definido por  $\text{CSPR}_{\text{crit}}$ .

$$\text{CSPR}_{\text{crit}} = (1 + S) \times \text{CSPR}_{\text{min}}.$$

A margem de segurança necessária depende do processo, linhagem celular, composição do meio de cultura e técnica de execução operacional. Normalmente, se reduzirmos a margem de segurança a produtividade irá aumentar, assim com a quantidade de meio de cultura, mas a probabilidade de falha no processo aumenta exponencialmente, por exemplo, interrupções na perfusão. O aumento da margem de segurança resulta num processo mais robusto, com maior taxa de fluxo média reduzindo o consumo de meio de cultura (Adams *et al.*, 2007).

Para determinar a taxa metabólica, o equilíbrio de massa é aplicado, a uma taxa de fluxo e volume constantes (Adams *et al.*, 2007). A taxa de consumo específico pode ser determinada a partir da taxa de troca média,  $VCD$ , e a diferença de concentração de substrato em meio de cultura fresco e no sobrenadante. O sistema de equações diferenciais que permite calcular a concentração de substrato num processo de perfusão é:

$$\frac{dc_s \times V}{dt} = F_{\text{in}} \times c_{s,\text{in}} - F_{\text{out}} \times c_{s,\text{out}} - r \times V,$$

$$F_{\text{in}} = F_{\text{out}} = F,$$

$$P = \frac{F}{V},$$

$$\frac{dc_s}{dt} = P \times (c_{s,in} - c_{s,out}) - r,$$

$$r = q_s \times X,$$

$$\frac{dc_s}{dt} = P \times (c_{s,in} - c_{s,out}) - q_s \times X,$$

em que  $V$  = volume do biorreator (l),  $F$  = caudal (l/dia),  $P$  = taxa de perfusão ( $\text{dia}^{-1}$ ),  $c_s$  = concentração de substrato (g/l),  $r$  = taxa de reação (g/l/dia),  $q_s$  = taxa de consumo específica de substrato (g/célula/dia),  $X$  = densidade celular ( $10^6$  células / dia)

Este sistema é utilizado para determinar o consumo e taxas de produção de substrato, metabolitos, e produtos em biorreatores de perfusão sem retenção de substratos ou metabolitos (Adams *et al.*, 2007).

#### 4.4 Produtividade do processo de Perfusão

A maior produtividade do processo em perfusão, em relação ao modo *fed-batch*, é reconhecida como a sua grande vantagem. Contudo, devido às constantes diluições do conteúdo do biorreator, os “tieters” no processo em perfusão, são em média inferiores comparando com o processo em *fed-batch*, se o produto não ficar retido no biorreator (Yang *et al.*, 2016)

A produtividade volumétrica ( $VP$ (g/l/dia)) define-se como o rendimento do produto por volume do biorreator. É calculada a partir da concentração do produto no momento, multiplicada pela taxa de colheita e descreve a produtividade, em um determinado momento.

$$VP_i = c_{p,i} \times H_i = X_i \times q_{p,i},$$

em que  $VP$  = Produtividade volumétrica (g/l/dia),  $c_{p,i}$  = concentração de produto no dia  $i$  (g/l),  $H$  = taxa de colheita de cultura ( $dia^{-1}$ ),  $X$  = densidade celular ( $10^6$  células / ml),  $q_p$  = produtividade celular específica (pg/célula/dia) (Yang *et al.*, 2016).

**Tabela 5.** Comparação dos rendimentos entre *Fed-batch* e Perfusão

	<b>Fed-batch</b>	<b>Perfusão</b>
Densidade celular viável	17	60
Densidade total	34	90
Viabilidade	50	70
Concentração do produto	6	1,1
Taxa de troca de meio de cultura	0,05	2
Produtividade volumétrica	0,43	2,2
Ciclos por ano	20	7
Total acumulado(kg)	24	139

O rendimento ( $Y(g)$ ) da produção em *upstream*, é definido como a massa do produto acumulado. Em *fed-batch*, o rendimento é igual à concentração de produto da colheita multiplicado pelo volume da colheita. No caso de o bioprocessamento ser em modo “*fed-batch concentrado*”, o produto é retido no biorreator e a colheita é efetuada de modo similar ao processo *fed-batch*. Para células de elevada densidade, a biomassa sólida (volume celular concentrado (%)), é uma fração significativa do volume total de meio da cultura que é necessário considerar (Yang *et al.*, 2016). Na perfusão, o rendimento diário é igual à massa acumulada de produto desde o início do processo.

$$Y_i = \int_0^i c_{p,i} \times H_i,$$

em que  $Y$  = rendimento (g),  $c_p$  = concentração do produto (g/l),  $H$  = taxa de colheita ( $dia^{-1}$ ).

O *Space time yield* ( $STY$ (g/l/dia)) é igual ao rendimento  $Y$  (equação anterior), dividido pela duração do processo e pelo volume do biorreator. É por vezes confundido com a produtividade volumétrica, mas é uma definição mais precisa da produtividade geral de um processo em *upstream*. A diferença na produtividade entre o processo *fed-batch* e processo em perfusão é melhor entendida em termos de  $STY$  (Langer & Rader, 2014).

$$STY_i = \frac{Y_i}{V_{BR} \times (t_i - t_0)},$$

em que  $Y$  = rendimento (g),  $t$  = tempo do processo (dias).

Para calcular a produtividade celular ( $q_{p,i}$ ) pode-se utilizar a seguinte equação,

$$q_{P,i} = ((c_{P,i} - c_{P,i-1}) \times (t_i - t_{i-1})^{-1} + P \times c_{p,i}) \times X^{-1},$$

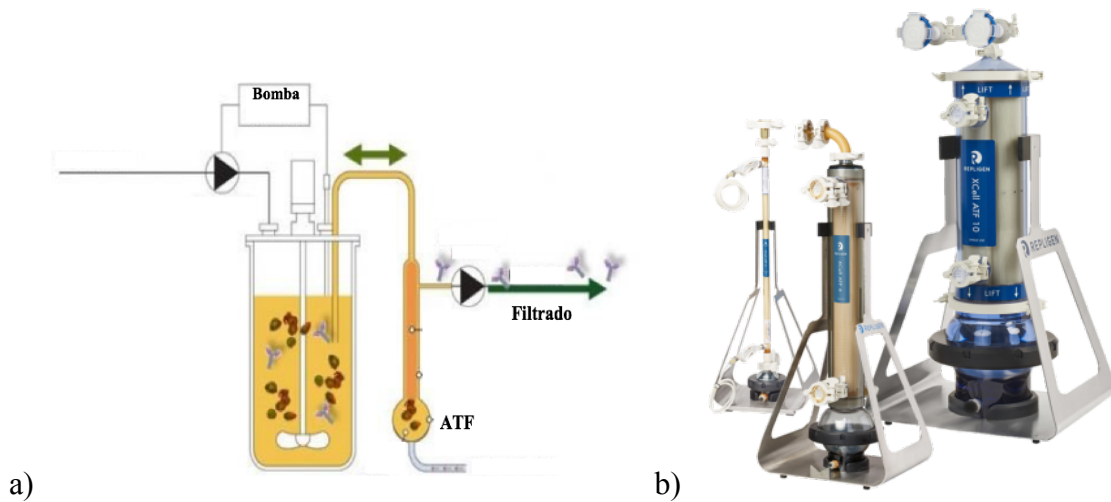
em que,  $q_p$  = produtividade celular específica (pg/célula/dia),  $P$  = taxa de perfusão ( $dia^{-1}$ ),  $c_p$  = concentração de produto (g/l),  $X$  = densidade celular ( $10^6$  células /ml) .

De notar que em contraste com o rendimento,  $q_p$  tem que ser calculado, com base na taxa de perfusão  $P$ , e não pela taxa de colheita  $H$ , se aplicada uma estratégia de purga. Neste caso de acordo com a equação  $P = B + H$ ,  $P$  é maior que  $H$ , devido à taxa de purga  $B$ . O produto produzido pelas células, mas perdido pela purga, deve ser considerado para evitar uma subestimação do valor  $q_p$  (Langer & Rader, 2014).

#### 4.5. Dispositivos de retenção celular

Para conseguir-se a perfusão, é necessário anexar ou incluir no biorreator um dispositivo de retenção celular (CRD) (Figura 19). A seleção deste dispositivo tem grande impacto, no processo de perfusão, na densidade celular e produtividade. Os CRDs são classificados como sistemas fechados se existir uma barreira física, por exemplo, uma membrana de filtração, com 100% de retenção celular, ou sistemas

abertos, que permitem que uma fração das células passe pelo sistema deixando o biorreator (Woodside *et al.*, 1998).



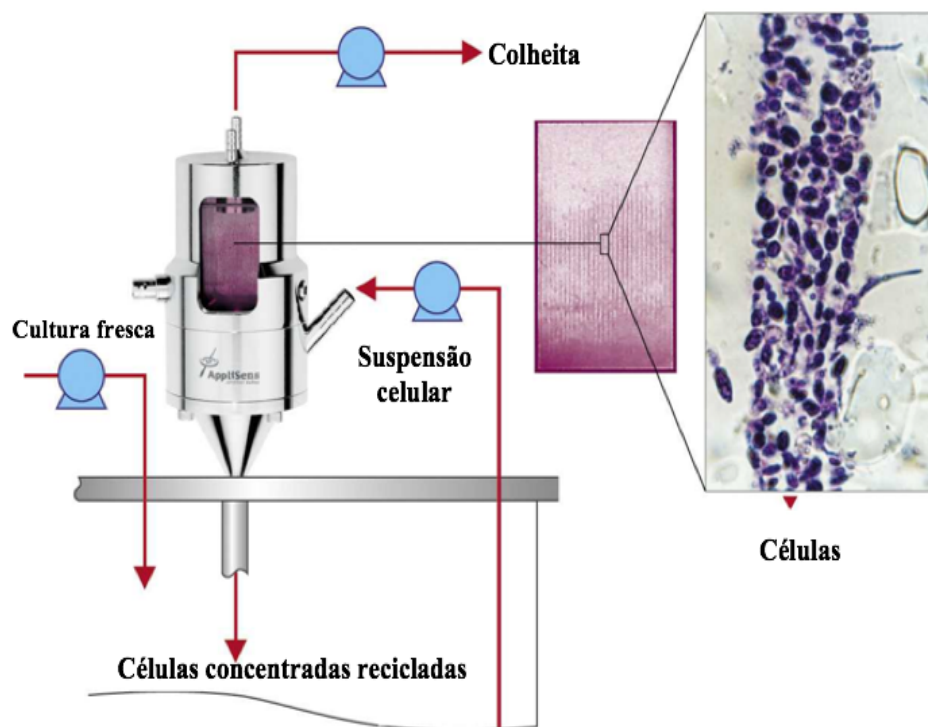
**Figura 19.** a) Esquema representativo de um modo perfusão com um sistema ATF de retenção celular acoplado; b) Repligen©Xcell™ ATF System.

Os sistemas fechados permitem densidades celulares mais altas, mas maior acumulação de células mortas e detritos no biorreator, resultando em menor viabilidade da cultura e incrustação da membrana, bloqueando o filtro (Kelly *et al.*, 2014). Vários estudos realizados por Clincke *et al.* & Karst *et al.*, em sistemas ATF e TFF demonstram o supramencionado (Clincke, et al, 2013, Karst, et al, 2016).

Em contraste, os dispositivos de retenção abertos podem ser mais fáceis de operar durante longos ciclos de processo, já que as células mortas e detritos são constantemente removidos do biorreator (Baptista *et al.*, 2013; Godawat *et al.*, 2012). No entanto, os parâmetros de CRDs abertos requerem otimização adicional afetando a densidade celular, e portanto, o volume de produtividade no processo de perfusão, em última análise, é limitado. A eficiência do dispositivo de retenção tem que ser considerada em escala e tecnologia adequada para alcançar um desempenho comparável. Por último, a colheita não estará isenta de células indesejáveis, logo, no processo de *downstream* é necessário um passo adicional de remoção de células (Godawat *et al.*, 2012).

Os dispositivos de retenção celular mais relevantes no modo de perfusão são:

- Colonizadores de células – cónicos e inclinados
- Centrifugadoras
- Imobilização celular
- Filtros de rotação, internos e externos
- Filtros *Hollow Fiber*
- Ressonância Acústica (Figura 20)
- Microfiltração
- Filtração tangencial alternada (ATF)



**Figura 20.** Esquema típico de dispositivo de retenção celular acústico (BioSep Acustic perfusion system®)

#### 4.6. Definição de estado estacionário (celular)

Os bioprocessos em modo contínuo, oferecem a vantagem de poderem ser operados no estado estacionário, ou fase estacionária, ou seja, quando não ocorrem alterações nos parâmetros críticos do processo, enquanto este se mantiver estável. Nos processos de perfusão com células de mamíferos, a duração do estado estacionário é tipicamente

limitada, devido à instabilidade genética dos organismos e limitação operacional dos dispositivos de retenção celular (Subramanian, 2014).

Para uma fase operacional em estado estacionário, é necessário que todos os inputs e outputs, bem como, todos os parâmetros do biorreator se mantenham constantes, ao longo do tempo, como por exemplo, a densidade celular viável, viabilidade, concentração e qualidade do produto, concentração de metabolitos e nutrientes, pH (Subramanian, 2014).

Pode ser necessário observar o processo durante vários dias para determinar se o estado estacionário foi atingido pois alguns nutrientes podem ser consumidos a uma taxa ligeiramente maior do que a taxa de consumo de nutrientes frescos, de modo que uma limitação só se tornará evidente, após algum tempo de execução do bioprocessamento. Em resumo, o estado estacionário em perfusão de cultura celular é difícil de atingir, manter e demonstrar (Subramanian, 2014).

#### 4.7. A Perfusão

O processo em perfusão (Figura 21) pode ser segmentado em diferentes fases sequenciais: depois da inoculação, as células crescem, tipicamente, de forma exponencial durante vários dias (fase crescimento exponencial).

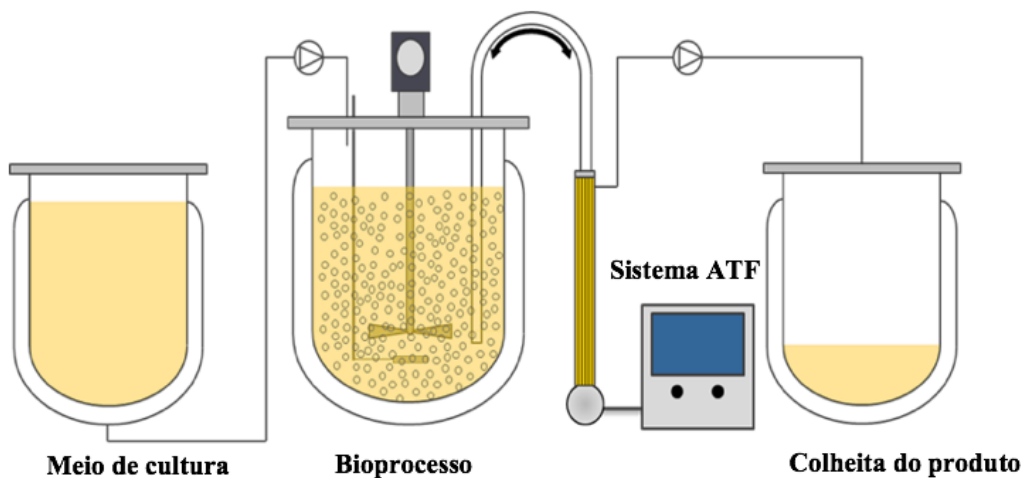


Figura 21. Esquema típico do modo perfusão

A perfusão é iniciada e a taxa de perfusão aumenta para prevenir a limitação de nutrientes para o meio e se atingir grande densidade celular. Quando se atinge a VCD alvo, o processo estabiliza para manter esta VCD até ao período de transição. No ambiente ideal, resulta na fase estacionário durante vários dias. Durante as várias fases, as células requerem diferentes concentrações de nutrientes, sendo necessário otimizar a cultura, de acordo com esta variável (Vijayasankaran *et al.*, 2009).

Um aspeto crítico no desenho do processo em modo perfusão é a estabilidade do produto. Alguns produtos (e.g, fatores sanguíneos, enzimas terapêuticas e algumas proteínas de fusão), são propensos a modificações bioquímicas no biorreator, como cortes enzimáticos, oxidação, desaminação o que afeta negativamente a eficácia terapêutica dos produtos. Para estes, o tempo de residência no biorreator é um parâmetro crítico do processo. No passado recente, a perfusão era aplicada a estes biofármacos, apesar da alternativa do modo *fed-batch*, pois este modo não permite controlar o tempo de residência. O tempo máximo de residência  $RT_{max}$ , pode ser determinado experimentalmente, e o processo de perfusão desenhado de acordo com esses resultados. Se a taxa de perfusão for selecionada para manter  $RT < RT_{max}$ , a otimização do meio de cultura e processo, leva à produção de células com maior densidade celular e/ou uma maior produtividade do processo em geral, mantendo a qualidade e eficácia do produto (Konstatinov *et al.*, 2006; Trummer *et al.*, 2006).

Um parâmetro que também é importante na implementação de processos de perfusão, e que está a ser discutido, é se é realmente desejável manter o estado estacionário, durante longos períodos de tempo. A operação na fase estacionária, requer um controlo ativo da densidade celular, como por exemplo, rejeitar a parte da cultura celular (purga). Como esta estratégia, inclui a rejeição de produto, o rendimento geral do processo diminui. Várias estratégias, para reduzir a taxa de crescimento, podem ser utilizadas; controlar a quantidade de nutrientes, adicionar inibidores de crescimento, ou redução da temperatura (Yang, et al, 2016)., para reduzir as perdas de produto por purga. Outros processos de perfusão, para evitar perdas de produto, são realizados sem purgas, maximizando a produtividade, em detrimento do estado estacionário. Em geral, como o processo é altamente dinâmico, não se consegue atingir o estado estacionário. Por exemplo, se a taxa de colheita se mantiver constante e as células com um crescimento sem restrições, o *CSPR* mudará constantemente (Chuppa *et al.*, 1997; Fox *et al.*, 2003).

Importante referir, que a introdução de limitações, na concentração de nutrientes e alteração da temperatura, pode alterar o metabolismo celular (Du *et al.*, 2015). Na produção de mAb em modo *batch*, foram testadas temperaturas entre 28 e 37° C em células de hibridoma (Reuveny *et al.*, 1986). A 31°C, foi visível, maior viabilidade celular e menor índice de absorção de glucose. Outros resultados mostraram uma influência positiva com a redução da temperatura para 33°C, na densidade celular e absorção de glucose (Sureshkumar & Murtharasan, 1991). A taxa específica de produção manteve-se constante no intervalo de 34 a 39°C (Bloemkolk *et al.*, 1992). Com células CHO foi demonstrado que a diminuição da temperatura de 37 para 34°C, não influenciou a densidade celular ou a viabilidade celular, mas sim a taxa de crescimento. Ainda se verificou que o intervalo de temperaturas utilizado não influenciou a taxa de produção de mAb.

A aplicação destes resultados no modo perfusão pode resultar em taxas de perfusão mais baixas e por consequência, diminuição do meio de cultura e volumes a serem tratados no processo em *downstream*. Outra vantagem de temperaturas de fermentação mais baixas, é a menor taxa de consumo de  $O_2$ , que pode limitar em larga-escala o processo de produção (Ozturk *et al.*, 1996). Para concluir, o processo de controlo da temperatura, pode ter grande impacto no metabolismo celular e, como consequência, controlar as necessidades dos meios de cultura, que precisam ser considerados, durante o processo e desenvolvimento do meio de cultura. Se as taxas metabólicas são determinadas, com o objetivo de otimizar o consumo de nutrientes, as temperaturas alvo devem ser aplicadas para garantir que a absorção seja a adequada.

A absorção de nutrientes e a taxa de produção de metabolitos também se alteram, com a  $CSPR$ , como já referido ( $CSPR_{min} < CSPR_{crit}$ ). Em contraste, em processos sem rejeição de células, o crescimento celular irá parar automaticamente quando,  $CSPR_{min}$  e  $X_{max}$  forem atingidos, indicativo de aproveitamento completo do meio de cultura disponível. Um processo dinâmico, como o apresentado, permite um controlo simplificado e uma diminuição do tempo para a produção de células com maior densidade e utilização mais económica de meio de cultura.

#### 4.8 Formatos inovadores de perfusão

O processo escolhido para produzir produtos instáveis é o modo de perfusão. Contudo, existem exemplos de moléculas estáveis produzidas através do bioprocessamento em perfusão como os mAb (Pollock *et al.*, 2013) estando-se a avaliar outras aplicações inovadoras de processos de perfusão. Se é possível produzir moléculas estáveis e instáveis, através de processos de perfusão, esta técnica pode ser aplicada a uma plataforma única *upstream*, para diferentes produtos biofarmacêuticos em instalações flexíveis (Figura 18) de produção de multiprodutos (Gottschalk, et al., 2013).

O caminho do desenvolvimento é a intensificação do uso da perfusão. Com o aumento dos custos para a indústria biofarmacêutica, a perfusão torna-se fundamental devido aos possíveis ganhos de produtividade em relação aos processos *fed-batch standard*. O tamanho dos biorreatores necessários podem ser reduzidos, permitindo menores investimentos em instalações. A menor escala dos biorreatores, também permite o uso de biorreatores descartáveis, que no presente, são limitados em termos de volume (Pollock *et al.*, 2013; Eibl *et al.*, 2010). Num formato chamado “*fed-batch concentrado*” (CFB) usam-se biorreatores anexados a um sistema ATF, equipado para a nanofiltração, para não apenas reter células no biorreator, mas também o produto (Zijlstra *et al.*, 2013). Neste esquema, todo o meio de cultura gasto pode ser descartado, pois não contém nenhum produto, o que simplifica o processo de recolha da colheita de perfusão em *downstream*.



**Figura 22.** Sistema de cromatografia multicolumna para biorreatores em processos no modo perfusão (Cadence™ BioSMB)

Não se deverá proceder à purga devido à alta concentração do produto no reator, a fase estado estacionário não é atingida assim, a qualidade do produto é caracterizada em função do tempo do processo ou no final do processo. Aqui a colheita e a purificação são realizadas em modo *batch*. Foi relatado que o rendimento global destes processos é reduzido por uma grande fração de sólidos no biorreator, bem como uma menor produtividade específica, em comparação com o modo tradicional *fed-batch*, que será a causa de uma diminuição do *CSPR* equivalente (Yang *et al.*, 2016).

Em contraste é necessário atingir a fase estacionária, para implementar um processo contínuo em perfusão para a produção de biofármacos, uma cadeia interrupta de produção em *upstream* à purificação em *downstream* utilizou um ATF no modo de microfiltração, com acoplamento direto da perfusão em estado estacionário, para a produção de anticorpos, bem como enzimas terapêuticas, a uma cromatografia de afinidade semicontínua com várias colunas (Warikoo *et al.*, 2012).

Uma das vantagens de uma longa duração do processo em perfusão é que podem melhorar a taxa de utilização de uma fábrica de produção, pois serão menores os tempos de paragem para a limpeza e preparação dos biorreatores. Neste exemplo, o processo integrado em contínuo operou de forma autónoma durante várias semanas em fase estacionária da cultura. (Yang, 2016).

Para além da aplicação da perfusão na fase de produção, já pode ser aplicada no “inoculation train”, que normalmente é realizada em modo *batch*, numa série de biorreatores de escala crescente. Neste processo, as células têm que se manter na fase exponencial. Para evitar limitação nos nutrientes, a densidade celular é muito baixa. Ao utilizar a perfusão, podemos atingir densidades celulares muito maiores sem limitação de nutrientes, o que permite diminuir várias fases de expansão e aumentar a flexibilidade de produção (Yang *et al.*, 2014). As células também podem ser retiradas do biorretor em perfusão e congeladas (Seth *et al.*, 2013). Ao retirar o descongelamento e as etapas de expansão do passo de produção, pode-se aumentar consideravelmente a flexibilidade de uma unidade de produção biofarmacêutica.

#### 4.9. Tipos de biorreatores para culturas em contínuo modo perfusão

##### i. Biorreatores de suspensão de tanque agitado

Os biorreatores agitados mecanicamente (STR) (Figura 23), contendo culturas suspensas ou dependentes de ancoragem no microportador, são a primeira escolha da indústria biofarmacêutica. São os sistemas mais aceites, para culturas suspensas, pois permitem uma operação simples e de fácil *scale-up* (Vijayasankaran *et al.*, 2009).



**Figura 23.** GE Healthcare Biorreator

##### ii. Biorreatores de filtro fixo/flutuante

Os biorreatores pré-esterilizados de uso único, de ação de onda ou balanço, de diferentes fabricantes, fornecem uma solução capaz para operar em modo perfusão (Figura 24). Neste caso, o movimento balanço dos sacos descartáveis, fornece a transferência de oxigénio necessário para as células em cultura. Utiliza um filtro flutuante inovador, que é mantido limpo e desobstruído pelo movimento de onda (Vijayasankaran *et al.*, 2009).



**Figura 24.** WAVE® Bioreactor GE Healthcare Life Sciences©

### **iii. Biorreatores *Packed Bed***

Biorreatores do tipo *Packed Bed* (Figura 25) conseguem o aprisionamento de um tipo de cultura, que pode manter uma variedade de células por longos períodos de tempo. Nestes biorreatores a ruptura é baixa devido à imobilização das células em matriz macroporosa (Vijayasankaran *et al.*, 2009).



**Figura 25.** Biorreator icellis® 500 L

**iv. Biorreatores em modo perfusão *Hollow Fiber***

Os Biorreatores *Hollow Fiber* em modo perfusão permitem culturas de grande densidade celular (Figura 26). As células, geralmente, são semeadas dentro de um cartucho, mas fora das fibras ocas, no espaço extra capilar. Nesta configuração, o meio de cultura fresco é bombeado através das fibras ocas, o que permite um direcionamento dos produtos (Vijayasankaran *et al.*, 2009).



**Figura 26.** Biorreator Hollow Fiber Cell Lab©

Na Tabela 6 apresentam-se alguns biorreatores de perfusão disponíveis no mercado.

**Tabela 6.** Biorreatores disponíveis no mercado para o bioprocesso contínuo em modo perfusão.

Nome do biorreator	Volume (L)	Tipo de recipiente	Mistura	Fabricante
Wave	1-500	<i>Pillow</i>	<i>Rocking</i>	GE Helthcare
Biostat Cultibag RM	1-100	<i>Pillow</i>	<i>Rocking</i>	Sartorius Stedium Biotech
XRS-20	2-20	<i>Pillow</i>	<i>Two-dimensional Rocking</i>	Pall Life Sciences
Applifex	1-25	<i>Pillow</i>	<i>Stirrer</i>	Aplikon Biotech
Cell tainer®	0,2-35 / 5-275	<i>Pillow ou square</i>	<i>Stirrer</i>	Celltainer Biotech
Hyclone™	30-2000	<i>Tankliner</i>	<i>Stirrer</i>	Thermo Fisher
Hyperforma SUF	30/300	<i>Tankliner</i>	<i>Stirrer</i>	Thermo Fisher
Biostat Cultibag STR	50-1000	<i>Tankliner</i>	<i>Stirrer</i>	Sartorius Stedium Biotech
XDR™	10-2000	<i>Tankliner</i>	<i>Stirrer</i>	GE Helthcare
XDR-50 MO	50	<i>Tankliner</i>	<i>Stirrer</i>	GE Helthcare
Mobius Cellready	50-2000	<i>Tankliner</i>	<i>Stirrer</i>	Merk-Millipore
Allegro™	20-200	<i>Tankliner</i>	<i>Stirrer</i>	Pall Life Sciences
Nucleo™	50-1000	<i>Tankliner</i>	<i>Paddle</i>	Pall Life Sciences
SBX	10-200	<i>Tankliner</i>	<i>Orbital shaker</i>	Kuhner

#### 4.10. Estratégias para o desenvolvimento do meio de cultura em perfusão.

A já descrita heterogeneidade do bioprocesso em perfusão, indica que a formulação do meio de cultura adequado aos diferentes tipos do mesmo processo é um desafio. Assim, geralmente, os resultados ótimos são alcançados através de formulações personalizadas e tendo em conta a linhagem celular, oferecidas por especialistas em meios de cultura. Em alternativa, meios de cultura em plataformas de base de dados ou comercialmente disponíveis, podem ser candidatas a serem utilizadas (Vijayasankaran *et al.*, 2009). Vários exemplos demonstram que o meio de cultura desenhado para o modo *batch*, que normalmente apresenta, grandes concentrações de nutrientes, podem ser aplicados no

modo perfusão (Clutterbuck, 2015; Cunningham, 2014). Uma vez desenhada a formulação inicial para determinada linhagem celular e o processo pretendido identificado, várias vias para o desenvolvimento e otimização podem ser seguidas.

Vários métodos para melhorar o meio de cultura celular, estão a ser baseados em estudos do metabolismo celular (Vijayasankaran *et al.*, 2009). Geralmente, uma análise à quantidade gasta de meio de cultura, dependendo da capacidade analítica do consumo de vários nutrientes, bem como o estudo da produção de metabolitos. Estes dados, são utilizados para eliminar limitações celulares, ao nível de um único componente. Uma análise transcriptoma, pode ser utilizada em células CHO (Hammond *et al.*, 2011; Jayapal & Goudar, 2014; Kim, 2012). Este método simula as condições experimentais numa amostra de células. Aplicou com sucesso uma nova geração de sequenciação (NGS) para caracterizar a transcriptoma de células CHO de grande e pequena produção (Shaub *et al.*, 2010). Este desenvolvimento, permite aumentar os títulos através uma concentração suplementar do(s) componente(s) limitantes do meio de cultura. A transcriptômica que usa *microarrays* CHO foi validada com sucesso num *scale-up* de um processo em perfusão (Jayapal & Goudar, 2014) e o estudo da resposta ao stress das células CHO aplicado um desarranjo hidrodinâmico (Sieck *et al.*, 2014). Estes métodos têm grande potencial ao nível do comportamento celular e a um nível holístico. No entanto, o design experimental requer muitos outros aspetos que podem causar variações, e os resultados obtidos precisam de ser avaliados cuidadosamente, para identificar as respostas específicas das condições experimentais (Polizzi & Kontoravdi, 2015). Para além de melhorar a composição do meio de cultura, estes métodos também podem se aplicados em avanços nas linhagens celulares (Le *et al.*, 2015).

As experiências empíricas, podem ser mais robustas, se se aplicar uma análise multivariável e design experimental, reduzindo drasticamente o número de repetições para monitorizar vários parâmetros, por exemplo, com os componentes e as suas respetivas concentrações, diminuindo os custos associados (Rouiller *et al.*, 2013). Para esta abordagem. São necessários sistemas de alto rendimento com *software* para o projeto e avaliação de resultados. Por outro lado, atinge-se parâmetros robustos e viáveis, com a simples análise da viabilidade da densidade celular e produtividade.

A limitação mais comum do desenvolvimento de um meio de cultura, a ser utilizado num bioprocessamento em perfusão, é definir a taxa de consumo de substrato de uma determinada linha celular para um novo meio de cultura, pois mesmo se conhecermos o limite de um substrato para um determinado meio e linhagem celular, devido às diferenças entre linhagens celulares e variações de clone para clone, o substrato vai variar de célula para célula. Uma estratégia para ultrapassar esta limitação é a introdução deliberada de um substrato *a priori*, limitado no meio de cultura. Ideal, será um nutriente que possa ser medido de forma rápida e fácil, exemplo da glutamina ou glucose. Se o nutriente limitante atingir concentrações baixas, a taxa de perfusão aumentará, para evitar outras limitações (Jordan *et al.*, 2013). Nos modelos *scale-down*, é mais simples, pois é mais fácil controlar as limitações do meio de cultura, podem ser implementados sem depender da escala do biorreator.

#### 4.11. Requisitos específicos da linhagem celular

A primeira linha celular do ovário do hamster Chinês (CHO) foi isolada a partir do *Crisetulus griseus* por Theodore T. Puck no final dos anos 50 (Tijo & Puck, 1958). Nos anos 60, a linha celular CHO foi alvo de infecções virais e mutagêneses e no processo várias adaptações nas linhagens celulares foram criadas. Em 1963, a linha celular CHO-K1 dependente e prolina foi derivada do original (Rapp e Hsu, 1965, Waubke *et al.*, 1968). A linha celular CHO pode crescer em suspensão, é fácil de manipular em *scale-up* e biorreatores em modo contínuo e pode crescer em ambientes quimicamente bem definidos sem suplementos como proteínas.

Em 1987, o ativador do tecido plasminogénio foi aprovado pela FDA como o primeiro biofármaco produzido por CHO (Kim, 2012). Hoje, a cultura de células CHO é usado pela indústria biofarmacêutica para produzir, anticorpos monoclonais e outros fármacos proteínas, como fatores de crescimento e citocinas pois apresenta capacidade pós translacional e glicosilação idêntica aos humanos (Walsh & Jefferis, 2006).

As células CHO atingem grandes densidades viáveis, mais de  $10^7$  células/ml em modo *batch* e *fed-batch* e volumes de  $20\text{ m}^3$  (Kompla & Ozturk, 2006), e mais de  $10^8$  células/ml em modo de perfusão. Regularmente excedem taxas de 2g/l de proteínas recombinantes por meio de seleção de células hospedeiras, vetores de expressão, L-

glutamina sintetase (GS) e seleção de estratégias como a deleção da dihidrofolato redutase (*dhfr*<sup>-/-</sup>) por mutagenese. (Wood *et al.*, 1990; Daramola *et al.*, 2014). A CHO original foi alvo de modificações e mutagêneses resultando em várias linhas que existem os dias de hoje. (Figura 27). Cada linha celular tem os seus requisitos quanto ao meio de cultura a ser utilizado, incluindo produtos específicos para a produção de biofármacos. Para algumas linhagens, foram criadas plataformas específicas de meio de cultura, desenvolvidas de acordo com o tipo de metabolismo celular, por exemplo, Cellvento™ (Figura 8) ou Ex-Cell® (Lewis *et al.*, 2013).

Apesar da importância da própria linha celular, os métodos de transfecção têm importância a considerar. As células CHO são frequentemente transfetadas por DHFR ou sistemas GS, usando marcadores seletivos adicionados como suplementos ao meio de cultura (Palomares *et al.*, 2010). O sistema GS seleciona as células que conseguem crescer sem a adição de glutamina, permitindo a eliminação desta.

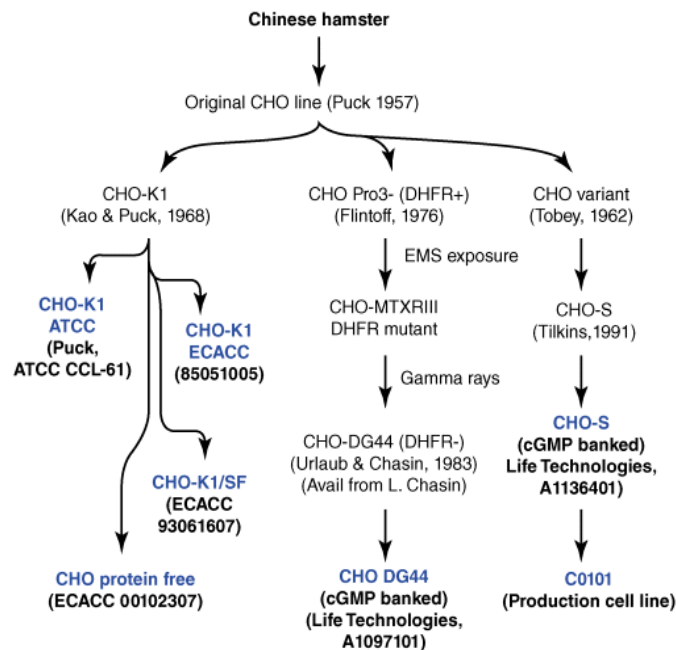


Figura 27. Linha celular CHO

#### **4.12. Modelos de *scale-down* para processos de perfusão**

O desenvolvimento de modelos *scale-down* é um método que reproduz as condições de grande escala para um modelo similar em pequena escala. Similar ao clássico *scale-up*, o modelo *scale-down*, precisa de simular um parâmetro limitante de um processo o mais próximo possível da realidade, por exemplo, a transferência de oxigênio de vários processos bacterianos (Oosterhuis & Kossem, 1984; Enfors *et al.*, 2001; Sieck *et al.*, 2018).

Em processos com células de mamíferos, o constante microambiente criado para a cultura celular, é proposto, como o ajuste do pH, temperatura, nutrientes, mas também o design do biorreator como ajuste da taxa de dissipação da energia específica, tempo de mistura, velocidade de gás superficial, transferência de oxigênio, volume de gás de retenção e  $pCO_2$  (Oosterhuis & Kossem, 1984; Enfors *et al.*, 2001; Sieck *et al.*, 2018).

Vários autores definem a *CSPR* como o fornecimento meio de cultura fresco, para uma única célula. O *CSPR* é independente da escala e do sistema de cultura, logo pode ser aplicado em perfusão. Se todos os simuladores aplicarem o mesmo *CSPR*, as células têm comportamento metabólico similar. Será o melhor critério para modelos *scale-down* em modo perfusão (Oosterhuis & Kossem, 1984; Enfors *et al.*, 2001; Sieck *et al.*, 2018).

#### **4.13. Vantagens do bioprocesso em contínuo no modo perfusão**

O bioprocesso em contínuo no modo perfusão em *upstream*, oferece as seguintes vantagens sobre o processo em modo *fed-batch* (Sieck *et al.*, 2018)

- O produto é colhido em modo contínuo;
- As condições de funcionamento do biorreator são constantes, e podem ser controladas com precisão;
- Produtos instáveis são removidos continuamente;
- Maior produtividade de volume; 5 a 10 vezes maior;
- A produção pode ser feita em biorreatores mais pequenos;
- Densidades celulares maiores;

- O biorreator pode operar continuamente, durante maiores períodos de tempo, com células de elevada densidade;
- Custo de capital reduzido
- Redução de custos operacionais

Por outro lado, segundo *Konstantinov & Cooney* (Konstantinov & Cooney, 2014), os fatores que podem limitar o processo de perfusão são os seguintes:

- A estabilidade do produto no ambiente no biorreator, pode requerer a sua remoção após algum tempo de residência ( $RT_{max}$ ). A distribuição do tempo de residência em *CSTRs* tem que ser considerada.
- A taxa de perfusão pode ser limitada pelo dispositivo de retenção celular, para um máximo ( $P_{max}$ ), especialmente para grandes biorreatores em escala.
- A densidade máxima celular que o biorreator pode suportar, por exemplo, em termos de *OTR*. Maiores *OTR* podem ser atingidas se, aumentarmos a taxa de fluxo de oxigénio ou a velocidade de agitação. Ambos os parâmetros podem causar “shear stress” ao produto numa das fases da produção. Em geral, ficou demonstrado que a sensibilidade do “shear” é exagerada, e que são necessárias condições muito adversas para alterar as modernas linhas CHO.
- O mais importante relativamente ao meio de cultura é que  $CSPR_{min}$  ou  $CSPR_{crit}$  limitem o possível  $X_{max}$  devido ao  $P_{max}$  do dispositivo de retenção celular. A otimização do meio de cultura e linhagem celular para um determinado processo em perfusão permitirá a otimização do espaço de produção.

#### **4.14. Bioprocessos que já utilizam o modo perfusão.**

A combinação de múltiplas etapas de processamento contínuo em perfusão numa pequena zona de fabrico contínua já demonstrou apresentar maior produtividade em termos do processo *upstream* e *downstream* (Rogler *et al.*, 2015)

Os exemplos mais recentes até à data foram apresentados pela *Sanofi-Genzyme*<sup>TM</sup> (Framingham, MA), *Merk*<sup>TM</sup> (Kenilworth, NJ) e pela *Bayer Technology Services*<sup>TM</sup> (Leverkursen, Alemanha).

#### **i. Produção de enzimas humanas recombinantes e mAbs - Sanofi Genzyme<sup>TM</sup>**

A Sanofi genzyme comercializa várias enzimas humanas recombinantes. Estas proteínas são intrinsecamente instáveis e perdem atividade num biorreator no modo *fed-batch*. Devido aos desafios relacionados com a estabilidade do produto, a produção em *upstream* de enzimas recombinantes, foi implementada num biorreator em contínuo no modo perfusão. A taxa de perfusão é normalmente de cerca de 1 volume de biorreator/dia para que a proteína esteja muito menos tempo no biorreator do que num processo *fed-batch*, que pode ser operado por mais de 14 dias até à colheita.

O processo em modo perfusão pode operar em contínuo durante 60 dias ou mais daí ser acoplado a uma contínua purificação em *dowstream*. Esta estratégia já foi empregue com sucesso para produção de enzimas humanas recombinantes e mAbs (Warikoo *et al.*, 2012). Mais recentemente, foi apresentada uma prova de um processo de fabrico contínuo totalmente integrado para mAbs (Godawat *et al.*, 2015).

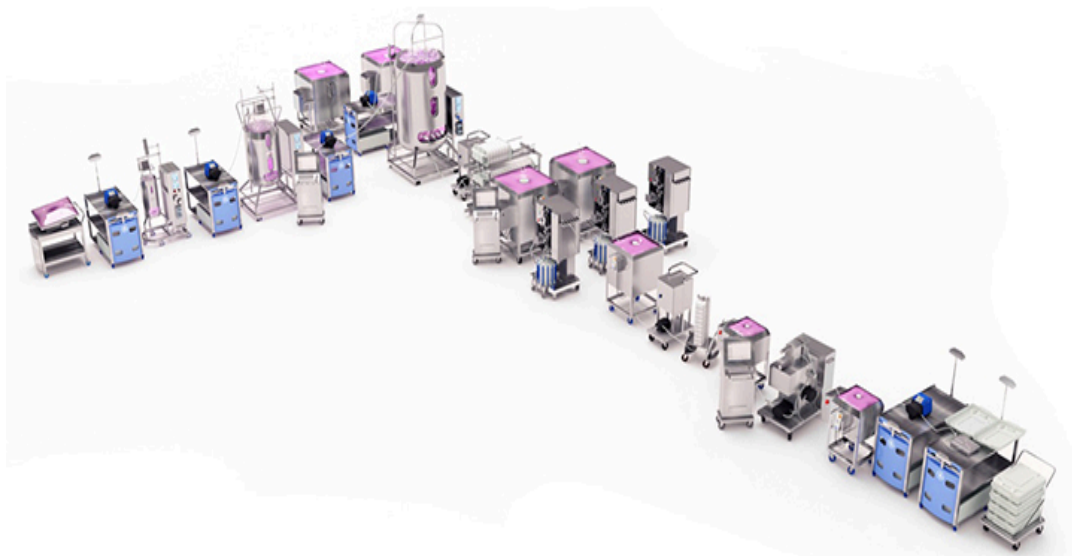
Ao nível do *upstream*, o estudo conceptual, envolveu um biorreator de 12 L com tecnologia ATF de retenção celular. O reator foi operado com 50-60 milhões de células/ml e uma taxa de perfusão de 2-3 volumes de biorreator/dia (0,04-0,05 nl/célula/dia). A produtividade específica estabilizou por volta de 0,8 g/L/dia, produzindo 10 g/dia de produto (a concentração da alimentação efluente estava entre 0,28-0,42 mg/l).

A solução de alimentação passou por um filtro de 0,2 µm, para um bolsa de 2 l antes de entrar no processo de cromatografia por captura. Este passo foi implementado num sistema 3C-PCC (GE Healthcare<sup>TM</sup>), operação em 3 colunas de proteína A. O sistema 3C-PCC foi operado para cada coluna seja eluída a cada 4 horas. A inativação de vírus envolveu 1 hora de incubação a pH baixo. Os picos de eluição foram assim inativados

um a um, antes da purificação da solução de produto intermediário (Subramamian, 2018).

Antes do refinamento, o produto inativado foi diluído para reduzir a condutividade por adição em linha de um tampão de diluição. A solução intermediária foi então aplicada noutro sistema 3C-PCC com três colunas de troca de iões. (Capto S®). O produto já eluído fez-se passar por uma membrana de adsorção diretamente ligada ao sistema 3C-PCC. O processo de troca de iões foi operado de tal modo que o produto foi eluído a cada 2h e o adsorvente de membrana lavado e regenerado a cada 24h. As condições de eluição do processo de permuta de catiões, foram desenhadas para não ser necessário ultrafiltração, antes da formulação (Subramamian, 2018).

Nenhum sistema integrado de controlo de processo foi utilizado para garantir que as taxas de fluxo volumétrico entre as operações das unidades subsequentes fossem equilibradas automaticamente (Subramamian, 2018).



**Figura 28.** Configuração do Bioprocesso contínuo em modo perfusão de USP-DSP

## ii. O bioprocesso Merk & Co. Inc.

A Merk & Co. Inc. é uma das empresas pioneiras do bioprocesso contínuo integrado. A Genzyme adotou a abordagem passo a passo (Warikoo *et al.*, 2012), para validar o princípio de uma plataforma de bioprodução integrada. A Merk começou a integrar

desde o início as unidades operacionais, utilizando componentes de uso único sempre que possível.

O laboratório é desenhado em alinhamento em ferradura, a começar com um biorreator em perfusão de 10 l na extremidade inicial até à extremidade final, local de recolha final do biofármaco (Brower, 2015). No centro do alinhamento, existe uma ilha analítica centralizada, que realiza vários ensaios em amostras que podem ser retiradas em quase qualquer fase do processo. (Figura 29)



**Figura 29.** Imagem 360° do laboratório da Merck©

O biorreator em modo perfusão é operado a 1g/l/dia de produtividade específica e as concentrações de saída do biorreator são aproximadamente de 1g/l. A retenção celular é realizada usando um sistema de filtração de fluxo tangencial de formato único da Specrum Labs™. A cromatografia Proteína A é implementada num sistema BioSMB da Pall Life Sciences™(Figura 22). A esterilidade do sistema BioSMB é protegida usando um filtro que é substituído diariamente. O produto eluído é recolhido para um pequeno vaso para gerir o fluxo intermitente proveniente do sistema de cromatografia multicolumna Proteína A. A inativação de vírus é realizada num reator de fluxo acoplado, que é dimensionado para proporcionar o tempo de incubação estipulado. Após adição da solução tampão num recipiente sobre pressão, o produto inativado é aplicado na coluna de troca de iões. O fluxo aplicado diretamente a outro sistema BioSMB, que opera a etapa de cromatografia de troca de catiões (Poros HS, Thermo®) em modo de captura do produto agregado.

A abordagem única da Merk utiliza um sistema operado de uma forma contínua, com biorreatores em modo perfusão e todas as unidades totalmente controladas, para que as taxas de fluxo que passam de um sistema para o outro serem automaticamente equilibradas. Para além destas vantagens, todas as amostras para caracterização do biofármaco e controlo do processo são automaticamente recolhidas e analisadas por um sistema LC-MS e uma UPLC. Todas as unidades e sistemas analíticos, são controlados por um sistema de processamento central, Delta V. A plataforma é desenhada para suportar a implementação de ferramentas de análise de dados multivariados, permitindo o controlo adaptativo das operações (Subramanian *et al.*, 2018).



**Figura 30.** Biorreator Mobius® 1000 L

### **iii. Produção de mAbs - Bayer Technology Services**

A divisão da Bayer© de produção de biofármacos abordou o problema criando uma plataforma industrial contínua e em formato de uso único (Klutz *et al.*, 2015). Uma vez montado por completo, a plataforma visa um fluxo de sistema tecnicamente fechado e, portanto, que seja concebível para operar todo o processo numa sala única. Com esta abordagem, a Bayer estimou que a produção completa, em biorreatores em modo perfusão, para um determinado biofármaco possa ser feita numa sala de apenas 19,2 × 9,6 m de área com 2 biorreatores de perfusão (200L), todos os sistemas de processamento *downstream* e tanques de preparação de tampões e meio de cultura. Uma escala piloto para instalação deste bioprocessamento foi implementada num espaço com uma

área de  $7 \times 14$  m em 2 seções. A primeira, com o processo *upstream* com 2 biorreatores em perfusão (10 l) com colonizadores de gravidade inclinados para a retenção celular. Os biorreatores foram operados a uma taxa de perfusão de 3 volumes de biorreator/dia. A densidade celular estacionária viável, estava na gama de 60 a 70 milhões de células/ml e a produtividade específica de 5,3 g/célula/dia. A solução colheita teve uma concentração de produto aproximadamente 0,115 mg/ml.

A solução límpida foi filtrada via 2 filtros Sartoguard NF®. Após alguns dias, atinge-se a pressão máxima num dos filtros, após o que, o fluxo do produto passa para o outro. A colheita foi pré concentrada e recolhida para um reservatório, usando o método de filtração “Hollow Fiber”, o que permitiu uma concentração da colheita dos biorreatores de 0,7 g/l.

Uma vez que a capacidade total de produção das seções de *upstream* e *downstream* não estavam totalmente alinhadas, foram operadas em cascatas de etapas separadas. No entanto no processo *downstream*, as operações estavam ligadas, para estabelecer uma plataforma de purificação totalmente contínua. A cromatografia de captura de mAbs foi operada usando o sistema BioSMB®. A inativação de vírus é realizada por um dispositivo de fluxo invertido.

O refinamento do biofármaco consiste em 2 etapas de cromatografia. Na fábrica de Leverkusen, foi realizado num modo misto (Capto Adhere®, GE Healthcare©) e uma etapa de cromatografia de permuta aniónica (Hypercel STAR AX®, Pall Life Sciences©) (Subramanian, 2018). Ambas as etapas foram operadas no modo de fluxo contínuo. A etapa de cromatografia mista, foi configurada como um processo de cromatografia de coluna múltipla, com um passo de carga contracorrente; a troca de aniões foi executada no modo de fluxo contínuo com duas unidades alternadas. As duas etapas são combinadas com um sistema BioSMB®. O processamento final em *downstream*, envolve filtragem adicional, filtração de vírus, formulação e etapas de controlo biológico de impurezas.

Todo o processo foi automatizado, usando o sistema Siemens PCS7®. Exceto o processo *upstream* (biorreatores e dispositivos de retenção celular), todo o processo *downstream* foi estabelecido para um único uso.

#### 4.15. Interpretação dos casos

Ambos os casos apresentados, apresentam uma combinação de biorreatores de perfusão com um processo contínuo *downstream*. É interessante reconhecer as similaridades entre os três processos (Tabela 7), para perceber a direção futura dos bioprocessos na indústria biofarmacêutica. Todos os processos apostam em biorreatores em modo de perfusão e uma multicolumn Proteína A para a etapa de recolha do produto. Os desafios incluem os dispositivos de retenção celular e inativação viral.

**Tabela 7.** Comparação das configurações dos casos apresentados

<b>Biorreator</b>	<b>Genzyme©</b>	<b>Merk©</b>	<b>Bayer©</b>
<b>Configuração</b>	Perfusão (12l)	Perfusão (10 l)	Perfusão (2x 10 l)
<b>Retenção celular</b>	ATF	TFF	Gravidade inclinado
<b>Captura</b>	3C-PCC	BioSMB	BioSMB
<b>Inativação Vírus</b>	Sim	Sim	Sim
<b>Polimento (1)</b>	3C-PCC Capto-S	Troca de aniões	BioSMB (modo mistura)
<b>Polimento (2)</b>	Sartobif Q	BioSMB Cation IX	Troca de aniões
<b>Automação</b>	Não	Delta V	Siemens DCS
<b>Produção</b>	8 g/dia	10 g/dia	22.7 g/dia
<b>Análise</b>	offline	Integrado	offline

## V. Conclusão

Os biofármacos são a classe com mais rápido crescimento de produtos farmacêuticos inovadores. A FDA aprovou 45 novos biofármacos em 2015, e no momento mais de 400 moléculas estão em fase de estudo clínico maioritariamente mAbs, anticorpos conjugados com fármacos, anticorpos multiespecíficos, proteínas manipuladas com glicano e fragmentos de outros fármacos.

Apesar do sucesso crescente, a indústria biofarmacêutica continua a enfrentar desafios competitivos rigorosos, nomeadamente económicos, regulatórios e políticos. Como resultado, há um impulso significativo para aumentar a produtividade geral dos bioprocessos farmacêuticos, reduzindo os prazos de desenvolvimento, custos de produção, mas mantendo a qualidade do produto.

As cadeias de abastecimento precisam de ser simplificadas e ágeis para responder às necessidades dos pacientes numa abordagem mais personalizada. A sincronização de fabrico deve diminuir o tempo entre o início da produção e a comercialização do biofármaco. O conceito de medicamento personalizado, suportado por um bioprocessos contínuo em modo perfusão fornece uma abordagem para minimizar os custos de inventário, reduzir o preço final e tornar os biofármacos acessíveis a toda a população mundial.

Estas questões estão a pressionar a indústria para se afastar das tradicionais instalações de produção, com biorreatores de aço inoxidável fixos e a optar alternativamente por módulos mais flexíveis e híbridos.

A produção de mAbs integrando a perfusão e a cromatografia multi-coluna, com a eliminação dos tempos de pausa, e membranas de purificação de alto rendimento, pode levar a uma significativa e redução de custos.

Irà permitir, que o fornecimento de adapte à procura em mudança e a um portfólio de múltiplas modalidades de fabrico de biofármacos.

Os biossimilares são outro aspeto no desenvolvimento da tecnologia que otimize os atuais processos. O primeiro anticorpo genérico já entrou no mercado e isto aumentou a pressão para desenvolver bioprocessos económicos e mais rápidos para de se manterem competitivos.

Contudo, não é só necessário melhorar o desenvolvimento do processo e implementar novas unidades de fabrico, mas também melhorar a qualidade do produto em si.

Em USP a eficiência do processo e as concentrações dos produtos aumentaram significativamente nas últimas décadas, resultando em concentrações de anticorpos na gama 10-13 g/l em processos *fed-batch*, e até 25 g/l via bioprocessos em modo perfusão (fruto do uso de dispositivos de retenção celular). Os resultados dessa otimização são; concentrações do produto elevadas, menor tempo de retenção no reator, grande produtividade e qualidade bem definida.

O processo de perfusão pode fornecer níveis muito maiores de produtividade do que os sistemas alimentados por lotes (*batch* e *feed-batch*), reduzindo assim os custos de produção. O processo de perfusão está muito mais próximo do estado estacionário do que um processo alimentado por *batch*, e, por norma, produz um produto mais consistente especialmente para moléculas que são sensíveis a mudanças nas condições dentro de um biorreator.

A perfusão só ainda não é usada com a maior frequência em grande parte porque é mais complexo de configurar do que os processos alimentados por *batch*. A perfusão requer a remoção e substituição contínua do fluido de cultura de células com meios frescos, mantendo um volume constante no biorreator. Complexidades adicionais podem advir de possíveis variações no tempo de execução total e na necessidade de manter um sistema estéril. Mas com uma abordagem de qualidade por design (QbD), um processo de produção de perfusão pode ser projetado e implementado de forma eficiente e económica.

A integração total contínua do bioprocessos, desde USP a DSP, é uma estratégia alternativa para o futuro da indústria biofarmacêutica. Em USP, esta tecnologia já está bem estabelecida. Os novos desenvolvimentos nos dispositivos de retenção resultaram

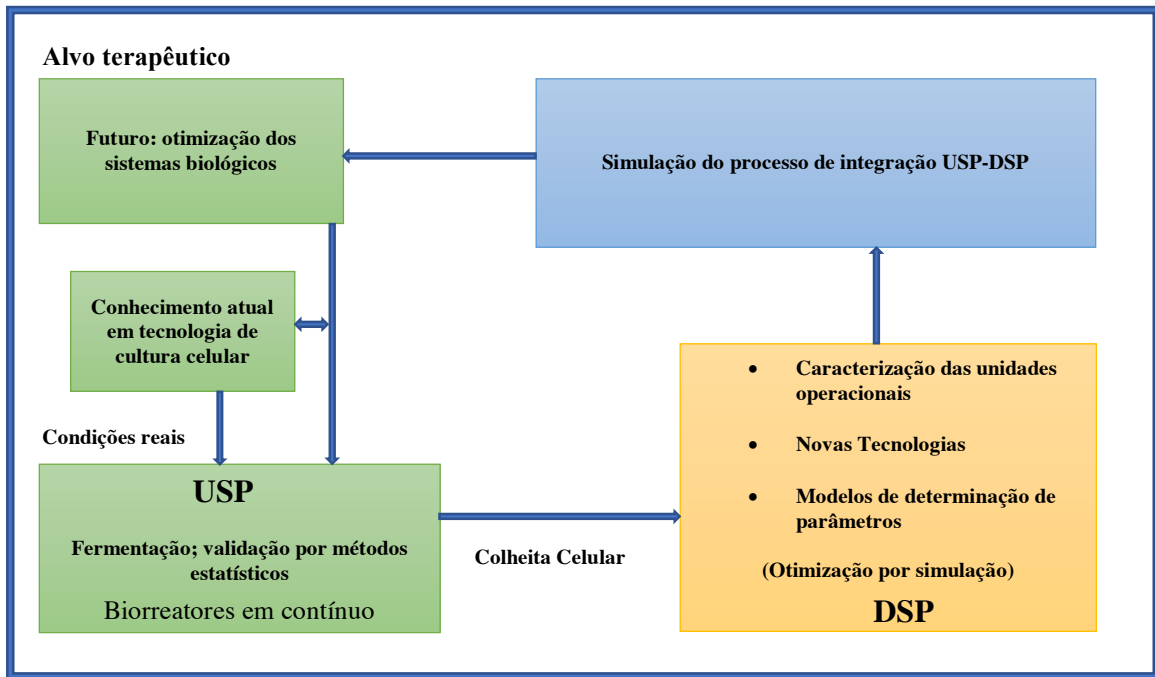
na alteração para a tecnologia de fluxo tangencial (ATF). Este dispositivo permite aos processos em modo de perfusão convencionais, produzirem células de grande densidade celular e concentrar o produto no biorreator.

Em DSP as novas tecnologias de cromatografia contínua de separação, precisam de ser significativamente mais eficientes e menos dispendiosas porque a sua implementação à escala industrial exigirá investimentos elevados. Em todo o caso um bioprocessamento totalmente em contínuo tem redução de custos entre 30-50%.

A integração do processo não passa só por melhorias em DSP e na otimização das etapas de forma isolada. Novas impurezas terão que ser consideradas, no bioprocessamento totalmente contínuo, uma vez que as atividades vão aumentar as concentrações de biofármaco, mas muitas vezes, este aumento é paralelamente acompanhado por novas impurezas geradas, estruturalmente mais similares à biomolécula alvo e, por isso, mais difíceis de separar. Os parâmetros de otimização do futuro têm que considerar estas impurezas e abordar a questão de diminuir quantidade produzida de produto, para alterar o perfil de impurezas.

A integração do processamento em USP e DSP em modo contínuo poderá ser uma ferramenta útil para a otimização total dos bioprocessos em perfusão (Figura 31).

Dados os benefícios já estabelecidos do bioprocessamento em contínuo modo perfusão é altamente provável que esta configuração venha a ser adotada na produção da maioria dos biofármacos na próxima década.



**Figura 31.** Possível abordagem para integração de bioprocessos em contínuo desde USP a DSP.

## Referências Bibliográficas

Adams, D., Korke, R., Hu, W. S. (2007) Application of stoichiometric and kinetic analyses to characterize cell growth and product formation *in: Animal Cell Biotechnology*. Human Press. pp. 269-284.

Baptista, R. P. Fluri, D. A. Zandstra, P. W. (2013). High density continuous of murine pluripotent cells in an acoustic perfused bioreactor at different oxygen concentrations *in: Biotechnology and Bioengineering*, 110 (2).

Behue, S. (2015). Manufacturing Process *In: Manufacturing of Pharmaceutical Proteins, From Technology to Economy*. 2ª edição. Weinheim. Wiley-VCH.

Bertolini M., *et al.*, (2016). The transgenic animal platform for biopharmaceutical product *in: Transgenic Research*, 25(3), pp. 329-343.

Bioplan Associates. (2012) Ninth Annual report and Survey of Biopharmaceutical Manufacturing Capacity and Production Study of Biotehrapeutic Developres and Contract Manufacturing. **Em linha** **Disponível em** < [http://www.bioplanassociates.com/images/9th Annual 2012 ReportTable of Contents .pdf](http://www.bioplanassociates.com/images/9th_Annual_2012_ReportTable_of_Contents.pdf)> **Consultado em** Dezembro de 2017].

Bloemkolk, J. W., *et al.* (1992). Effect of temperature on hybridoma cell cycle and mAb production. *Biotechnology. Bioengineering.*,40(3). 427-431.

Borys, M., *et al.*, (2015). Development of robust antibody purification by optimizing protein-A chromatography in combination with precipitation methodologies *in: Biotechnology*, 112(11), pp. 2292-304.

Brill-Almon, E., Galili, G., Dym, O., Boldin-Adamsky, S. A., Silman, I., Sussman, J. L., Futerman, A. H., Aviezer, D. (2007). Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *in: Plant Biotechnology Journal*. 5. pp. 579–590.

Broad, H., *et al.*, (2009). Improving bioreactor cultivation conditions for sensitive cell lines by dynamic membrane aeration *in: Cytotechnologist*, 59(1), pp.17-30.

Brower, M. (2015) Protein refinery Operations Lab: a sandbox for continuous protein production & advanced process control *in: Presented at integrated continuous Bioprocessing Conference*, Berkeley, California.

Butler, M., Menses-Acosta, A. (2012). Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production for mammalian cells *in: Appl. Microbiology Biotechnology*. (96). pp. 885-894.

Carton, J. M., Strohl. W. R. (2013) Protein therapeutics - Introduction to biopharmaceuticals. *In: introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development- Theory and Case Studies*. Amsterdam. Elsevier. Cap. 4. pp. 127-159.

Castilho, L. R., Medronho, R. A. (2008). Animal Cell technology. *In: Animal Cell Technology: From Biopharmaceutical to Gene Therapy*. Andover. Taylor and Francis. Cap. 11. pp. 163-175.

Chen, H., *et al.*, (2015). A novel steam explosion sterilization improving solid-state fermentation performance *in: Bioresource Technology*, 192, pp. 567-55.

Chen, Z., Zaro, J. L., Shen, W.C. (2013) Fusion protein linkers: property, design and functionality. *In: Advanced Drug Delivery reviews*. pp. 1357-1369.

Chico, E., Rodriguez, G., Figueredo, A. (2008). Bioreactors for animal cells. *In: Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. Andover. Taylor and Francis. Cap. 9. pp. 221-258.

Chu, L., Robinson, D. K. (2001) Industrial choices for protein production by large-scale cell cultures *in: Current Opinion Biotechnology*. (12). pp. 180-187.

Chuppa, S. *et al.* (1997) Fermentor temperature as tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells *in: Biotechnology Bioengineering*. 55 (2). pp. 328-338.

Clemens, C., *et al.*, (2009). Quality-by-design for biotechnology - related pharmaceuticals *in: Biotechnology Journal*, 4(5), pp. 600-9.

Clincke, M. F., *et al.* (2013). Very high density of Chinese hamster ovary cells in perfusion by Alternating tangential flow filtration in WAVE Bioreactor- part II *in: Biotechnology Program*. (29). pp. 768-777.

Clincke, M., *et al.*, (2013). Very high density of Chinese hamster ovary cells in perfusion by alternating tangential flow or tangential flow filtration in WAVE Bioreactor <sup>TM</sup>- part II: Application for antibody production and cryopreservation *in: Biotechnology Program.*, 29(3), pp. 768-77.

Clutterbuck, A. (2015). Evaluation of Single-Use Bioreactors for Continuous Processing *in: Innovative Technologies and Methods in Supporting Continuous Biomanufacturing*, Robinson College, Cambridge, UK.

Coffman, J., *et al.*, (2017). Shear contributions to cell culture performance and product recovery in ATF and TFF perfusion systems *in: Journal Biotechnology*, 246(3), pp. 52-60.

Cohen, H., *et al.*, (2018). Maintaining consistent quality and clinical performance of biopharmaceuticals *in: Expert opinion Biotechnology*, 1(11).

Condiffe, J., (2016). CRISPR- Modified cells has been used in a person for the first time *in: MIT Technology review*. **Em linha** ]Disponível em < <https://www.technologyreview.com/s/602880/crispr-modified-cells-have-been-used-in-a-person-for-the-first-time/> > . **Consultado em** Janeiro de 2018].

Cora, J., Karp, S. G., Vandenberghe, L. P., Parada, J. L., Pandey, A., Soccol, C. R. (2008). Batch fermentation model of propionic acid production by *Propiomibacterium*

*acidioripionici* in different carbon sources. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (151). pp. 333-341.

Cunningham, M. A. (2014) Webinar: *Integrated solution for high cell density cell culture from bench to pilot scale*.

Daramola, O., *et al.* (2014). A high-yielding CHO transient system: co-expression of genes encoding EBNA-1 and GS enhances transient protein expression in: *Biotechnology Program*, 30(1). pp. 132-141.

Demain, A., Vaishnav, P., (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms in: *Biotechnology Advances*, 27(3), pp. 297-306.

Deschênes, J. S., *et al.* (2006). Use of cell bleed in a high cell density perfusion culture and multivariable control of biomass and metabolite concentrations in: *Asia Pacific Journal Chemical Engineering*. (1). pp. 82-91.

Du, Z., *et al.* (2015) Use of small molecule cell cycle inhibitor to control cell growth and improve specific productivity and product quality of recombinant proteins in CHO cell cultures. *Biotechnology Bioengineering*. 112(1). pp. 141-155.

EFPIA, (2014). The Pharmaceutical Industry in Figures. **Em linha ]Disponível em:< [https://www.efpia.eu/uploads/Figures\\_2014\\_Final.pdf](https://www.efpia.eu/uploads/Figures_2014_Final.pdf) > Consultado em:** Dezembro de 2017)].

Eibl, R., *et al.* (2009). Bioreactors for Mammalian Cells: General Overview in: *Cell Tissue Reaction Engineering*. Springer. New York. pp. 55-82.

Eibl, R., *et al.* (2010). Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology in: *Applied Microbiology Biotechnology*. 86 (1). pp. 41-49.

Eibl, R., Loffelholz, C., (2014). Disposable bioreactor for inoculum production and protein expression in: *Molecular Biotechnology*, 1104, pp. 265-84.

Enfors, S. O., *et al.* (2001). Physiological responses to mixing in large scale bioreactors *in: Journal Biotechnology*, 85 (2), pp. 175-185.

FDA. (2015). “*What are Steam Cells? How are they regulated?*”. **Em linha**.  
**Disponível em:** < <https://www.fda.gov/ForIndustry/FDABasicsforIndustry/default.htm>  
>. **Consultado em:** Dezembro de 2017].

Fisher, P., *et al.*. (2016). Support Tools in Formulation Development for poorly soluble drugs *in: Pharmacy Journal*, 105(8), pp. 2260-9.

Fleming, A. (1929). “On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Reference to their use in Use in the Isolation of *B. influenza*.” *Br J Exp Pathiol* 10(3): pp. 226-36.

Fox, S. *et al.* (2003). Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modelling *in: Biotechnology Bioengineering*. 85 (2). pp. 177-184.

Godawat, R, et al. (2012) Periodic counter-current chromatography: design and operational considerations for integrated and continuous purification of proteins *in: Biotechnology Journal*, 7(12).

Godia, F., Cairo, J. (2006) Cell Metabolism *in: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*. Taylor & Francis. New York. pp. 81-112.

González, J., Woodley, J., (2010). Bioprocess: Modeling needs for process evaluation and sustainability assessment *in: Computers and Chemical Engineering*, 31(7), pp.1009-1017.

Gottschalk, U., Brorson, K., Skukla. A. A. (2012). The need for innovation in biomanufacturing *in: National Biotechnology*, 30 (6). pp. 489-492

Gottschalk, U., Brorson, K., Skukla. A. A. (2013). Innovation in biopharmaceutical: the only way forward *in: Pharmaceutical Bioprocess*, 1 (2). pp. 141-157.

Graumnan, K., Jungbauer, A., (2012). Biopharmceuticals – discovery, development and manufacturing *in: Biotechnology Journal*, 7(12), pp. 1422-3.

Griffiths, J. B. (1992). Animal cell culture process- batch or continuous?. *In: Journal of Biotechnology*. (22). pp. 21-30.

Hacker, D. L., De Jesus, M., Wurm, F. M. (2009). 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells: where do we go from here? *In: Biotechnology Advances*. 27 (6). pp. 1023-1027.

Hammond, S. *et al* (2011) Chinese Hamster genome database: an online resurse for the CHO community. **Em linha [Disponível em < <http://www.chogenome.org>> Consultado em Dezembro de 2017)].**

Health Network Communications (2016). *Biosimilar drug Development World Meeting*, Barcelona, 10-11 de Fevereiro. **Em linha [Disponível em < <http://www.terrapinn.com/conference/Biosimilar-drug-development-world-europe/>> Consultado em Dezembro de 2017].**

Himmelfarb, P. S., Martin. H. E. (1969) Spin filter culture: the propagation of mammalian cells in suspension *in: Supramolecular Science*. (164). pp. 555-557.

Jayapal, K., Goudar, C. (2014). Transcriptomics as a tool for assessing the scalability of mammalian cell perfusion systems *in: Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing*, eds. Zhou, W., Kantardjieff, A., Springer, Berlin. pp. 227-243.

Jayapal, K., Wlaschin, K., Hu, W. S., Yap, M. (2007). Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting. *In: Chemical Engineering and Processing*. (28). pp. 40-47.

Jesus, M., Wurm, F. M. (2011). Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cell in bioreatores. *In: European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*. (78). pp. 184-188.

Johnson, T. (2015). *Vision: integrating upstream and downstream in a fully continuous facility*. **Em linha ]Disponível em:** < <http://www.continuous-bioprocessing.com> > **Consultado em:** dezembro de 2017].

Jordan, M. *et al.* (2013). Cell culture medium improvement by rigorous shuffling of components using media blending *in: Cytotechnology*, 65. pp- 31-40.

Jozala, A., *et al.*, (2016). Biopharmaceuticals from microorganism: from production to purification *in: Journal Microbiology*, 47(1), pp.51-63.

Jungbauer, A. (2013). Continuous downstream processing of biopharmaceuticals *in: Trends Biotechnology*. 31 (8). pp. 479-492.

Jungbauer, A., (2013). Continuous downstream processing of biopharmaceuticals *in: Trends Biotechnology*, 31(8), pp. 479-92.

Karst, D. J. *et al.* (2016) Characterization and comparison of ATF and TFF in stirred bioreactors for continuous mammalian cell culture process *in Biochemistry English Journal*. 110.

Kelly, W. *et al.* (2014) Understanding an modelling alternating tangential flow filtration for perfusion cell culture *in: Biotechnology progress*. 30(6).

Kim, Y. G, (2012). Omics-bases CHO cell engineering: entrance into post-genomic era *in: Advances Genetics, Engineering Biotechnology*.

Klutz S., Magnus, J., Lobedann, M., Schawan, P., Maiser, B., Niklas, J., Temming M., Schembecker, G. (2015). Developing the biofacility of the future based on continuous processing and silgleuse technology *in: Jouranl Biotechnology*, 213. pp. 120-130.

Kohler, G., Milstein, C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256(5517): 495-97

Kompla, D. S., Ozturk, S. S. (2006) Optimization of high cell density perfusion bioreactors in: *Cell Culture Technology for pharmaceutical and Cell-based Therapies*, eds. Ozturk, S., Hu, W. S., Taylor & Francis, New York. pp. 155-224.

Konstantinov K.B., Cooney, C.I., (2014). Paper on Continuous Bioprocessing presented at International Symposium in: *Continuous Manufacturing of Pharmaceuticals*, Cambridge, MA, 20 de Maio.

Konstantinov, K. *et al.* (2006) The “Push-to-Low” Approach for Optimization of High-Density Perfusion Cultures of Animal Cells in: *Cell Culture Engineering*, Springer, Berlin. pp. 75-98.

Koo, Y., Sninophakin, P., (2015). Manufacturing of Pharmaceutical proteins from Technology Editorial: Bioprocess beyond the large-scale production in: *Biotechnology Journal*, 10(12), pp.1833-4.

Langer, E. S., Rader, R. A. (2014). Continuous bioprocessing and perfusion: wider adoption as bioprocessing matures in: *Bioprocess Journal*. 13 (1). pp. 43-49.

Larroche, C., *et al.*, (2008). Current development in Solid-state Fermentation. Springer Science+Business, New York, EUA.

Larroche, C., Sanromán, M. A., Du, G., Pandey, A. (2016). Design and Types of Bioprocess In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Bioprocess, Bioreactors and Controls*. Elsevier. Cap 2. pp. 58-69.

Le, H., *et al.* (2015) Cell line development for biomanufacturing processes in: *recent advances and an outlook*. 37(8).

Lewis, N. E., *et al.* (2013). Genomic landscapes of CHO lines as revealed by *Cricetulus griseus* draft genome in: *Natural Biotechnology*, 31 (8). pp. 759-765.

Li, M., Qiu, Y., (2013). A review on current downstream bioprocessing technology of vaccine products. 31(9), pp. 1264-7.

Lima, K.M., Santos, S.A., Silva C.L., Rodrigues, Jr. J. M. (2008). Gene therapy *in: Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. Andover: Taylor and Francis. Cap. 21. pp. 489-504.

Martins, C. S., Souto-Maior, A. (2003). Anthracycline production by *Streptomyces capoamus* in batch fermentation *in: Brazilian Archives of Biology and technology*. (46). pp. 483-488.

Miller, W. M., Blanch, H.W, Wilke, C. R. (2000) A kinetic analysis of Hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH. *Biotechnology. Bioengineering*, 67(6), 853-871.

Minihane, B. J., Brown, D. E., (1980). Fed-batch culture technology *in: Biotechnology Advances*. (4). pp. 207-218.

Morbidelli, M., *et al.*, (2016). Continuous counter-current chromatography for capture and polishing steps in biopharmaceutical production *in: Biotechnology Journal*, 11(9), pp. 1126-41.

Newman, J., Setford, S., (2016). Enzymatic biosensors *in: Molecular Biotechnology*, 32(3), pp.219-68.

Nicole, M., *et al.*, (2017). Programmable base editing of A-T to G-C in genomic DNA without DNA cleavage *in: Nature*, 551, pp.464-971.

Oien, N., *et al.*, (2017). High-Troughput Process Development for Biopharmaceuticals *in: Advances Biochemistry Engineering Biotechnology*.

Oosterhuis, N.M.G., Kossen, N. W. F. (1984). Dissolved oxygen concentration profiles in a production- scale bioreactor *in: Biotechnology, Bioengineering*, 26 (5). pp. 546-550.

Ozturk, S. S. (1996). Engineering challenges in high density cell culture. *Cytotechnology*. (22). pp. 3-16.

Ozturk, S.S. (2006). Cell culture technology: an overview *in: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*, eds. Ozturk, S., Hu, W. S., Taylor & Francis, New York. pp. 1-14.

Palomares, L., Lara, A. Ramirez, O. T. (2010) Bioreactor Scale-Down *in: Encyclopaedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, ed Flickinger, M. C., John Wiley & Sons, Inc., New York. pp. 1-13.

Petrides, D. *et al.* (2014). Biopharmaceutical process optimization with simulation and scheduling tools *in: Bioengineering*. Cap. 1. pp. 154-187.

Polizzi, K. M., Kontoravdi, C. (2015). Genetically-encoded biosensors for monitoring cellular stress in bioprocessing *in: Current Opinion Biotechnology*, (31). pp. 50-56.

Pollock, J., Ho, S. V., Farid, S. S. (2013). Fed-batch and perfusion culture processes: economic, environmental, and operational feasibility under uncertainty *in: Biotechnology Bioengineering*. (110). pp. 206-219.

Rapp, F., Hsu, T. C. (1965) Viruses and mammalian chromosomes IV. Replication of herpes simplex virus in diploid CHO *in Virology*, 25 (3). pp. 401-411.

Reuveny, S. *et al.* (1986) factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors *in: Journal Immunology Methods*. 86(1). pp. 53-55.

Riske, F. (2012). *Bioprocess International European Conference & Exhibition*. Dusseldorf.

Rouiller, Y. *et al.* (2013). A high-throughput media design approach for high performance mammalian fed-batch cultures. *mAbs*, 5 (3). pp. 501-511.

Rouiller, Y. *et al.* (2014). Modulation of mAb quality attributes using microliter scale microliter scale fed-batch cultures *in: Biotechnology Program*. 30 (3). pp. 571-583.

Schaub, J. *et al.* (2010). CHO gene expression profiling in biopharmaceutical process analysis and design. *Biotechnology, Bioengineering*, 105 (2). pp. 431-438.

Schmidt, S.R. (2009). Fusion proteins as biopharmaceuticals- applicatuions and challenges *in: Current Opinion in Drug discovery & Development*. (12) pp. 284-295.

Schmid, R. D., Schmid-Dannert, C., (2016). Early Developments *In: Biotechnology An Illustrated Primer*. Weinheim, Wiley-VCH. p. 2.

Seth, G. *et al.* (2013). Development for a new bioprocess scheme using frozen seed train intermediates to initiate CHO cell culture manufacturing campaigns *in Biotechnology, Bioengineering*, 110, 1376-1385.

Sieck, J. B., *et al.* (2014). Adaptation for survival: phenotype and transcriptome response of CHO cells to elevated stress induced by agitation and sparging *in: Journal Biotechnology*, 189. pp. 94-103.

Sieck, J. B., Schild, C., Von Hagen, J. (2018) Perfusion Formats and their Specific Medium Requirements *in: Continuous Biomanufacturing: Innovative Technologies and Methods*, ed. Subramanian, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Sinclair, A., Brown, A. (2013). *Continuous process economic evaluation*. **Em linha** **[Disponível em:** < <http://www.continuous-bioprocessing.com>> **Consultado em:** Dezembro de 2017).

Strachan M.W.J, Frier B.M (2013). *Insulin Therapy. A Pocket Guide*. New York Dordrecht: Springer London Heidelberg.

Strube, J. Grote, F., Helling, C., Ditz, R. (2012). Bio-process design and production technology for the future; and modelling and experimental model parameter determination with quality by design (QbD) for bioprocess *in: Biopharmaceutical Production Technology, vol 1+2* (ed. Subramanian, G.). John Wiley & Sons Ltd, Weinheim, Cap. 11-12.

Strube, J., Ditz, R., Frohlich, H. Koster, D., Grutzner, T., Koch, J., Schutte, R. (2014). Efficient engineering and production concepts for products in regulated environments- dream or nightmare? *In: Chemical Ing. Tech.* 86(5). pp. 1-9.

Strube, J., *et al.* (2007). Process development and optimization for biotechnology production- monoclonal antibodies *in: Bioseparation and Bioprocessing*, 1<sup>st</sup> edition, John Wiley & Sons Inc. pp. 65-99.

Sureshkumar, G. K., Murtharasan, R. (1991) The influence of temperature on a mouse-mouse hybridoma growth and monoclonal antibody production. *Biotechnology. Bioengineering.*, 37(3). pp. 292-295.

Suzuki, K., Matsubara, H. (2011). Recent advances in p53 research and cancer treatment. *In: Journal of Biomedicine and Biotechnology.* id: 978312.

Symphogen (2016). *Dechema: Single Cell Technology*. Frankfurt am Main. Germany, 2-3 de Junho. **Em linha ]Disponível em:** < <http://dechema.de> > **Consultado em:** dezembro 2017].

Thomaz-Soccol, V., Pandey, A., Resende, R. (2016). Biopharmaceutical Products: An Introduction *In: Current Decelopments in Biotechnology and Bioengineering- Human and Animal Health Applications*. Cap. 1. pp. 30-45.

Tjio, J. H., Puck, T. T. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture *in: Journal Experimental Medicines*, 108 (2). pp. 259-268.

Trummer, E. *et al.* (2006). Process parameter shifting: part 1. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors *in: Biotechnology Bioengineering.* 94 (6).

Trummer, E., *et al.* (2006) Process parameter shifting: part II. Biphasic cultivation – a tool for enhancing the volumetric productivity of batch process using Epo-Fc expressing CHO cells *in: Biotechnology Bioengineering.* 94 (6).

Valente, K., *et al.*, (2015). Expression of difficult- to-remove host cell protein impurities during extended CHO cell culture and their impact on continuous bioprocessing *in: Biotechnology Bioengineering*, 112(6), pp.1232-42.

Valenzuela, P., Medina, A. (1982). “Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast.” *Nature* 298(5872): pp. 347-50.

Vijayasankaran, N. *et al.* (2009) Animal Cell Culture Media *in: Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. John Wiley & Sons Inc, New York.

Walsh, G., Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins *in: natural Biotechnology*, 24 (10). pp. 1241-1252.

Warikoo, V. *et al.* (2012). Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins *in: Biotechnology and Bioengineering*. 109(12). pp. 3018-3029.

Warikoo, V., *et al.* (2012) *Integarted continuous production of recombinant therapeutic proteins*. *Biotechnology, Bioengineering*. 109(12).

Waubke, R., Hausen, H. Z., Hemle, W. (1968). Chromosomal and autoradiographic studies of cells infected with herpes simplex virus *in Journal Virology*, 2 (10). pp. 1047-1054.

Whitaker, A. (1980). Fed-batch culture *in: Process Biochemistry*. (15). pp. 10-12.

WHO. (1992). Guidelines for Assuring the Quality of Monoclonal Antibodies for Use in Humans. *In: World Health Organization Technical Report Series*. No.822. **Em linha** **]. Disponível em** :< [http://www.who.int/biologicals/areas/WHO\\_TRS\\_822\\_A3\\_mAbs.pdf](http://www.who.int/biologicals/areas/WHO_TRS_822_A3_mAbs.pdf)>Consultado em Dezembro de 2017].

Wood, C.R., *et al.* (1990) High level synthesis of immunoglobulins in Chinese hamster ovary cells *in: Journal Immunology*, 145 (9). pp. 3011-3016

Woodside, S. M., Bowen, B. D., Piret, J. M. (1998). Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors *in: Cytotechnology*. (28). pp. 163-175.

Woodside, S., Bowen, B., Piret, J. (1998). Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors *in: Cytotechnology*. (28). pp. 163-175.

Woodside, S.M., Bowen, B.D, Piret, J.M. (1998) Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors *in: Cytotechnology*. 28(1).

Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells *in: Natural Biotechnology*. (22). pp. 1393-1398.

Xenopoulous, A. (2015). A new, integrated, continuous purification process template for monoclonal antibodies: process modelling and cost of goods studies *in: Journal Biotechnology*. (213). pp. 42-43.

Xie, L., Zhou, W. (2006). Fed-batch cultivation of mammalian cells for production of recombinant proteins *in: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell- Based Therapies*, eds. Ozturk, S., Hu, W. S., Taylor & Francis, New York. pp. 349-386.

Yamane, T. (1978). Kinetic studies on fed-batch fermentation: a monograph. *Hakko Kogaku Kaishi*. (56). pp. 310-322.

Yamane, T., Shimizu. S. (1984). Fed-batch techniques in microbial processes *in: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. (30). pp. 147-202.

Yang, W. C. *et al.* (2016). Concentrated fed-batch cell culture increases manufacturing capacity without additional volumetric capacity *in: Journal Biotechnology*. (217). pp. 1-11.

Yang, W. C., *et al.* (2014). Perfusion seed cultures improve biopharmaceutical fed-batch production capacity and product quality *in: Biotechnology Progress*, 30 (3). pp. 616-625.

Yang, Y. (2016). Media development toward high density, high productivity and low perfusion rates for continuous manufacturing platforms. *Cell Culture World Congress*, Munich.

Zhou, J., Sun, X. Y. (1991). "Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles." *Virology* 185(1): pp. 251-57.

Zijlstra, G. *et al.* (2013). High cell density XD cultivation of CHO cells in the BIOSTAT cultiBag STR 50L single-use bioreactor with novel microsparger and single-use exhaust cooler-

