

V3 - Tripsinização *in situ* de microcarregadores objetivando a passagem de células Vero e aumento do volume de cultivo (*scale-up*)

Luiz Gustavo Almeida Mendes¹; Diogo Araújo de Mattos^{1*}; José Henrique Rezende Linhares¹; Marlon Vicente da Silva¹; Marta Cristina de Oliveira Souza¹; Sheila Maria Barbosa de Lima¹; Luciane Pinto Gaspar¹; Elena Caride¹; Marcos da Silva Freire¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

Avanços na tecnologia de cultivos de células animais permitiram novas aplicações para produção de vacinas e biofármacos. As células animais empregadas em tais processos podem ser divididas pelo requerimento de um substrato para sua ancoragem ou pela capacidade de crescer em suspensão (independentes de ancoragem). A linhagem celular Vero é uma linhagem contínua, dependente de ancoragem, extensamente utilizada para produção de vacinas virais, com aceitação das Agências Regulatórias (Nacional e Internacional). A utilização de microcarregadores permitiu a realização de cultivos em solução de células dependentes de ancoragem, em frascos tipo *spinner* ou biorreatores. As células são usualmente inoculadas nos microcarregadores a partir de cultivos de frascos estacionários, e sua passagem representa uma importante limitação ao aumento de escala de cultivo celular e produção de vacinas de interesse.

Objetivo:

No trabalho atual, objetivamos estabelecer uma metodologia robusta de passagem das células Vero de microcarregadores a outros microcarregadores visando aumento de escala, mais precisamente, da escala laboratorial para a escala piloto de 50 Litros ou mais.

Metodologia:

Foram realizados experimentos de tripsinização *in situ* das células Vero em microcarregadores, que consistiu na incubação de soluções de tripsina em microcarregadores colonizados com células Vero. Foram também realizadas culturas utilizando-se frascos do tipo *spinner*. Células Vero oriundas de cultivos estacionários foram inoculadas em *spinners* contendo microcarregadores e levadas a cultivo por 72 horas até que chegassem à confluência. Antes

da tripsinização, propriamente dita, a agitação dos *spinners* foi desligada e os microcarregadores sedimentaram. O meio de cultivo foi retirado e foram realizadas duas lavagens com solução salina tampão fosfato antes da incubação com a tripsina. Inicialmente, foram testadas diversas condições das soluções de tripsina até que a melhor condição foi identificada. Replicatas biológicas foram realizadas com as células Vero em outra passagem e em dias diferentes.

Resultados:

A passagem de células Vero foi bem sucedida a partir da tripsinização *in situ* de esferas de microcarregadores colonizadas. Foi possível realizar o aumento de quatro vezes do volume de cultivo dos *spinners*. Após 72 horas, os *spinners* com aproximadamente 106 células/mL foram tripsinizados e novos *spinners* inoculados, a densidade de células viáveis alcançou 106 células/mL depois de 4 dias de cultivo. Adicionalmente, resultados preliminares da passagem para inoculação de biorreator com 2,5 L de cultivo apontam para a viabilidade de produzir inóculo para biorreator a partir de cultivos em *spinners*.

Conclusão:

A metodologia adotada neste trabalho é capaz de amplificar o volume de trabalho de 4 a 5 vezes, diminuindo, conseqüentemente, a quantidade inicial de célula, possibilitando escalonar para 50 Litros ou mais.

Palavras-Chave: vacina; cultivo de células e *scale up*