

B7 Avaliação de alternativas de meio de cultivo para a produção da eritropoetina humana recombinante expressa em células CHO em suspensão

Alexandre Borges Murad¹, Esther Vinhais Gutierrez¹, Tiago Pereira dos Santos¹, Álvaro Paiva Braga de Sousa¹, Rodrigo Coelho Ventura Pinto¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: Com o avanço das técnicas de biologia molecular, os cultivos celulares passaram a ser uma importante plataforma para a produção dos biofármacos, que são proteínas recombinantes com fins terapêuticos, obtidos através de processo biotecnológicos. A manutenção dos cultivos sob condições ideais são de grande importância para a obtenção do produto conforme especificações de qualidade e requisitos de segurança. Desta forma, os meios de cultivo garantem o ambiente e o fornecimento de nutrientes às células, possibilitando o funcionamento normal do metabolismo, do crescimento celular e, conseqüentemente, a correta síntese do produto de interesse. Neste trabalho serão avaliados meios comerciais e mais modernos em alternativa ao utilizado atualmente no processo de obtenção da EPOhr, observando-se a capacidade de promoção de crescimento, produtividade e qualidade da molécula.

Objetivo: Comparar diferentes alternativas de meios de cultivo comerciais livres de soro fetal bovino e componentes animais com o meio de cultivo atualmente utilizado para o cultivo em suspensão de células CHO secretoras de EPO.

Metodologia: De um banco de células de trabalho, células CHO secretoras de EPOhr foram cultivadas em frascos estáticos do tipo T25 cm² em meio SFM4CHO–Utility™ (Thermo Hyclone GE), na concentração inicial de 2,0x10⁵ células viáveis/mL, em seguida em frascos T75 cm² de meio SFM4CHO™ ou HyCell™ na concentração de 3,0x10⁵ células viáveis/mL e em garrafas rotatórias na concentração de 2,0x10⁵ células viáveis/mL em cinco passagens. A cinética (candidato e controle) foi iniciada a partir da última etapa do sub-cultivo, durando 9 dias. Diariamente, foram retiradas alíquotas para quantificação celular em hemacitômetro corando com Azul de Trypan (Células mortas) e cristal violeta (Células totais) e no equipamento NucleoCounter®.

Resultados: Os meios testados foram introduzidos através de um protocolo de adaptação direta por passagens sucessivas, sendo a substituição realizada na 2ª passagem. A adaptação ao meio SFM4CHO™ apresentou concentração de células viáveis relativamente superior ao controle, com viabilidades acima de 80%. Nesta etapa, o meio HyCell™ obteve concentração celular inferior ao controle e baixa viabilidade (<80%) nas últimas passagens. O meio

SFM4CHO™ foi submetido a uma cinética de crescimento, obtendo concentração máxima $2,42 \times 10^6 \pm 0,06$ células viáveis/mL (6º dia), em comparação com o controle, $1,79 \times 10^6 \pm 0,05$ células viáveis/mL (7º dia). A viabilidade inicial do cultivo no meio testado se manteve na faixa de 80-90%, diferente do controle, que sustentou o cultivo com maior viabilidade, na faixa de 90-100%.

Conclusão: O meio de cultivo SFM4CHO™ apresentou boa capacidade de sustentar a proliferação, apesar do protocolo de adaptação direta, e alcançou concentração máxima de células viáveis superior ao controle, indicando possuir melhor desempenho, pois manteve a viabilidade em níveis aceitáveis. Os resultados sugerem que, para o meio HyCell™, o protocolo de adaptação precisa ser alterado, utilizando-se estratégia de substituição.

Palavras-Chave: Alfaepoetina, Biofármaco, CHO, EPOhr, Roller