

Mestrado Integrado em Engenharia Química

**Avaliação da influência de células humanas e não-humanas
no desenvolvimento de linhas celulares estáveis para
produção de Tribody™5**

Tese de Mestrado

de

Daniela Costa Pina Mosa

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Biotechnol



Orientador na FEUP: Prof. Filipe José Menezes Mergulhão

Orientador na Biotechnol: Dra. Ana Rita Ricardo



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

FEUP

Departamento de Engenharia Química

Setembro de 2015

Agradecimentos

Durante a realização desta tese, pude contar com o apoio e carinho de diversas pessoas às quais gostaria de agradecer e mostrar a minha profunda gratidão.

À Dra. Ana Rita Ricardo, um enorme agradecimento pela oportunidade que me deu de realizar esta tese sob a sua orientação, bem como a confiança que em mim depositou e sentido de responsabilidade que me inculuiu ao longo do projeto. Obrigada pelo constante apoio, amizade e boa disposição prestados.

Ao Prof. Filipe Mergulhão, por ter aceite ser orientador interno e pela sua simpatia e disponibilidade durante a realização desta tese de Mestrado.

À Tatiana e Kathy pela formação em cultura de células e disponibilidade constante. Graças a elas adquiri os conhecimentos práticos e teóricos necessários para trabalhar de forma independente no laboratório de cultura de células animais.

À Joana Almeida, Rita Fidalgo e Inês Marçal por todo o apoio, disponibilidade e orientação durante a minha passagem pelos restantes departamentos.

A todos os restantes membros da Biotecnol, pela simpatia, bom-humor e companheirismo durante a minha estadia na empresa.

A todos os meus amigos pelo carinho e profunda amizade.

Ao Pedro um agradecimento especial pelo apoio, força e carinho transmitidos diariamente, e pelas suas palavras doces e encorajadoras nos momentos de maior aflição.

Um agradecimento também especial aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio incondicional, presença constante, incentivo, e paciência demonstrados. Obrigada por tudo o que vêm fazendo por mim ao longo destes anos. A vocês devo TUDO.

*“The greatest mistake you can make in life
is continually fearing that you will make one”*

Elbert Hubbard

Resumo

Nos últimos anos, o uso de anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes no desenvolvimento de biofármacos tem-se mostrado altamente eficaz para o tratamento de doenças oncológicas. Com o avanço biotecnológico, surgiram os anticorpos multiespecíficos que permitem ligar a diferentes alvos simultaneamente como é o caso do Tribody™5, o qual conjuga diferentes partes de anticorpos numa estrutura multifuncional. A sua produção para ensaios clínicos deve ser realizada com linhas celulares animais estáveis uma vez que são necessárias modificações pós-tradução adequadas para garantir a estabilidade do produto e a reprodutibilidade do processo para produção de proteínas a qualidade/quantidade adequadas. O material genético recombinante é assim incorporado no genoma da célula hospedeira, permitindo a sua expressão mesmo após replicação celular, através do uso de dois plasmídeos distintos em que cada um deles codifica uma porção distinta da molécula e possui um gene para selecção das células que integraram corretamente o material na célula. A produção de Tribody™5 pode contudo ser por vezes desafiante devido à possibilidade de agregação da proteína. Este fenómeno pode ser minimizado com a utilização do correto processo de produção ou com a utilização de diferentes linhas celulares. Adicionalmente, a estequiometria dos vetores de expressão é também um importante factor, sendo que quando não é corretamente estabelecida pode resultar na formação de proteínas inconvenientemente formadas.

No presente trabalho, foram testadas duas linhas celulares animais distintas, FreeStyle™HEK293 e CHO-S para a criação de uma linha estável produtora de Tribody™5. Grande parte dos anticorpos são produzidos a partir de células CHO-S. No entanto, uma vez que não se tratam de células humanas e o seu perfil de glicosilação é diferente, foram também usadas células HEK293F. De forma a controlar os agregados de Tribody™5 formados e dímeros/multímeros de cadeia leve, foi estudado o impacto da variação da estequiometria dos vetores de expressão usados. Foi também estudada a actividade do produto produzido. Em paralelo, foram desenvolvidos dois métodos analíticos, ELISA e cromatografia de afinidade por proteína L, que permitem a quantificação da quantidade de Tribody™5 presente e respetiva pureza.

Após purificação do material produzido estavelmente por CHO-S obteve-se uma concentração de 2,7 mg/l em Tribody™5 a um rácio de 10L (cadeia leve):90H (cadeia pesada) com um rendimento de 21%.

Palavras-Chave: modificações pós-tradução, Tribody™5, transfecção estável, estequiometria de vetores, linha celular.

Abstract

In the past few years the use of monoclonal antibodies and recombinant proteins in the development of biopharmaceuticals has proved to be highly effective in the treatment of oncological diseases. With biotechnology advances, multispecific antibodies that allows connection to three distinct epitopes, have emerged, such as the Tribody™5 which combines different parts of antibodies in a multifunctional structure. Its production for clinical trials should be made by stable animal cell lines since it requires proper post-translational modifications in order to ensure product stability and the reproducibility of the process for producing proteins with suitable quality/quantity. The recombinant genetic material is thus incorporated into the host cell genome and expressed even after cell replication, by using two distinct plasmids in which each encodes a different portion of the molecule and has a gene for selecting cells that correctly integrated the genetic material. Still, production of Tribody™5 can be challenging due to the possibility of protein aggregation. This phenomenon can however be minimized by using the proper production process or by using different cell lines. Additionally, the stoichiometry of expression vectors is an important factor because when it is not balanced properly it can result in formation of non-functional proteins.

In the present study, two different animal cell lines were tested – FreeStyle™ HEK293 and CHO-S – to create a stable cell line producing Tribody™5. Most of the antibodies are produced from CHO-S cells. However, since these are not human cells and their glycosylation profile is different, HEK293F cells were also used. In order to control the formation of Tribody™5 aggregates and the light chain dimers/multimers, the impact of varying the stoichiometry of the expression vectors was studied. The activity of the product was also analyzed. Alongside, two analytical methods have been developed, ELISA, and protein L affinity chromatography, enabling the quantification of the amount of Tribody™5 present and its respective purity.

After purification of the material produced stably by CHO-S a concentration of 2,7 mg/l of Tribody™5 was attained at a ratio of 10L(light chain):90H(heavy chain) with a yield of 21%.

Keywords: post-translational modifications, Tribody™5, stable transfection, stoichiometry expression vectors, cell line.

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Índice

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	v
Notação e Glossário	vi
1 Introdução	1
1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2 Apresentação da Empresa	2
1.3 Contributos do Trabalho	2
1.4 Organização da Tese	3
2 Contexto e Estado da Arte	4
2.1 Biofármacos	4
2.1.1 Tecnologia de hibridoma	4
2.1.2 Tecnologia de DNA recombinante	5
2.2 Anticorpos	6
2.3 Tribody™	7
2.4 Linhas celulares para produção de proteínas recombinantes	9
2.5 Transfecção	11
2.5.1 Vetores de expressão	11
2.5.2 Transfecção transiente vs. Transfecção estável	13
2.5.3 Métodos de entrega de DNA	14
2.5.3.1 Vetores virais	14
2.5.3.2 Vetores não virais	15
2.5.3.3 Transfecção com lipossomas	15
2.6 Selecção de células animais	16
3 Descrição Técnica e Discussão dos Resultados	19
3.1 Material biológico	19
3.1.1 Linhas celulares	19
3.2 Procedimentos	19
3.2.1 Descongelamento das células	19
3.2.2 Cultura e manutenção das linhas celulares	20
3.2.3 Estudo de crescimento	20
3.2.4 Estudos de curva de morte	20
3.2.5 Transfecção de células com FreeStyle™ Max Reagent	21

3.2.6	Pressão seletiva	21
3.2.7	Congelamento de células.....	22
3.3	Técnicas analíticas	23
3.3.1	Contagem de células pelo método de exclusão do azul de tripano	23
3.3.2	ELISA	23
3.3.3	Cromatografia de afinidade por proteína L	24
3.3.4	Concentração das amostras	24
3.3.5	Cromatografia catiónica analítica	25
3.3.6	SDS-PAGE.....	25
3.3.7	Ensaio citotóxico.....	25
3.4	Resultados e Discussão	27
3.4.1	Estudos de curva de crescimento	27
3.4.2	Determinação da concentração ótima de antibiótico a usar na fase de expressão	28
3.4.2.1	Zeocina.....	29
3.4.2.2	Neomicina	30
3.4.3	Transfecção e selecção das <i>pools</i> de células	31
3.4.4	Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação e caracterização do Tribody™5 produzido	34
3.4.4.1	ELISA	34
3.4.4.2	Cromatografia de afinidade por proteína L	38
3.4.5	Produção do Tribody™5 a partir das <i>pools</i> geradas	41
3.4.5.1	Análise através dos métodos analíticos desenvolvidos	41
3.4.5.1	Purificação do Tribody™5.....	42
3.4.6	Análise do Tribody™5 purificado por SDS-PAGE.....	45
3.4.7	Avaliação da eficiência do Tribody™5 produzido	46
4	Conclusões.....	48
4.1	Objetivos Realizados	49
4.2	Limitações e Trabalho Futuro.....	50
4.3	Apreciação Final.....	50
	Referências.....	51
	Anexo I – Vetores de expressão utilizados.....	61
	Anexo II – Determinação da concentração de antibiótico óptima a usar na fase de selecção.....	62
	Anexo III – Desenvolvimento do método de cromatografia de afinidade por proteína L para quantificação do Tribody™5 produzido	63

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Representação esquemática de um anticorpo murino, quimérico, humanizado e humano. Quanto maior o grau de humanização dos anticorpos menor será a resposta imunológica que os mesmos desencadeiam no organismo humano. Adaptado de (Imai e Takaoka 2006).....	5
Figura 2.2 – Estrutura de um anticorpo. Adaptado de (GE Healthcare 2015).	6
Figura 2.3 – Fragmentos de anticorpo originados por acção da digestão enzimática (GE Healthcare 2015).	7
Figura 2.4 – Ilustração da estrutura do Tribody TM . Adaptado de (Biotecnol 2014).....	8
Figura 2.5 – As células eucarióticas têm capacidade de modificar as proteínas por N-glicosilação, no entanto, as estruturas que originam são distintas. A figura representa a diferença entre a estrutura de glicanos provenientes de células não humanas e humanas. Adaptado de (Ghaderi <i>et al.</i> 2012)..	11
Figura 2.6 – Visão geral das principais etapas envolvidas na interacção de lipoplexos com células. Ligação e captação celular dos complexos, libertação do DNA no citoplasma, migração do DNA até ao núcleo (Simões <i>et al.</i> 2005).....	16
Figura 3.1 – Curvas de crescimento para as duas linhas celulares estudadas, FreeStyle TM HEK293 e CHO-S, em diferentes suportes.....	27
Figura 3.2 – Suportes utilizados durante o estudo de crescimento celular. a) <i>Shake flask</i> com um volume total de 125 ml e 30 ml de volume útil. b) <i>Spin tube</i> com um volume total de 50 ml e 5 ml de volume útil.....	28
Figura 3.3 – Representação gráfica da taxa específica de morte em função da concentração de antibiótico utilizada ($\mu\text{g/ml}$) nas linhas celulares FreeStyle TM HEK293 e CHO-S.....	29
Figura 3.4 – Representação gráfica da relação entre a concentração de antibiótico utilizada ($\mu\text{g/ml}$) com a taxa de inibição de crescimento em percentagem para as células FreeStyle TM HEK293 e CHO-S.....	31
Figura 3.5 – representação da morte celular ao longo do tempo e influência das concentrações de zeocina e neomicina utilizadas na selecção das células CHO-S corretamente transfectadas. A curva a verde representa o controlo negativo (células não-transfectadas).	32
Figura 3.6 – Representação esquemática de um ELISA indireto. 1) o antigénio é adicionado ao poço. 2) um tampão de bloqueio preenche os espaços que não foram cobertos por antigénios. 3) o anticorpo primário (Tribody TM 5) presente no meio de cultura liga-se ao antigénio. 4) um anticorpo secundário conjugado com a enzima fosfatase alcalina (6) reconhece e liga-se ao anticorpo primário. 5) o substrato é adicionado promovendo a formação de cor e de um sinal mensurável....	35

Figura 3.7 – Concentrações obtidas pelo ensaio de ELISA, com diferentes amostras e anticorpos de detecção. Fed-batch A (FB A): concentração de Tribody™5 presente no fed-batch A; Tribody™5: concentração de Tribody™5 purificado do FB A; Cadeia leve: concentração de cadeia leve purificada de FB A; Tribody™5+Cadeia leve: concentração de uma mistura de Tribody™5 e cadeia leve (50:50), ambas purificadas de FB A. A cinzento apresentam-se os valores de concentração teórica de Tribody™5 estimadas por cromatografia.	35
Figura 3.8 – Representação gráfica da concentração de Tribody™5 atendendo ao rácio de cadeia leve e pesada transfectada. (1) concentração presente nas culturas transientes de HEK293F e CHO-S; (2) concentração presente nas culturas estáveis de CHO-S.	37
Figura 3.9 – Cromatogramas obtidos após análise da combinação do tampão de equilíbrio 0,1M de fosfato com 0,15M NaCl a pH7 com os respectivos tampões de eluição numa coluna com proteína L. a) 0,1% HCl com 0,15M NaCl; b) 0,1M fosfato com 0,15M NaCl a pH2; c) 0,1M glicina a pH2; d) 0,1M ácido acético.	39
Figura 3.10 – Cromatograma resultante da combinação do tampão de equilíbrio 0,1M fosfato com 0,15M NaCl a pH7 e do tampão de eluição 0,1M fosfato com 0,15M NaCl a pH3,5.	39
Figura 3.11 – Cromatogramas obtidos pela combinação de diferentes tampões de equilíbrio com o tampão de eluição 0,1M fosfato com 0,15M NaCl a pH2. d) 0,05M fosfato com 0,15M NaCl a pH8; e) 0,02M fosfato com 0,15M NaCl a pH 7; f) Tris com 0,05M NaCl a pH8.	40
Figura 3.12 – Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). 1) marcador molecular (kDa); 2) amostra de Tribody™5 humanizado e caracterizado; 3) amostra resultante da purificação do fed-batch 4; 4) amostra purificada da cultura transiente de HEK293F; 5) amostra purificada da cultura transiente de CHO-S.	45
Figura 3.13 – Curva dose-resposta obtida na utilização de Tribody™5 sobre células-alvo de mesotelioma. Efeito do aumento da concentração do anticorpo sobre a citotoxicidade desse às células-alvo.	46
Figura I.1 – Representação do plasmídeo pBio1-Neo.	61
Figura I.2 – Representação do plasmídeo pBio2-Zeo.	61
Figura III.1 – Curva de calibração obtida pela representação da área dos picos em função da concentração de amostra de Tribody™5 caracterizada utilizada.	63

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – % de Tribody™5 obtido para as várias amostras após análise pelos métodos analíticos desenvolvidos.	42
Tabela 3.2 – Resultados obtidos pela análise das frações recolhidas dos fed-batch e transientes por SEC, após purificação por proteína L preparativa.	43
Tabela 3.3 – Resultados obtidos pela análise das frações recolhidas dos fed-batch e transientes por SEC, após purificação por proteína L preparativa e cromatografia catiónica analítica.	44
Tabela II.1 – Valores obtidos para a taxa específica de morte em h ⁻¹ atendendo à concentração de zeocina em µg/ml administrada às células HEK293F.	62
Tabela II.2 – Valores obtidos para a taxa específica de morte em h ⁻¹ atendendo à concentração de zeocina em µg/ml administrada às células CHO-S.	62
Tabela II.3 – Valores obtidos para a taxa de inibição de crescimento (%) em função da concentração de neomicina administrada às células HEK293F.	62
Tabela II.4 – Valores obtidos para a taxa de inibição de crescimento (%) em função da concentração de neomicina administrada às células CHO-S.	62
Tabela III.1 – Média e desvio padrão das áreas dos picos obtidos por cromatografia de afinidade por proteína L em função da concentração de Tribody™ caracterizado analisado.	63

Notação e Glossário

k_d	Taxa específica de morte	h^{-1}
C_t	Concentração de células viáveis no tempo t	Nº células viáveis/ml
C_0	Concentração de células viáveis no tempo 0	Nº células viáveis/ml
t	Tempo	h
μ_0	Taxa específica de crescimento no tempo 0	h^{-1}
μ_t	Taxa específica de crescimento no tempo t	h^{-1}

Lista de Siglas

BHK	<i>Baby Hamster Kidney cells</i>
CDR	<i>Complementarity Determining Region</i> : regiões determinantes de complementaridade
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i> : dimetil sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> : Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i> : fragmento de ligação de antigénio
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> : soro fetal bovino
Fc	Fragmento cristalizável
HAMA	<i>Human Anti-Mouse Antibody</i>
HEK	<i>Human Embryo Kidney cells</i>
HT1080	<i>Human Sarcoma cells</i>
HPLC	<i>High Liquid Performance Chromatography</i> : cromatografia líquida de alta eficiência
IgG	Imunoglobulina G
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
mAbs	<i>Monoclonal Antibodies</i> : anticorpos monoclonais
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> : Ácido ribonucleico mensageiro
N20	<i>Mieloma cells</i>

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> : tampão fosfato salino
pNPP	<i>p-Nitrophenyl phosphate</i> : p-nitrofenil fosfato
scFv	<i>Single Chain Variable Fragment</i>
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> : Cromatografia de exclusão molecular
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TTBS	<i>Tris-Buffered Saline with Tween</i>

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

Diversos biofármacos são produtos terapêuticos produzidos através da biotecnologia, criados pela manipulação genética de células vivas de determinados organismos (Zhang 2010). Alguns dos produtos biofarmacêuticos mais desenvolvidos actualmente como as proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais, fatores de crescimento e vacinas, são amplamente usados no tratamento de doenças auto-imunes, cardiovasculares, inflamatórias e cancro (Chadd e Chamow 2001; Jayapal *et al.* 2007).

Variados sistemas biológicos têm sido investigados e qualificados para produção de proteínas recombinantes e diversos fatores como o aumento da escala, produção anual total, velocidade de produção, modificações pós-tradução e questões regulatórias têm influenciado a escolha do sistema mais adequado para produção dessas proteínas (Dyck *et al.* 2003). Até há pouco tempo, os sistemas bacterianos eram os mais atrativos graças à sua alta produtividade, baixo custo e fácil reprodutibilidade representando cerca de 30% dos produtos biofarmacêuticos disponíveis no mercado com moléculas como, a insulina humana e hormonas de crescimento (Overton 2014). No entanto, existem determinadas biomoléculas demasiado complexas para serem produzidas por simples procariontes pois na grande maioria dos casos necessitam de modificações pós-tradução apropriadas, realizadas apenas pelas células animais (Wurm 2004). Na expressão proteica através de células animais, os clones estáveis com elevadas produtividades são na maioria dos casos o ponto de partida para desenvolver um biofármaco adequado para administração em humanos.

A produção de proteínas recombinantes em células de mamífero consiste num longo processo que envolve a adaptação às diferentes condições de cultura, a transfecção do gene de interesse, a seleção e identificação dos clones mais produtivos, a cultura em biorreator e o *scale-up* (Costa *et al.* 2010). Contudo, os avanços no desenvolvimento de meios de cultura e estratégias de alimentação e seleção permitiram obter produções específicas de glicoproteínas entre 1 a 5 g/l (Agrawal e Bal 2012; Hacker *et al.* 2009). Trata-se de um aumento significativo quando comparado com os valores típicos obtidos na década de 80 através de um simples batch de 7 dias, entre 50 a 100 mg/l (Hacker *et al.* 2009). Hoje, cerca de 60 a 70% de todas as proteínas recombinantes são produzidas em células animais (Wurm 2004). A recente evolução na engenharia dos anticorpos permitiu o desenvolvimento de anticorpos multiespecíficos, como é o caso do Tribody™5, que permitem ligar

a diferentes epítomos simultaneamente. Dependendo da concepção, os anticorpos multiespecíficos podem ser monovalentes ou bivalentes para cada um dos alvos, se forem manipulados para reconhecer os seus antígenos específicos com um ou dois braços de ligação separados (Castoldi 2014).

Este trabalho tem como objetivo a avaliação da utilização de células humanas e não-humanas no desenvolvimento de uma linha estável para produção de anticorpos multiespecíficos.

1.2 Apresentação da Empresa

A Biotecnol é uma empresa de biotecnologia farmacêutica privada que desenvolve produtos na área da imunooncologia. Os seus produtos baseiam-se num sistema patenteado, o Tribody™, que permite o recrutamento de células imunológicas do paciente para o tratamento de doenças oncológicas. Actualmente a Biotecnol tem vários anticorpos para fins terapêuticos em desenvolvimento e foca-se essencialmente nas áreas de biologia molecular e desenvolvimento de linhas celulares, desenvolvimento de processos de cultura, desenvolvimento de processos de recuperação e purificação e desenvolvimento analítico e de qualidade.

1.3 Contributos do Trabalho

O trabalho realizado no âmbito da presente dissertação permite avaliar o impacto da utilização de uma linha celular humana (FreeStyle™HEK293) e de uma linha celular não humana (CHO-S) para a criação de linhas estáveis para produção de Tribody™5 em quantidades e qualidades aceitáveis. Para controlar a formação de agregados dois parâmetros foram avaliados, a linha celular utilizada, CHO-S vs. FreeStyle™HEK293, e a estequiometria dos vetores de expressão necessária. Este projeto permitiu o desenvolvimento e aquisição de conhecimentos práticos e teóricos a nível da cultura de células animais em laboratório, métodos analíticos e cromatográficos que possibilitam a quantificação e avaliação da pureza e qualidade do produto e ainda a análise da actividade do produto sobre uma determinada linha tumoral. O desenvolvimento deste trabalho, permitiu assim compreender qual o melhor rácio a usar na transfecção celular de forma a obter-se uma quantidade razoável de produto aliado à qualidade, bem como detectar a necessidade de optimização de um protocolo de transfecção e selecção de clones para a criação de uma linha celular estável de HEK293F.

1.4 Organização da Tese

Esta dissertação é constituída pelos seguintes capítulos:

- Contexto e Estado da Arte;
- Descrição Técnica e Discussão de Resultados;
- Conclusões.

A secção de Contexto e Estado da Arte aborda diferentes conceitos necessários à compreensão deste trabalho. Esta inicia-se com uma breve introdução aos biofármacos e técnicas envolvidas na produção dos mesmos. Em seguida, é descrita a estrutura das imunoglobulinas e do Tribody™ em particular incluindo os diferentes métodos analíticos usualmente utilizados para purificação deste tipo de anticorpos. Posteriormente, são enumeradas e caracterizadas as diferentes linhas celulares utilizadas na indústria biofarmacêutica e finalmente, é elaborada uma breve descrição do método de transfecção celular, incluindo os componentes celulares envolvidos, tal como os vetores de expressão e respetiva estequiometria, e ainda o processo de selecção das células corretamente transfectadas para produção da glicoproteína de interesse.

No capítulo da descrição técnica e discussão dos resultados, são apresentados e descritos de forma detalhada todos os procedimentos laboratoriais realizados, nomeadamente, o congelamento/descongelamento de células e subsequente passagem, o processo de transfecção celular e pressão seletiva e ainda os métodos analíticos realizados. Após a descrição técnica apresentam-se os resultados obtidos e respetiva discussão dos estudos de crescimento e morte, dos métodos analíticos desenvolvidos, nomeadamente ELISA e cromatografia de afinidade por proteína L, e ainda a purificação do produto com vista a obter material para realização do SDS-PAGE e ensaio citotóxico.

Por último, no capítulo de conclusões, são descritas as principais conclusões atingidas após análise dos resultados obtidos bem como a realização de uma apreciação global do grau de execução dos objetivos traçados no início deste trabalho. São também reportadas as limitações encontradas ao longo do projeto e assinaladas propostas de trabalhos a realizar no futuro.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 Biofármacos

Os biofármacos, tratam-se de produtos terapêuticos que podem ser criados através da manipulação genética de células ou organismos vivos, permitindo o crescimento e desenvolvimento da indústria biofarmacêutica (Lotfipour e Hallaj-Nezhadi 2012; Geigert 2013). O termo biofármaco foi usado pela primeira vez na década de 1980, para descrever uma classe de proteínas terapêuticas produzidas mundialmente por técnicas biotecnológicas modernas, especificamente através de tecnologia de DNA recombinante ou por tecnologia de hibridoma (Walsh 2002; Walsh 2003).

Apesar de actualmente as proteínas terapêuticas exibirem grande potencial, no passado a sua aplicação era praticamente impossível devido às pequenas quantidades em que eram naturalmente produzidas. As tecnologias de DNA recombinante e hibridoma permitiram superar essas dificuldades marcando o início de uma nova era da ciência farmacêutica possibilitando o início da produção em massa de uma grande variedade de proteínas naturais e modificadas pela primeira vez (Walsh 2003; Onakunle e Birch 2005).

2.1.1 Tecnologia de hibridoma

A tecnologia de hibridoma surgiu em 1975 por intervenção dos cientistas Georges Kohler e Cesar Milstein (Alkan 2004) e tem provado ser uma das estratégias mais bem sucedidas no tratamento de doenças oncológicas nos últimos 20 anos.

Os hibridomas tratam-se de linhagens celulares imortalizadas, originadas pela fusão de células de mieloma imortais com linfócitos B, capazes de produzir continuamente um determinado anticorpo, designado por anticorpo monoclonal, mAbs (Pandey 2010). Cada hibridoma é capaz de dar origem a um só tipo de anticorpo específico para um único epítipo, que após se ligar às células tumorais é capaz de direccionar um ataque às mesmas, graças à formação do complexo antigénio-anticorpo. As células de hibridoma são posteriormente clonadas dando origem a células filhas iguais a ela com capacidade para crescerem e se multiplicarem continuamente (Lerner 1981; National Research Council (US) Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies 1999).

Apesar do seu actual êxito, os primeiros anticorpos a serem produzidos, de origem murina, quando administrados a humanos, estimulavam uma reacção imunológica denominada resposta HAMA (do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*). Para contornar esse efeito desenvolveram-se os anticorpos

quiméricos, que combinam os genes que codificam a região variável de anticorpo murino com os genes que codificam a região constante de anticorpos humanos. Estes revelaram uma resposta imunitária menor e por possuírem uma região constante humana mostraram capacidade de ativar outros componentes do sistema imunitário humano. Mais tarde, para melhorar a sua especificidade, surgiu a produção de anticorpos humanizados e anticorpos humanos caracterizados pela alteração do gene murino que codifica a região variável e as CDRs (do inglês, *Complementarity Determining Region*) da região variável do anticorpo, respetivamente, por um gene humano que codifica essa mesma região. (Jones *et al.* 2007; Reis *et al.* 2009; Lotfipour e Hallaj-Nezhadi 2012; dos Santos *et al.* 2006).

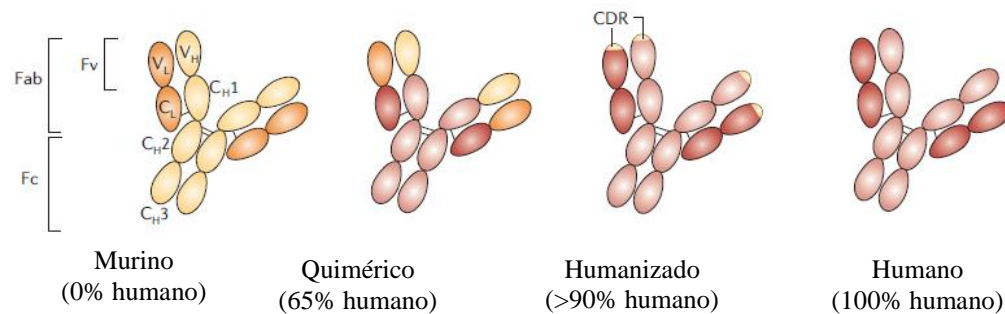


Figura 2.1 – Representação esquemática de um anticorpo murino, quimérico, humanizado e humano. Quanto maior o grau de humanização dos anticorpos menor será a resposta imunológica que os mesmos desencadeiam no organismo humano. Adaptado de (Imai e Takaoka 2006).

2.1.2 Tecnologia de DNA recombinante

No início de 1970, a engenharia genética permitiu o desenvolvimento de um conjunto de técnicas onde um determinado fragmento de DNA foi isolado e os genes purificados, examinados e manipulados (Garcia e Chamas 1996). Grande parte dos produtos biofarmacêuticos são produzidos com base nesta tecnologia quer *in vitro* ou *in vivo*. Este método permite isolar e amplificar fragmentos de DNA exógeno pela sua introdução num determinado vetor, dando origem a uma nova molécula chamada de DNA recombinante, rDNA (Stryjewska *et al.* 2013). Na década de 80, este método permitiu introduzir na bactéria *E. Coli* o gene que codifica para a produção de insulina humana, tornando-se no primeiro biofármaco recombinante a entrar no mercado farmacêutico (Chedrese 2009).

Para produzir as proteínas recombinantes desejadas é necessário realizar uma série de ações que vão desde a obtenção do gene de interesse, até à purificação da proteína desejada. Para obter o fragmento de DNA ou RNA pretendido, diversas enzimas medeiam a introdução de um fragmento

de DNA e interesse num vetor de clonagem. O DNA recombinante obtido é inserido em células hospedeiras que expressam o fragmento e produzem a proteína esperada. Após selecção das células mais produtivas, o meio para o qual a proteína é excretada é separado e a mesma é purificada (Firidin 2010; Griffiths *et al.* 1999).

2.2 Anticorpos

Os anticorpos, também chamados por imunoglobulinas (Ig), são proteínas produzidas pelo sistema imunológico, capazes de reconhecer substâncias estranhas ao organismo, de forma específica, os antígenos (Sena e Goldman 2001). Os agentes terapêuticos baseados em anticorpos fazem uso da elevada especificidade e seletividade da interacção anticorpo-antígeno para neutralizar venenos, toxinas e infeções, bloqueando os receptores da superfície celular e dirigindo uma resposta imune adequada (Chernajovsky e Nissim 2008). Cada anticorpo, independentemente da sua especificidade, tem uma estrutura comum de quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas (Turgeon 2013; Goldsby *et al.* 2003), que contêm uma região variável, V, e três regiões constantes, C. A região variável, na extremidade das cadeias, possui uma sequência altamente variável entre anticorpos específicos para se ligar a diferentes antígenos (Hames e Hooper 2005). Na figura 2.2, observa-se a estrutura típica de um anticorpo.

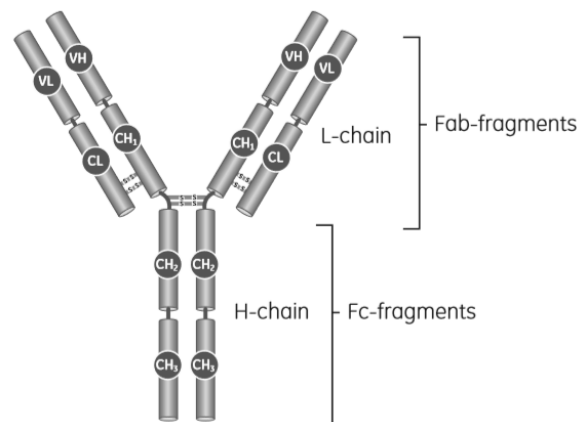


Figura 2.2 – Estrutura de um anticorpo. Adaptado de (GE Healthcare 2015).

As pontes dissulfeto, permitem estabelecer diversas ligações nas imunoglobulinas nomeadamente, a ligação das cadeias pesadas entre si, e a ligação de uma cadeia leve a uma cadeia pesada (Liu e May 2012). Por sua vez a região de charneira atribui susceptibilidade à clivagem enzimática e

flexibilidade ao anticorpo para adaptar a sua conformação aquando da ligação ao antigénio (Marques e Almeida 2006).

A digestão enzimática parcial dos anticorpos por intermédio da papaína ou pepsina, origina fragmentos biologicamente ativos, tais como o fragmento Fc, Fab ou ((Fab')₂), que podem também ser produzidos utilizando a tecnologia recombinante (Day e Schultz 2014). Outros fragmentos de anticorpo como o Fv e Fd resultam respetivamente da região variável, e de metade da cadeia pesada. Na figura 2.3 é possível identificar os diferentes fragmentos resultantes da intervenção enzimática nos anticorpos.

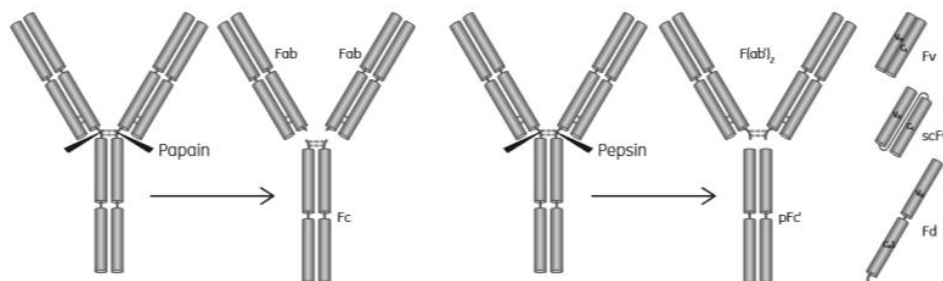


Figura 2.3 – Fragmentos de anticorpo originados por acção da digestão enzimática (GE Healthcare 2015).

2.3 Tribody™

O Tribody™ é um anticorpo multiespecífico desenvolvido pela Biotecnol e trata-se de uma molécula que conjuga diferentes cadeias polipeptídicas numa estrutura multifuncional. É constituído por um fragmento Fab e dois fragmentos scFv (do inglês, *single chain variable fragment*), permitindo a ligação a três epítomos diferentes (Mertens 2011). Os Tribody™ são derivados de anticorpos recombinantes multifuncionais que utilizam a heterodimerização *in vivo* da cadeia pesada (fragmento Fd) e da cadeia leve (L) de um fragmento Fab para formar uma estrutura de suporte, sobre a qual funções adicionais podem ser incorporadas, tais como ligantes adicionais (Mertens 2011).

Cada cadeia do fragmento Fab, pode ser alargada pela extremidade C-terminal com um ligante peptídico, scFv. As únicas sequências não naturais presentes na molécula são os ligantes peptídicos que unem os domínios VH e VL na porção scFv e os ligantes que fundem a cadeia Fab e os péptidos scFv(1) e scFv(2) (Creative Biolabs 2015). Na figura 2.4 está representada a estrutura do Tribody™.

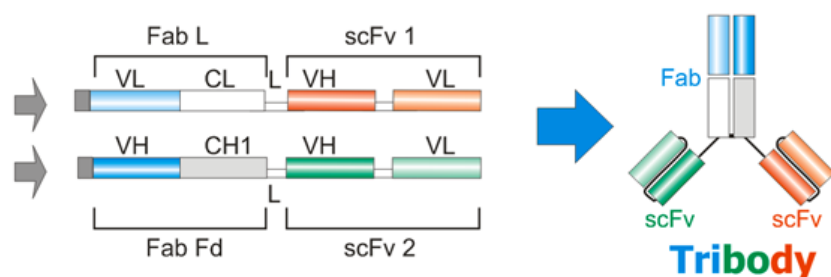


Figura 2.4 – Ilustração da estrutura do Tribody™. Adaptado de (Biotecnol 2014).

Comparando com outros anticorpos, o Tribody™ apresenta diversas vantagens, especialmente em aplicações terapêuticas. O seu tamanho intermédio, de cerca 100 kDa, entre um anticorpo bi-específico e um IgG, traduz-se num equilíbrio óptimo entre a introdução da molécula nas células tumorais e o seu tempo de meia-vida, evitando a sua rápida dispersão nos rins (Biotecnol 2014). Adicionalmente, a acumulação de anticorpo nos tumores é consideravelmente melhor, mantendo um tempo de semi-vida maior quando comparado com as imunoglobulinas (Biotecnol 2014). O Tribody™ pode ser construído de diversas formas nomeadamente, com três regiões variáveis diferentes entre si, com duas regiões variáveis iguais e uma distinta dessas, ou ainda com três regiões variáveis iguais entre si logo específicas para o mesmo antígeno (Creative Biolabs 2015).

Anticorpos como o Tribody™ podem ser facilmente produzidos de diferentes formas inclusive com recurso a um simples batch sem necessidade de qualquer intervenção a não ser a sua purificação (Mertens 2011). No que respeita aos processos de purificação, trata-se de uma classe de biomoléculas exigente, devido à sua sensibilidade a mudanças no pH, temperatura, tensões de cisalhamento, e produtos que causam desnaturação, pelo que para manter a sua configuração correta, a fim de reter a sua actividade, o processo de purificação deve decorrer em condições controladas e conhecidas.

A sua purificação pode ser feita com recurso a diversos métodos analíticos que podem ser realizados sucessivamente até se obter a proteína de interesse devidamente purificada. Um dos métodos normalmente utilizado numa primeira fase é a cromatografia de afinidade por proteína L na qual a coluna é constituída por uma resina com afinidade para as cadeias leves das biomoléculas, e que portanto separa as proteínas constituídas por pelo menos uma cadeia leve das restantes moléculas presentes no meio (Anspach 2004; Griep e McDougall 2010). A cromatografia de troca catiónica é também uma técnica amplamente utilizada, que tem por base a carga elétrica das diferentes moléculas e que permite separar o Tribody™ (pI 7-8) de produtos indesejados ainda existentes no meio ou derivados do próprio produto como o caso dos agregados (Schlatter *et al.*

2005; Mertens 2011). A utilização de uma coluna IMAC (do inglês, *Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*) é uma técnica de purificação que também pode ser utilizada caso o Tribody™ contenha uma cauda (*tag*) de histidina que possui afinidade para os íons metálicos imobilizados na coluna permitindo obter uma grande fração de proteína purificada (Mertens 2011; Gupta *et al.* 2002). Adicionalmente, é por vezes necessário realizar um ou mais passos de polimento, quando na etapa de purificação os Tribody™ são co-purificados com agregados e ainda não detêm pureza suficiente. Um dos métodos recorrentemente usados é a SEC (do inglês, *Size Exclusion Chromatography*) que pela diferença de pesos moleculares entre os agregados e os Tribody™, permite a separação dos mesmos (Mertens 2011). No entanto, esta estratégia é pouco usada, pois dá origem a baixos rendimentos e recuperações de produto.

2.4 Linhas celulares para produção de proteínas recombinantes

A necessidade contínua de proteínas recombinantes, incluindo anticorpos, deve-se à sua importância no desenvolvimento de novos tratamentos e na determinação e reconhecimento estrutural de novos alvos. A sua produção requer a introdução de DNA, que codifica a proteína desejada, numa célula hospedeira através de um processo designado por transformação quando aplicado a procariontes ou transfecção quando aplicado a eucariotas. Depois de produzida, a proteína é sujeita a modificações pós-tradução necessárias para a sua aplicação em humanos (Muller 2005; Overton 2014).

Após a tradução do mRNA, algumas das proteínas sintetizadas e presentes no citoplasma estão prontas para desempenhar a sua função, no entanto, outras necessitam de sofrer modificações pós-tradução como a glicosilação, um processo altamente variável e observado em proteínas secretadas pelas células, caracterizado pela ligação covalente de oligossacarídeos (glicanos) a cadeias polipeptídicas, por intermédio de enzimas específicas dando origem a glicoproteínas (Del Val *et al.* 2010; Stenesh 2013; Senger e Karim 2005). As glicoproteínas formam-se no retículo endoplasmático sendo depois transportadas por vesículas até ao complexo de Golgi no qual sofrem modificações por meio de mais enzimas, que atribuem à proteína um sinal que determina o seu destino e constituição final (Del Val *et al.* 2010; Lingg *et al.* 2012). No caso das células eucarióticas a modificação de proteínas ocorre por N-glicosilação. A glicosilação é um acontecimento altamente regulado, no qual durante a diferenciação e desenvolvimento das biomoléculas, mudanças nas condições físicas e químicas do meio de cultura celular tais como a disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, oxigénio dissolvido, tensões de cisalhamento e concentração de amónia acumulada podem afectar os perfis de glicosilação (Spearman *et al.* 2007).

Existem diversas células hospedeiras que permitem a produção de proteínas nomeadamente, bactérias, leveduras, células vegetais, células de insecto e células animais. A *E. Coli*, bactéria naturalmente presente no organismo humano, é um dos hospedeiros mais utilizados na engenharia genética graças ao seu rápido crescimento, fácil manipulação, alta expressão proteica e baixo custo associado. No entanto, os sistemas bacterianos exibem limitações na expressão de proteínas mais complexas devido à incapacidade de realizar modificações pós-tradução, dando origem a corpos de inclusão (agregados insolúveis) (Costa *et al.* 2014). Por esse motivo, na indústria dos biofármacos, as células animais tornaram-se a principal escolha para a produção de proteínas recombinantes pois permitem contornar as limitações de outras linhas celulares procariotas (Zhang 2010), sendo capazes de realizar modificações apropriadas como a correcta glicosilação das proteínas, garantindo a sua função e cinética biológicas. Além disso, o perfil de glicosilação resultante das células animais é o mais semelhante ao do humano contrariando possíveis problemas de toxicidade ou imunogenicidade no paciente aquando da sua administração. As linhas celulares animais mais comumente utilizadas são, as células CHO (do inglês, *Chinese Hamster Ovary cells*), as quais permitem a produção industrial e reprodutível de anticorpos, as células HEK293 (do inglês, *Human Embryo Kidney cells*), NS0 (do inglês, *myeloma cells*), células HT1080 (do inglês, *Human Sarcoma cells*) ou células BHK (do inglês, *Baby Hamster Kidney cells*) (Agrawal e Bal 2012; Lanza *et al.* 2013).

Segundo Raju *et al.* (2000), a glicosilação de proteínas é altamente específica e dependente da espécie celular utilizada, variando entre diferentes tipos celulares. As células CHO são actualmente as células animais mais bem estabelecidas e utilizadas na indústria biofarmacêutica para a produção estável e a larga escala (g/l) de glicoproteínas. Distinguem-se pela capacidade de crescerem em suspensão, em meios quimicamente definidos sem soro, a altas densidades, pela eficiente amplificação do gene de interesse, resistência à infecção por vírus humanos e ainda pela sua capacidade de produzirem alto número de cópias do DNA de interesse permitindo uma produção considerável de proteína (Lai *et al.* 2013). Contudo, como indica a figura 2.5, as células animais não-humanas possuem na parte terminal dos seus glicanos, os epítomos α -Gal e ácido N-glicolneuramínico (Neu5Gc) inexistentes nas células humanas.

Estes terminais podem desencadear uma reacção adversa quando administrados num humano uma vez que o seu sistema imunitário possui anticorpos contra tais epítomos (Brooks 2004; Ghaderi *et al.* 2012; Butler e Spearman 2014). Por sua vez, o uso de linhas celulares humanas como é o exemplo das HEK293F, permite a produção de glicoproteínas totalmente adaptadas para serem administradas em humanos sem provocar efeitos secundários indesejados.

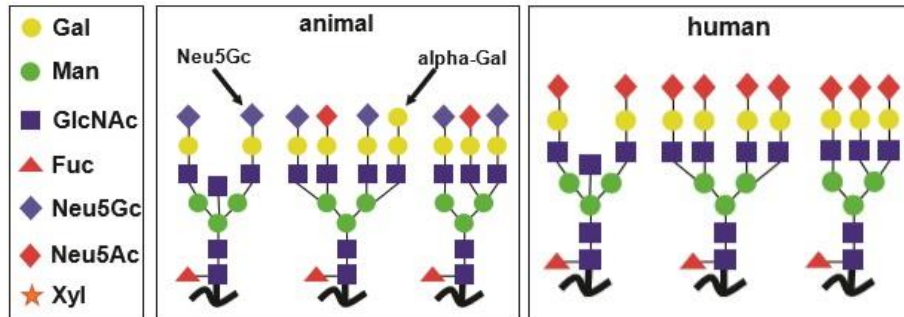


Figura 2.5 – As células eucarióticas têm capacidade de modificar as proteínas por N-glicosilação, no entanto, as estruturas que originam são distintas. A figura representa a diferença entre a estrutura de glicanos provenientes de células não humanas e humanas. Adaptado de (Ghaderi *et al.* 2012).

2.5 Transfecção

Assim que a linha celular a ser usada é estabelecida, é necessário que a mesma seja transfectada com os vetores que codificam para as cadeias leve e pesada, possibilitando a produção da glicoproteína desejada. A transfecção envolve diferentes estágios desde a criação dos vetores de expressão, escolha do método de transfecção a usar dependendo dos diversos fatores envolvidos e ainda a selecção das células adequadamente transfectadas (Costa *et al.* 2010).

2.5.1 Vetores de expressão

Para possibilitar a expressão de uma determinada proteína é necessária a introdução de um fragmento de DNA, que a codifica, numa célula hospedeira. Para tal, são necessários vetores de expressão, ou seja, moléculas de DNA às quais são adicionados fragmentos de DNA externo e que possuem capacidade de replicação (Amorim 2011).

Os vetores de expressão são usados para a expressão do gene que codifica para uma determinada proteína (Carson e Robertson 2006) e os mais utilizados são os plasmídeos, moléculas de DNA circular geralmente em cadeia dupla, que se replicam independentemente do cromossoma celular. O seu tamanho pode variar desde alguns milhares de pares de bases até mais de 100 quilo bases, e a sua existência é intracelular, sendo distribuída verticalmente para células filhas após a divisão celular do hospedeiro (Brown 2010; Lodish *et al.* 2000).

Os vetores utilizados para a expressão estável carregam sequências nucleotídicas essenciais, necessárias para a sua utilização em clonagem de DNA, nomeadamente múltiplos sítios de clonagem, ou seja, locais de restrição que simplificam a inserção de DNA estranho no plasmídeo,

uma origem de replicação que permite o início da replicação de novas moléculas de DNA, um promotor que possibilita a transcrição controlada da proteína de interesse, um repressor que regula a expressão de um ou mais genes pela diminuição da replicação e terminadores de transcrição que impedem a transcrição indesejada contribuindo para a estabilidade do plasmídeo e do mRNA (San e Bennet 1995; Madigan *et al.* 2010; Balbás e Bolívar 1998).

Quando o vetor é utilizado para obter uma linha celular estável, existe a hipótese de que durante a transfecção o mesmo não integre o genoma hospedeiro. Por tal, é inserido no vetor um gene marcador que permite seleccionar as células que foram efectivamente transfectadas. Esse gene marcador, de resistência a antibióticos, torna-se assim uma importante característica quando as células se encontram sob pressão seletiva (*i.e.* meio com antibiótico) (Jostock 2011).

Para lá dos problemas na concepção de vetores de expressão, comuns a todas as proteínas recombinantes, existem problemas adicionais que devem ser contornados (Costa *et al.* 2010). A interação entre as subunidades da proteína, a cadeia leve e a cadeia pesada, pode influenciar a cinética e a quantidade de proteína pura produzida. No entanto, tais fatores podem ser controlados através da utilização de proporções estequiométricas adequadas de cada cadeia (Schlatter *et al.* 2005; Li *et al.* 2007). Através do uso de dois vetores distintos, cada um codificando uma das cadeias do anticorpo que será produzido, e de seguida transfectando-os para a célula, é possível controlar a expressão desses fragmentos de DNA pela proporção em que cada um é utilizado na cotransfecção (Costa *et al.* 2010). A vantagem deste tipo de expressão é a manipulação de vetores mais pequenos e a variação da estequiometria de plasmídeos. A linearização dos plasmídeos é normalmente realizada, antes da transfecção celular, pois permite melhorar a eficiência do método (Wurm 2004).

No caso específico deste trabalho, dois vetores diferentes foram utilizados, o pBio1-Neo e o pBio2-Zeo (Anexo I), em que o primeiro codifica para a cadeia pesada com um marcador de resistência à neomicina e o segundo codifica para a cadeia leve com um marcador de resistência à zeocina.

Quanto à proporção estequiométrica de vetores a usar essa deve ser tal, que permita também contornar os problemas de agregação, fenómeno comumente observado em proteínas, que se caracteriza pela auto associação de um determinado número de moléculas constituintes da proteína que podem formar partículas visíveis, invisíveis, precipitados e outros (Wang *et al.* 2009). Uma das maiores preocupações associada à agregação é a possibilidade de essa desenvolver uma resposta imune indesejada quando administrada a um indivíduo. A quantidade de agregados produzidos durante o processo pode todavia, ser controlada durante a metodologia de cultura celular e purificação do material produzido, monitorizando as condições e implementando estratégias adequadas para minimizar a sua formação, sendo posteriormente os agregados produzidos

separados do produto de interesse por meio de métodos analíticos que permitem obter a proteína pura (Cromwell *et al.* 2006).

De acordo com Ho *et al.* (2013) apesar de as imunoglobulinas possuírem na sua estrutura principal o mesmo número de cadeias leves e pesadas tal não significa que uma proporção equilibrada dos dois vetores na célula seja ideal para a expressão correta da glicoproteína desejada. Assim uma das estratégias aplicadas, para controlar a formação de agregados e obter o máximo de proteína pura, é o controlo da quantidade de DNA adicionado às células que codifica para a cadeia leve e para a cadeia pesada do anticorpo.

Neste projeto estudou-se a influência da variação da proporção dos dois vetores de expressão utilizados na co-transfecção das duas linhas celulares tendo-se usado os seguintes rácios, 50L:50H, 75L:25H, 25L:75H, 10L:90H, em que L representa a cadeia leve e H a cadeia pesada. Tal variação, permite concluir e observar se a presença de um defeito de cadeia leve possibilita a obtenção de uma menor quantidade de dímeros e monómeros de cadeia leve.

2.5.2 Transfecção transiente vs. Transfecção estável

A transfecção celular pode ser de dois tipos, transiente ou estável, em que cada uma se caracteriza pela forma como o material genético é incorporado na célula hospedeira. A necessidade de realizar uma transfecção, surge quando se deseja analisar a expressão de um determinado gene numa célula animal (Kingston 2003), em que no caso deste trabalho se trata da expressão de genes específicos que codificam a síntese do TribodyTM5.

A produção de glicoproteínas para uso comercial ou clínico, em células animais, é por norma realizado por transfecção estável. Nesta tecnologia o gene transfectado é incorporado no genoma celular resultando na expressão contínua do gene de interesse dando origem a quantidades de produto crescente ao longo do tempo, mesmo após replicação celular (Groll 2003; Câmara 2014). No entanto, vários fatores dificultam a aplicação deste método nomeadamente, a possibilidade de o DNA integrar regiões da heterocromatina ou locais vitais do genoma celular reduzindo ou anulando a expressão do gene devido à sua integração aleatória. Além disso, se o número de cópias do gene presentes na célula hospedeira for reduzido esse pode ser também um obstáculo à sua expressão (Wurm 2004). Apesar das limitações, a estabilidade das linhas celulares animais é um pré-requisito para a produção de biofármacos, e por tal a transfecção estável é a técnica mais utilizada, apesar de se mostrar mais trabalhosa, demorada e dispendiosa envolvendo grande quantidade de recursos (Zhang 2010; Agrawal e Bal 2012).

Ao contrário da transfecção estável, a transfecção transiente permite de uma forma rápida e económica obter o produto de interesse numa quantidade razoável para ensaios laboratoriais, sem necessidade de seleccionar as células que eficazmente receberam o material genético (Hacker *et al.* 2009). Neste método o vetor de expressão não é incorporado no genoma da célula hospedeira, permanecendo em forma de plasmídeo no citoplasma e expressando-se por um curto período de tempo, sensivelmente 7 dias, devido à perda gradual de actividade por fatores ambientais e divisão celular (Câmara 2014).

Após a fase de transfecção estável, as células são seleccionadas por pressão seletiva, recorrendo ao uso de antibióticos, e as *pools* resultantes, que foram corretamente transfectadas, são subclonadas através de diluição limitante em placas de 96, 64 e 24 poços. Por norma, apenas uma pequena percentagem de clones expressa corretamente a proteína de interesse, a uma quantidade admissível, o que pode originar uma baixa produção. Infelizmente, este processo demora cerca de 2 a 3 meses sendo esta a maior desvantagem da aplicação de células animais associada a este tipo de transfecção.

2.5.3 Métodos de entrega de DNA

Certas bactérias, incorporam naturalmente DNA por um processo designado por transformação, no entanto a maioria das espécies tem que ser submetida a agentes químicos ou tratamento físico antes do DNA ser capaz de entrar nas células. Para facilitar a entrada de material genético no interior das células e a sua incorporação no genoma, vários métodos de transfecção têm sido desenvolvidos e utilizados com base em vetores que facilitam esse processo, podendo ser classificados como virais e não virais.

2.5.3.1 Vetores virais

O uso de vetores virais, permite de uma forma altamente eficaz, a transferência de genes específicos para o interior das células hospedeiras, tanto *in vitro* como *in vivo*, aliada à fácil manipulação dos mesmos (Warnock *et al.* 2011; Stone 2010). Diversos vetores virais foram desenvolvidos ao longo dos tempos, incluindo os retrovírus, lentivírus, adenovírus, vírus adenoassociados e vírus herpes simplex, sendo actualmente utilizados nas mais variadas aplicações da engenharia genética (Robbins e Ghivizzani 1998). Os primeiros vetores virais a serem usados na marcação de genes específicos e ensaios clínicos em seres humanos foram os retrovírus, capazes de integrar de forma

estável no genoma permitindo a expressão contínua do gene mas apenas aptos para infectar células em divisão (Stone 2010). Mais tarde, surgiram os adenovírus habilitados para infectar vários tipos de células incluindo as que não se encontram em divisão sendo apropriados a todas as linhas celulares e exibindo elevados níveis de expressão. Todavia, como não integram o genoma do hospedeiro a expressão do DNA é transitória e limitada (Khatun 2012).

Na generalidade, os vetores virais são aqueles que proporcionam uma maior eficiência de transfecção relativamente ao número de células a transfectar, no entanto, revelam algumas limitações pois podem provocar reacções imunológicas e/ou tóxicas, mutações do material genético, possibilidade de recombinação, limites no tamanho do material genético e elevado custo de produção (Fischer *et al.* 1999).

2.5.3.2 Vetores não virais

Os vetores não virais são uma alternativa aos anteriores, e utilizam métodos químicos tais como lipofecção, DEAE-dextrano e transfecção cálcio-fosfato e métodos físicos, como o bombardeamento de partículas, eletroporação ou microinjecção (Kingston 2003). Apesar de as suas eficiências de transfecção serem inferiores às dos sistemas virais, são métodos que comparativamente a esses são menos dispendiosos, facilmente manipuláveis, com baixa toxicidade e sem limitação à dimensão do DNA recombinante (Nayerossadat *et al.* 2012). Os sistemas físicos, permitem a transferência direta do DNA para as células por penetração da membrana, com baixa imunogenicidade associada, já os químicos baseiam-se na formação de um complexo entre as cargas positivas de polímeros ou lípidos catiónicos, e as cargas negativas dos grupos fosfato do DNA (Al-Dosari e Gao 2009; Cevher *et al.* 2012).

Entre os métodos não virais, os lípidos catiónicos são uma das estratégias mais usadas, tendo como vantagem a simples preparação, purificação, armazenamento, versatilidade e segurança de utilização em seres humanos, podendo transportar material genético de grande tamanho (Kim e Eberwine 2010).

2.5.3.3 Transfecção com lipossomas

Na lipofecção, a adição de uma solução de lípidos catiónicos medeia o transporte do DNA recombinante até às células-alvo. A estrutura dos lípidos catiónicos consiste em uma ou duas cadeias de hidrocarbonetos ligadas a um grupo com carga positiva que induzem interações

eletroestáticas entre o próprio e as cargas negativas dos grupos fosfato do DNA, dando origem a um complexo carregado positivamente, o lipoplexo (Felgner *et al.* 1987). Por sua vez a carga positiva do lipoplexo induz a interação com a membrana celular carregada negativamente permitindo a fusão de ambas (Maccarrone *et al.* 1996). O complexo de transfecção é depois captado para o interior da célula através de endocitose (Ross e Hui 1999) e assim que se encontra no interior da célula deve ser capaz de escapar da via endossomal, difundindo-se pelo citoplasma e inserindo-se no núcleo permitindo a integração do gene de interesse no genoma.

A maior desvantagem deste método é a falta de conhecimento relativamente à estrutura/atividade dos lipoplexos e mecanismos envolvidos na entrega dos genes a nível intracelular que ainda é escasso e pouco elucidativo (Simões *et al.* 2005).

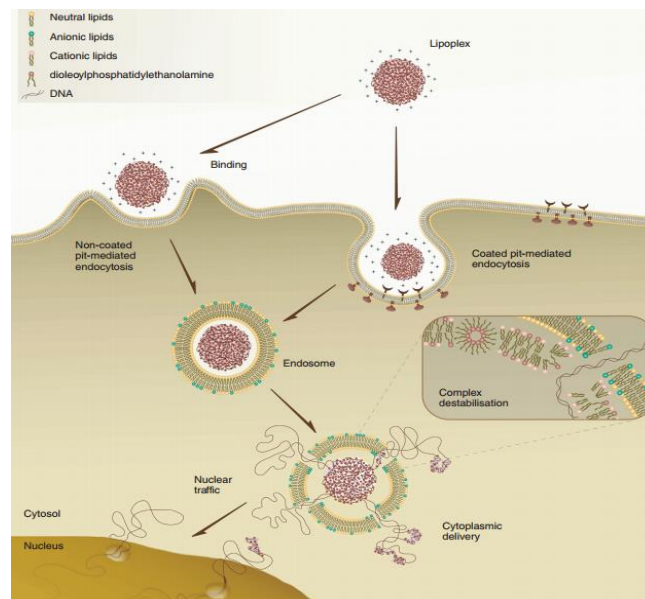


Figura 2.6 – Visão geral das principais etapas envolvidas na interação de lipoplexos com células. Ligação e captação celular dos complexos, libertação do DNA no citoplasma, migração do DNA até ao núcleo (Simões *et al.* 2005).

2.6 Selecção de células animais

Promover o crescimento celular na presença de antibióticos no meio é uma forma eficaz de seleccionar as células que contêm um determinado plasmídeo com um gene marcador, integrado efetivamente no seu genoma.

Após a transfecção, procura-se isolar e propagar as células corretamente transfectadas (Promega 2013). Para tal, os vetores de expressão devem conter para além do gene que codifica para a glicoproteína desejada, um co-gene que permite a resistência das células, adequadamente transfectadas, aquando da presença de antibiótico. Os agentes de selecção, como o caso dos antibióticos, provocam o abrandamento do crescimento celular ou até a sua morte pela inibição de processos vitais necessários à célula, como a síntese proteica, replicação do DNA, transcrição e biossíntese da parede celular (Julin 2014).

Existem diferentes tipos de antibióticos que podem ser utilizados na selecção de células animais tais como a neomicina, zeocina, higromicina B, puromicina e geneticina, no entanto, a sua escolha prende-se com a linha celular utilizada (Lanza *et al.* 2013; Schlokot *et al.* 1997). A concentração de antibiótico a utilizar na fase de selecção é também um parâmetro de extrema importância que depende fortemente da linha celular usada e deve ser definida com vista a permitir apenas a sobrevivência das células transfectadas. Por esse motivo a concentração a usar não deve ser demasiado baixa pois nesse caso pode permitir a sobrevivência de todas as células, por outro, não deve ser exageradamente alta pois pode provocar a morte radical da grande maioria das células, inibindo a sobrevivência das células que possuem o vector corretamente integrado.

O primeiro passo, crucial para a criação de uma linha estável é a determinação da concentração óptima de antibiótico a usar para seleccionar as células devidamente transfectadas através de uma curva de morte. Esta trata-se de uma experiência em que as células são expostas a quantidades crescentes de antibiótico para determinar a concentração mínima necessária para matar as células ao longo de um intervalo de tempo (Mirus Bio LLC n.d.). A pressão seletiva é continuamente elevada ao longo do tempo para permitir a amplificação do gene e conseqüentemente a expressão da proteína. As células que sobrevivem à selecção são subseqüentemente diluídas em placas permitindo a sua expansão individual de forma a dar origem a uma população celular final homogénea, na qual todas as células são iguais entre si. O melhor clone é posteriormente escolhido tendo por base o seu crescimento, taxa de produtividade e estabilidade (Lanza *et al.* 2013).

No presente trabalho, dois antibióticos são usados durante a selecção celular, a neomicina e a zeocina, caracterizadas pelo seu distinto mecanismo de acção sobre as células.

A zeocina pertence à família da bleomicina/fleomicina e é obtida a partir de *Streptomyces*. A sua cor azul característica, é atribuída pela presença do ião cobre o qual é reduzido e eliminado quando o antibiótico entra na célula, tornando a zeocina activa e capaz de se unir ao DNA. Trata-se de um antibiótico de amplo espectro e altamente efetivo em células animais, vegetais, leveduras e bactérias. A resistência celular à zeocina é atribuída pelo gene *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus*, que inativa a zeocina ligando-se ao antibiótico. O seu mecanismo de acção nas células

baseia-se na sua ligação ao DNA, intercalando-se na cadeia, provocando a sua consequente clivagem, causando a morte celular (Invitrogen 2002; Ehrenfeld et al. 1987; Invitrogen 2012).

A neomicina é um antibiótico aminoglicosídeo, que bloqueia a síntese proteica de linhas celulares estáveis, interferindo na actividade ribossomal que medeia a tradução da proteína. A ligação da neomicina ao ribossoma interfere com a ligação entre o mRNA e tRNA o que resulta na produção de péptidos tóxicos ou não funcionais inibindo a síntese de proteínas vitais ao crescimento da célula (Hoch *et al.* 1998; DrugBank 2005).

3 Descrição Técnica e Discussão dos Resultados

3.1 Material biológico

3.1.1 Linhas celulares

Neste trabalho foram utilizadas duas linhas celulares distintas para a produção de TribodyTM5, as FreestyleTMHEK293 e as CHO-S.

A linha celular FreeStyleTMHEK293 (ou HEK293F) é composta por células embrionárias de rim humano, derivada de um tipo selvagem de HEK293. São facilmente cultivadas, estando altamente adaptadas para crescerem em culturas em suspensão, atingindo altas densidades celulares e níveis de expressão, através do uso de meio isento de soro (FreeStyleTM293 Expression Medium). A linha celular CHO-S, é uma linha de células estabelecida por aneuploidia estável, derivada de células de ovário de hamster chinês, CHO K1, adaptada a altas densidades e cultura em suspensão em meios sem soro sendo capazes de expressar elevados níveis de síntese de proteínas recombinantes.

3.2 Procedimentos

Todos os procedimentos descritos ao longo desta seção foram realizados em câmara de fluxo laminar, utilizando material estéril descartável ou autoclavado. O material não estéril foi devidamente esterilizado com álcool a 70% antes da sua entrada na câmara para evitar possíveis contaminações.

O meio de cultura de ambas as linhas celulares foi pré-aquecido a 37°C e testado sempre que manipulado ou adicionado às células.

3.2.1 Descongelamento das células

Ambas as linhas celulares, existentes no banco de células da Biotecnol, encontravam-se congeladas em meio completo com 10% de DMSO (do inglês, *Dimethyl sulfoxide*; Sigma-Aldrich, Missouri, E.U.A) num tubo de criopreservação (VWR, Radnor, PA, E.U.A) com 1 ml de células a 1×10^7 células viáveis/ml, armazenadas em azoto líquido a -120°C.

Para descongelar as células, as alíquotas em azoto líquido, foram transferidas para um banho de água a 37°C. Após estar totalmente descongelada, o conteúdo da alíquota da linha FreeStyleTMHEK293, foi transferido para um *shake flask* (VWR) com FreeStyleTM293 Expression Medium (Gibco, Carlsbad, CA, E.U.A) com 1% de Pen Strep (do inglês, *Penicillin Streptomycin*

Solution, Gibco) (10000 U/ml penicilina e 10000 µg/ml de estreptomicina). Para as células CHO-S utilizou-se meio de cultura CDFortiCHO™ Medium (Gibco) com 1% de Pen Strep (Gibco) e 8mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich). As células foram incubadas a 37°C numa atmosfera humidificada com 8% de CO₂ num agitador orbital a 150 rpm.

3.2.2 Cultura e manutenção das linhas celulares

Este procedimento permitiu manter a actividade constante das células através da renovação do meio em que se encontram. Para a manutenção e crescimento das células, estas foram mantidas a uma temperatura de 37°C, em atmosfera húmida com 8% CO₂ a uma agitação de 150 rpm. O meio foi substituído cerca de 2 a 3 vezes por semana. A cada dia de passagem, através da contagem das células viáveis/ml, determinou-se o volume de inóculo necessário para manter as células a uma densidade celular de 3×10^5 células viáveis/ml e conseqüentemente o volume de meio novo, pré-aquecido, necessário adicionar para perfazer um volume útil de 30 ml de um *shake flask* estéril de 125 ml. Ao fim deste processo as culturas foram levadas novamente à incubadora onde permaneceram por mais 3 a 4 dias até à seguinte passagem mantendo-se assim na sua fase exponencial de crescimento.

3.2.3 Estudo de crescimento

O estudo de crescimento foi efetuado em *shake flasks* de 125ml e *spin tubes* (ThermoScientific™, Waltham, Massachusetts, E.U.A) de 50ml, preparados com um inóculo de 3×10^5 células/ml e respetivo meio de cultura. Todos os ensaios foram realizados em triplicado excepto no caso dos *shake flasks*. Assim que inoculados, os *shake flasks* foram colocados na incubadora com plataforma rotativa a 150 rpm, a 37°C, com atmosfera humidificada a 8% CO₂, enquanto os *spin tubes* foram colocados numa incubadora com atmosfera humidificada a 5% de CO₂ e a 300 rpm. A cada 24 horas foi recolhida uma porção da células em meio para determinar a quantidade de células viáveis presentes.

3.2.4 Estudos de curva de morte

Inocularam-se *spin tubes* de 50 ml com uma densidade celular de 3×10^5 células/ml, com diferentes concentrações dos antibióticos zeocina (50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml e 400 µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A) e neomicina (20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml e 50 µg/ml) (Sigma-Aldrich). Os *spin tubes* foram incubados a 37°C, atmosfera humidificada e a 5% CO₂ numa incubadora com

plataforma rotativa a 300 rpm. A cada 24 horas, aproximadamente, recolheu-se cerca de 0,5 ml de cada tubo para determinar a concentração celular.

3.2.5 Transfecção de células com FreeStyle™ Max Reagent

Para realizar a transfecção das células, usou-se um método de transfecção com base em lípidos catiónicos. Ambas as linhas celulares foram transfectadas com dois plasmídeos diferentes, a diferentes proporções, um contendo a cadeia leve e um marcador com resistência à zeocina e outro a cadeia pesada e resistência à neomicina.

Para a transfecção com FreeStyle™MaxReagent (Invitrogen), foi feita a expansão das células 24h antes da transfecção, a 5×10^5 células/ml em 150 ml, completado com o respetivo meio.

No dia da transfecção, para cada uma das linhas celulares, foram preparados 6 *shake flasks*, cada um com densidade de 10×10^5 células/ml, para um volume útil de 30 ml completado com meio pré-aquecido e levados à incubadora com agitação constante a 37°C. Para as células CHO-S, num tubo tipo *falcon* (15 ml) (VWR) misturou-se 50 µl no total dos dois plasmídeos em OptiPRO™SFM (Gibco) para um volume final de 1,5 ml. Num tubo *ependorf* de 2 ml, adicionou-se 50 µl de FreeStyle™MAX Reagent (Invitrogen) com 1,45 ml de OptiPRO™SFM (Gibco) e agitou-se gentilmente. A solução contida no *ependorf* foi adicionada ao *falcon* e incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente permitindo a formação dos complexos lípidos-DNA. Essa preparação foi realizada e adicionada a cada um dos *shake flasks* posteriormente incubados. Para as células HEK293F preparou-se num tubo *ependorf* 37,5 µl de DNA total em OptiPRO™SFM (Gibco) para um volume final de 0,6 ml, agitando levemente e levado a incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente. Noutro *ependorf* misturou-se 37,5 µl de FreeStyle™MaxReagent (Invitrogen) em OptiPRO™SFM (Gibco) para um volume total de 0,6 ml. O conteúdo dos *ependorfs* foi misturado e incubado durante 20 minutos à temperatura ambiente permitindo a formação dos lipoplexos. A mistura de transfecção final foi adicionada às células posteriormente levadas à incubadora a 37°C, com 8% CO₂ a 150 rpm. Foi ainda realizado um segundo ensaio no qual uma transfecção adicional foi efetuada para ambas as linhas celulares utilizando dois plasmídeos, ambos com resistência à zeocina.

3.2.6 Pressão seletiva

Após 48h da transfecção celular, iniciou-se a selecção das células corretamente transfectadas tendo-se determinado inicialmente o número de células viáveis e respetiva viabilidade.

Nas transfecções realizadas para as FreeStyle™HEK293, as células foram mantidas a uma densidade celular de 4×10^5 células viáveis/ml em 30 ml completos com meio de cultura. A essas foram adicionadas os agentes de selecção, zeocina (Gibco) e neomicina (Sigma-Aldrich), a uma concentração final de 50 $\mu\text{g/ml}$ e 20 $\mu\text{g/ml}$, respetivamente. Os *shake flasks* foram colocados na incubadora a 37°C, 150 rpm e atmosfera húmida. Para as células CHO-S, a selecção foi realizada com as células em suspensão em *shake flasks* e *T-flasks* (VWR). Após contagem, seis *T-flasks* de 75cm² foram inoculados com uma concentração celular de 5×10^5 células viáveis/ml em 20 ml de meio de cultura e com uma concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina (Gibco) e 20 $\mu\text{g/ml}$ de Neomicina (Sigma-Aldrich). Os frascos foram incubados estaticamente a 37°C, com 80% de humidade relativa e 5% CO₂, onde permaneceram durante 7 dias sem qualquer intervenção. No caso dos *shake flasks* foi adicionado uma concentração celular de 5×10^5 células/ml completo com meio e as concentrações de antibiótico referidas anteriormente.

Após três dias do início da pressão selectiva, as transfecções em *shake flask* foram mantidas a uma densidade celular de 3×10^5 células viáveis/ml acrescentando agentes de selecção em quantidades adequadas para o volume de meio fresco adicionado. Este processo foi repetido a cada 3-4 dias até se obter a *pool* de células adequadamente transfectadas, com viabilidade maior que 85% e uma densidade celular superior 10×10^5 células/ml.

Quanto aos *T-Flasks*, após os sete dias, as células recuperadas ($>5 \times 10^5$ células viáveis/ml) foram transferidas para *shake flasks* a uma concentração celular de 3×10^5 células viáveis/ml completos com meio novo e agentes de selecção.

Após este ensaio, uma segunda experiência foi realizada, devido à morte das células HEK293F e CHO-S provenientes de *T-Flask*, na qual o protocolo de transfecção e selecção se manteve igual, no entanto, diminuíram-se as concentrações de agentes de selecção para metade (25 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina e 10 $\mu\text{g/ml}$ de neomicina).

3.2.7 Congelamento de células

Ao fim da fase de selecção, para garantir a existência de células transfectadas no caso da ocorrência de contaminação, foram feitos bancos das *pools* seleccionadas, evitando a necessidade de repetir todo o processo de transfecção e selecção. Para criar os bancos de células, determinou-se a quantidade de meio de congelamento necessário, previamente definido, em função do número de frascos de criopreservação necessários a preparar. Num tubo de centrífuga estéril (VWR) foi feita uma mistura de meio de cultura a 90% com 10% de DMSO (Sigma-Aldrich) armazenada a 2-8°C até à sua utilização. Através da contagem do número de células viáveis e sabendo que a densidade celular em cada tubo de criopreservação deve ser de 1×10^7 células/ml, determinou-se qual o volume

de inóculo a ser centrifugado a 300g durante 5 minutos a 4°C. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspendido no meio de congelamento. Para cada um dos tubos transferiu-se 1 ml da suspensão final sendo de seguida colocados no Mr.Frosty™ Freezing Container (ThermoScientific™) para induzir um decréscimo gradual da temperatura (-1°C/min). Após 24h foram transferidos permanentemente para azoto líquido a -120°C.

3.3 Técnicas analíticas

3.3.1 Contagem de células pelo método de exclusão do azul de tripano

Num tubo *ependorf* diluiu-se a amostra de suspensão celular 1:2 com azul de tripano (*Trypan Blue Solution 0,4%*, Sigma-Aldrich). Após 1-2 min de incubação, cerca de 7 µl da mistura foi colocada em cada uma das câmaras da lamela de contagem e esta foi inserida no contador (TC10™ Automated Cell Counter, Bio-Rad, Hercules, CA, E.U.A). Ao adicionar a solução, o contador de células identificou as células vivas e mortas pois as últimas incorporam o corante apresentando uma coloração azul ao contrário do que aconteceu com as células vivas. Assim, foi determinada a quantidade de células totais e viáveis por ml presentes bem como a respetiva viabilidade.

3.3.2 ELISA

O Tribody™5 foi quantificado através do método de ELISA indireto. Placas de poliestireno de 96 poços (Corning Inc, Corning, NY, E.U.A) foram cobertas com um antigénio, ECD-5T4 (Biotecnol, Oeiras, Portugal) diluído em tampão 0,05M carbonato/bicarbonato, e colocadas a incubar a 4°C promovendo a ligação do antigénio às paredes dos poços. No dia seguinte, realizaram-se sucessivas lavagens com TTBS 1x (do inglês, *Tris-buffered saline with Tween20*), permitindo a remoção dos antigénios que não aderiram às paredes sendo de seguida adicionada uma solução de bloqueio (1% leite em pó em TTBS 1x) que preencheu os locais vazios dos poços evitando um falso sinal na leitura. Após incubar durante 1h, a solução de bloqueio foi descartada e a placa novamente lavada com TTBS 1x. As amostras de sobrenadante (previamente diluídas em 0,2% leite em pó em TBS) provenientes das culturas transfectadas foram adicionadas à placa e incubadas por 2h, permitindo a ligação do anticorpo de interesse ao antigénio. Novas lavagens foram realizadas e um anticorpo de detecção conjugado à enzima fosfatase alcalina (mouse anti-human IgG Fd-AP a 1:2000, LifeTechnologies, Carlsbad, CA, E.U.A) foi adicionado. A placa foi incubada durante 1h, seguida de várias lavagens com TTBS 1x e TBS 1x (do inglês, *Tris-buffered saline*) e adição do substrato pNPP (do inglês, *p-nitrophenyl phosphate*, Sigma-Aldrich) que promoveu a ocorrência de uma

reação enzimática com formação de cor. Depois de um pequeno período de incubação a reação foi travada com uma solução de 3M NaOH e a absorvância de cada um dos poços foi lida num leitor de placas. Foi feita uma curva padrão utilizando uma amostra de Tribody^{TM5} caracterizada de concentração conhecida.

3.3.3 Cromatografia de afinidade por proteína L

A purificação de TribodyTM efetuada por cromatografia de afinidade, através de colunas com matriz de proteína L, permite a ligação do anticorpo pela interação com a sua cadeia leve.

Todo o processo cromatográfico foi realizado na ausência de endotoxinas. Para assegurar essa condição, o sistema AKTATM (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) foi limpo com 1M NaOH, a coluna cromatográfica e as linhas foram limpas com *strong buffer* (500mM fosfato de sódio pH 7) e o material de vidro foi previamente pirogenado. A coluna de cromatografia foi empacotada com resina de proteína L a 3,9 mg/l volumes de coluna (GE Healthcare). Seguidamente foi realizada uma nova limpeza da mesma de forma a remover o NaOH presente, evitando a desnaturação das proteínas de interesse e as linhas foram purgadas com tampão de equilíbrio (PBS 1x pH 7,4).

A coluna operou a um caudal de 2 ml/min, e depois de equilibrada, a amostra foi injetada na coluna. Posteriormente, foi injetado na coluna tampão de lavagem (fosfato/citrato a pH 7,4), de forma a remover todas as proteínas que se ligaram de forma inespecífica à coluna e de seguida, usando um tampão de eluição (fosfato/citrato a pH 2), a amostra foi recolhida (2,5ml/tubo) pelo fracionador para tubos de 15 ml com volume adequado de tampão de neutralização (1M Tris pH 9). As fracções que continham a amostra para o qual se obteve o pico de proteína de interesse foram coletadas e guardadas a 4°C enquanto as restantes foram descartadas. No fim do processo cromatográfico, a coluna foi novamente equilibrada com o tampão correspondente e conservada a 4°C com 20% etanol até próxima utilização.

3.3.4 Concentração das amostras

Após o primeiro passo de purificação, por cromatografia de afinidade, foi necessário concentrar as amostras estudadas pois a concentração de Tribody^{TM5} obtida foi demasiado baixa para a amostra ser colocada diretamente na coluna de cromatografia catiónica. O material das *pools* obtidas da coluna com proteína L foi concentrado em Vivaspín 6 com um *cut-off* de 30kDa (GE Healthcare). O concentrador foi preenchido com a solução, e colocado numa centrífuga com rotor de ângulo fixo F34-6-38 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). A primeira centrifugação foi realizada a 10000g

durante 5 minutos, no entanto, o tempo de centrifugação necessário para atingir o volume de concentração desejado dependeu do produto e volume a concentrar.

3.3.5 Cromatografia catiónica analítica

Numa segunda etapa de purificação das amostras em estudo, foi usada uma cromatografia catiónica analítica, utilizando-se uma coluna com resina de permuta iónica, carregada negativamente consequentemente tem afinidade para moléculas com carga positiva.

Para separar o TribodyTM5 dos dímeros/multímeros de cadeia leve, a amostra foi injetada na coluna de troca catiónica utilizando o sistema Dionex UltiMateTM3000 (ThermoScientificTM) a um caudal de 0,5ml/min. O método de eluição foi feito por gradiente com dois tampões com concentrações de sal diferentes. Após equilíbrio da coluna iniciou-se o gradiente com o aumento da concentração de sal. Inicialmente foram eluídos os constituintes de cadeia leve e de seguida o TribodyTM5 e possíveis agregados de TribodyTM5 presentes na amostra.

3.3.6 SDS-PAGE

Neste ensaio, 3/4 das amostras a analisar foram diluídas com água ultrapura e completadas com 1/4 do volume total de tampão NuPAGE LDS (Invitrogen) sendo de seguida centrifugadas. A célula de eletroforese, XCell SureLockTMMini-Cell (Invitrogen) foi montada seguindo as instruções do fabricante tendo-se adicionado 600 µl de MOPS 1x à célula. Cada um dos poços foi carregado com 6 µl de marcador de peso molecular, SeeBlueR Plus2 (Invitrogen) e com 40 µl das respetivas amostras. O gel foi exposto a uma corrente de 200V durante 55 min e após esse tempo, foi lavado (3x com água ultrapura) e de seguida revelado com SimplyBlueTMSafeStain (Invitrogen), ficando neste reagente cerca de 20 minutos com agitação. Finalmente, foi colocado em água ultrapura e posteriormente analisado com recurso ao Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad) e ao software Image Lab (Bio-Rad).

3.3.7 Ensaio citotóxico

O ensaio citotóxico trata-se de um método utilizado para avaliar terapias baseadas no uso de anticorpos, que reconhecem especificamente células de tumor, e são capazes de recrutar células efectoras do sistema imunitário que aumentam a actividade antitumoral promovendo a lise celular.

Neste ensaio de toxicidade mediada por células dependentes de anticorpos, promoveu-se a morte de células-alvo através da ação do TribodyTM5 e de linfócitos T (utilizou-se uma mistura de células mononucleares de sangue periféricas-PBMC). As células-alvo (células tumorais com expressão de

5T4) foram cultivadas em aderência e mantidas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% FBS (do inglês, *Fetal Bovine Serum*, PAA, Pasching, Austria) e 1% Penicilina/Estreptomicina (Gibco) a 37°C e 5% CO₂. No dia anterior ao início do ensaio, as células-alvo foram marcadas com o corante de membrana PKH-67 (Sigma-Aldrich) segundo as instruções do kit do fabricante.

Para tal, as células-alvo começaram por ser lavadas com PBS (do inglês, *Phosphate-buffered saline*) e solução de dissociação (Biological Industries, Israel) promovendo a sua desagregação das paredes do *T-flask* e lavadas com RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) para remover os possíveis vestígios de FBS (PAA). Seguidamente foram centrifugadas (300g, 5 minutos) e ao *pellet* de células foi adicionado diluente C (Sigma-Aldrich) e imediatamente a seguir, a solução corante. Para parar a reacção de tingimento foi adicionado FBS e feita uma lavagem, desta vez com meio de cultura completo para remover o corante PKH-67 do meio.

A suspensão resultante foi distribuída pelos poços de uma placa de cultura e colocadas a incubar durante a noite a 37°C e 5% CO₂.

No dia seguinte, foram adicionados a cada um dos poços PBMC (adquiridas à Tebu-Bio) e Tribody™5 na gama de concentrações a estudar (em duplicado). À placa foram também adicionados um controlo sem Tribody™5 e células sem coloração com PKH-67 para determinar e definir a zona a analisar no FACS (do inglês, *Fluorescence Activated Cell Sorting*). As placas foram novamente colocadas a incubar nas condições referidas anteriormente.

Após 48h, as placas foram observadas de forma a detectar morte celular. O conteúdo de cada um dos poços foi transferido para um *ependorf* em conjunto com as células removidas por adição de tripsina (Sigma-Aldrich). As amostras resultantes foram analisadas por citometria de fluxo através do FACSCalibur (Becton Dickinson, New Jersey, EUA) de modo a quantificar o número de células vivas (com PKH-67). A citotoxicidade específica é definida pela percentagem de células mortas por acção do Tribody™5. O número de células mortas em cada ponto é calculado pela diferença entre as células vivas (com PKH-67) desse ponto e o número de células vivas do controlo sem Tribody™5.

$$\text{Citotoxicidade}(\%) = \left(1 - \frac{\#PKH67^+}{\#livecellctrl} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Estudos de curva de crescimento

Ambas as linhas celulares foram submetidas a um estudo de crescimento celular em suportes distintos (*shake flask* e *spin tube*), de forma a comparar o crescimento celular nos dois tipos de cultivo e as diferentes fases do crescimento, nomeadamente, o intervalo de tempo no qual as células se encontram na sua fase exponencial, altura em que devem ser mantidas, transfectadas ou subcultivadas. Na figura 3.1, encontra-se representado o crescimento celular das células HEK293F e CHO-S.

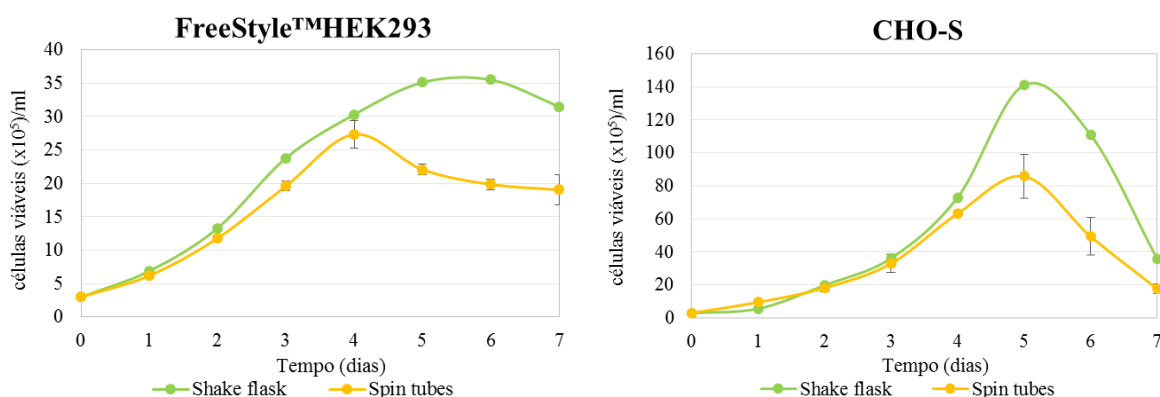


Figura 3.1 – Curvas de crescimento para as duas linhas celulares estudadas, FreeStyle™HEK293 e CHO-S, em diferentes suportes.

Pela análise da figura é notório que a fase exponencial das células FreeStyle™HEK293 e CHO-S ocorre entre o dia 2 a 4 e 2 a 5 respetivamente, o que indica que para ambas as linhas celulares serem mantidas no mesmo dia, essas devem ser passadas 2 a 3 vezes por semana em intervalos de 3 a 4 dias. Apesar de o crescimento celular se apresentar idêntico em *shake flask* e *spin tube* até ao 4º dia, a determinada densidade celular, ocorre uma limitação no número de células viáveis cultivadas em *spin tubes* o que pode ser causado pelas limitações no arejamento. Uma vez que as condições de agitação dos *spin tubes* já seriam as limite para a incubadora usada e o volume útil utilizado já seria demasiado baixo para esse suporte, não foi possível alterar as mesmas e analisar o seu efeito, no entanto, uma vez que a passagem das células é feita a cada 3-4 dias esse não se revelou um fator limitante.

Visto que o estudo de morte decorre durante 4 dias consecutivos, período no qual a densidade celular é muito semelhante nos dois tipos de cultivos, concluiu-se que seria adequado realizar esse

estudo em *spin tube* permitindo a redução dos recursos utilizados, ao diminuir o volume de meio e a quantidade de antibióticos necessários, evidenciando-se como um método suficientemente reprodutível e representativo. Na figura seguinte é possível observar-se a diferença entre o uso de *shake flask* e *spin tubes*, nos quais o volume útil para estes estudos é de cerca 30% e 10% do volume total respetivamente o que representa uma poupança de cerca 25ml de meio em cada ensaio realizado.

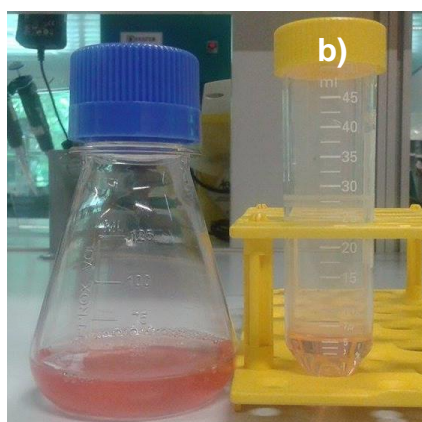


Figura 3.2 – Suportes utilizados durante o estudo de crescimento celular. a) *Shake flask* com um volume total de 125 ml e 30 ml de volume útil. b) *Spin tube* com um volume total de 50 ml e 5 ml de volume útil.

3.4.2 Determinação da concentração ótima de antibiótico a usar na fase de expressão

A realização de estudos de morte tem como finalidade a determinação de qual a melhor concentração de antibiótico a utilizar durante a pressão seletiva de forma a favorecer a sobrevivência das células adequadamente co-transfectadas e induzindo a morte daquelas que não foram transfectadas. Esta pressão estimula apenas a sobrevivência das células que integraram corretamente ambos os plasmídeos no seu genoma e como resultado a expressão estável do seu conteúdo no qual se encontra o gene de interesse e aquele que confere a resistência ao antibiótico.

Os estudos de curva de morte foram realizados com dois antibióticos, a zeocina e a neomicina. A concentração de zeocina a utilizar em selecção de células animais varia entre os 50 aos 1000 $\mu\text{g/ml}$ dependendo da linha celular em causa. Neste projeto, as concentrações de zeocina estudadas para pressão seletiva foram 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ (Invitrogen 2012). Por sua vez, a concentração de neomicina a usar na fase de selecção oscila em torno dos 50 $\mu\text{g/ml}$ (OpenWetWare 2007) tendo os estudos sido realizados com as concentrações de 20, 30, 40, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$.

3.4.2.1 Zeocina

O antibiótico zeocina foi testado em ambas as linhas celulares a quatro concentrações distintas de forma a observar o seu efeito sobre as células.

O estudo foi realizado durante quatro dias consecutivos, nos quais a viabilidade e concentração celular foram obtidos. Foi também realizado um controlo negativo, sem adição de antibiótico, de forma a observar o comportamento das células na ausência do mesmo.

Para determinar a concentração de zeocina óptima a usar durante o processo de selecção foi determinada a cinética de morte celular na presença de zeocina no meio. Através da equação 3.2, a taxa específica de morte celular foi calculada, k_d em h^{-1} , para cada uma das concentrações de antibiótico estudadas, atendendo à concentração de células viáveis presentes num instante t após o início da exposição da população celular ao agente letal, C_t , e à concentração de células viáveis presentes no início da morte exponencial, C_0 . A taxa de morte é dada pelo declive da reta exponencial que ajusta aos pontos obtidos para cada uma das concentrações.

$$C_t = C_0 \times e^{-k_d(t-t_0)} \tag{3.2}$$

Na tabela II.1 e II.2 em anexo, encontram-se os declives calculados para cada uma das concentrações de zeocina usadas nas diferentes linhas celulares, os quais correspondem à taxa específica de morte. Pela representação gráfica desses valores em função do tempo, obteve-se a figura 3.3.

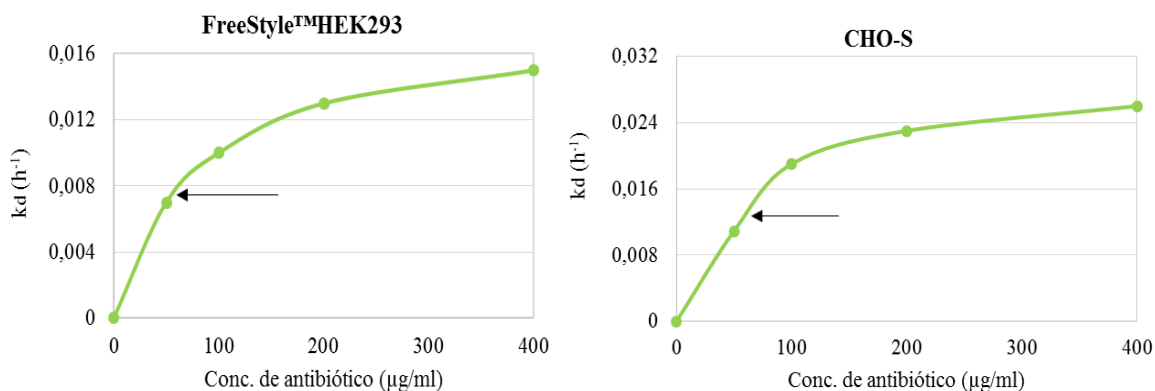


Figura 3.3 – Representação gráfica da taxa específica de morte em função da concentração de antibiótico utilizada ($\mu g/ml$) nas linhas celulares FreeStyle™HEK293 e CHO-S.

Admitindo que no processo de selecção de células, e de acordo com informação dada pela Biotecnol, a concentração de antibiótico a usar deve corresponder a 50% do máximo da taxa de morte observada pelo antibiótico em estudo, pela análise da figura 3.3, e de acordo com esse critério, a taxa de morte para as células HEK293F equivale a cerca de $0,0075 \text{ h}^{-1}$ o que corresponde a uma concentração de zeocina a usar entre 50 a $100 \mu\text{g/ml}$. Para as células CHO-S e seguindo o raciocínio anterior, a taxa de morte correspondente a 50% do máximo é de $0,013 \text{ h}^{-1}$, valor que se encontra também entre 50 a $100 \mu\text{g/ml}$. Na selecção da concentração de antibiótico mais adequada a usar é necessário ter em conta, o facto de que quando co-transfectadas, as células encontram-se especialmente fragilizadas o que acentua o efeito devastador da adição de antibiótico. Assim, para assegurar que a concentração de antibiótico usada não é demasiado alta, provocando morte excessiva durante a pressão seletiva, decidiu usar-se durante o processo de selecção, o antibiótico zeocina a $50 \mu\text{g/ml}$.

3.4.2.2 Neomicina

O estudo da neomicina foi também realizado para ambas as linhas celulares mas ao contrário da zeocina, a determinação da concentração de antibiótico a usar não foi realizada com base na taxa de morte celular mas sim na diferença entre a taxa de crescimento celular na presença e ausência de antibiótico. A diferença de comportamento das células na presença de neomicina e zeocina pode ser justificada pelo mecanismo de acção de cada um dos antibióticos. Enquanto a zeocina se liga à dupla-hélice de DNA e provoca a sua conseqüente clivagem, causando a morte das células, a neomicina promove uma inibição na síntese proteica, tornando o crescimento celular mais limitado. De forma a determinar qual a concentração de antibiótico adequada a usar durante a pressão seletiva, foi estudada a cinética de inibição de crescimento celular na presença de neomicina, através da comparação do crescimento celular na presença e ausência de antibiótico. Neste caso também o estudo foi realizado durante 4 dias nos quais foi realizada uma contagem diária da concentração celular e respetiva viabilidade.

Ao analisar os resultados, verificou-se que a presença de neomicina não impediu o crescimento celular tendo provocado o seu abrandamento comparativamente ao controlo negativo.

Sabendo a taxa específica de crescimento da linha celular na presença de cada uma das concentrações de antibiótico, recorreu-se à equação 3.3 para determinar a taxa de inibição de crescimento que trata a relação entre o crescimento na ausência, μ_0 , e presença de antibiótico a determinada concentração de antibiótico, μ_n , em h^{-1} .

$$\frac{\mu_0 - \mu_n}{\mu_0} \times 100\% = \text{taxa de inibição do crescimento} \quad (3.3)$$

Para aferir qual a concentração de antibiótico a usar durante a pressão seletiva das células parâmetros como a taxa específica de crescimento e de inibição de crescimento foram calculadas e encontram-se descritas na tabela II.3 e II.4 no anexo II, tendo dado origem à figura 3.4 que representa a concentração de neomicina em função da taxa de inibição de crescimento.

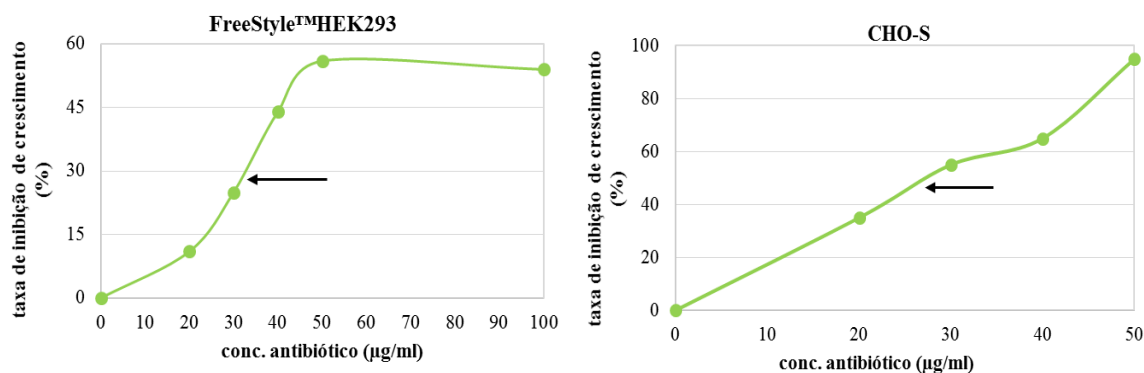


Figura 3.4 – Representação gráfica da relação entre a concentração de antibiótico utilizada (µg/ml) com a taxa de inibição de crescimento em percentagem para as células FreeStyle™HEK293 e CHO-S.

Admitindo que a concentração óptima de antibiótico deve inibir 50% do crescimento celular e analisando o gráfico referente às células HEK293F conclui-se que a concentração a usar deve ser entre 30 a 40 µg/ml. Pela figura 3.4 é a concentração de 30 µg/ml a mais indicada a usar mas sendo desconhecido o efeito da zeocina juntamente com a neomicina na actividade celular e sendo as células humanas extremamente sensíveis, a administração de ambos pode ter um efeito indesejado, levando à conseqüente morte celular. Assim de forma a assegurar a sobrevivência celular concluiu-se que a concentração de neomicina a usar na fase de pressão seletiva é de 20 µg/ml.

No caso das células CHO-S, a curva não estabiliza para um determinado valor pois a uma concentração superior a 40 µg/ml ocorre uma inibição total do crescimento. Assim, teoricamente o máximo de concentração de neomicina que as células CHO-S suportam é 40 µg/ml e portanto a concentração seleccionada para o processo de selecção de células transfectadas foi de 20 µg/ml.

3.4.3 Transfecção e selecção das *pools* de células

Nos estudos de transfecção ambas as linhas celulares foram co-transfectadas com dois vetores, um contendo o gene para expressão da cadeia leve do Fab e uma das *scFv(5T4)* com um marcador de

resistência à zeocina, e outro contendo o gene para expressão da cadeia pesada do Fab (fragmento Fd) e outra das *scFv(OKT3)* com marcador de resistência à neomicina. Diferentes proporções dos dois vetores foram utilizadas durante a co-transfecção, de forma a avaliar a influência do aumento ou diminuição de cópias de cadeia leve na formação de agregados e consequentemente TribodyTM5. Os rácios utilizados foram 50L:50H, 25L:75H, 75L:25H e 10L:90H, em que L representa a cadeia leve e H a cadeia pesada.

No primeiro ensaio realizado, as células HEK293F foram co-transfectadas em suspensão, e as células CHO-S foram co-transfectadas em suspensão e aderência. Após o processo de transfecção, deu-se início ao processo de selecção onde as concentrações de antibiótico definidas anteriormente foram adicionadas às culturas (50 µg/ml de zeocina e 20 µg/ml de neomicina) do qual apenas as células CHO-S em suspensão sobreviveram. Ainda assim, essas concentrações de antibióticos mostraram-se pouco eficientes na selecção das células CHO-S cultivadas em suspensão, não se observando uma diminuição suficientemente satisfatória na viabilidade celular nos primeiros dias. Assim, para melhorar o processo de selecção celular e com base em resultados e protocolos internos da Biotecnol, a concentração de zeocina foi elevada para os 100 µg/ml a qual permitiu ao fim de alguns dias seleccionar as 4 *pools* de células CHO-S obtidas. O comportamento das células CHO-S em suspensão e sob pressão seletiva encontra-se descrito na figura 3.5.

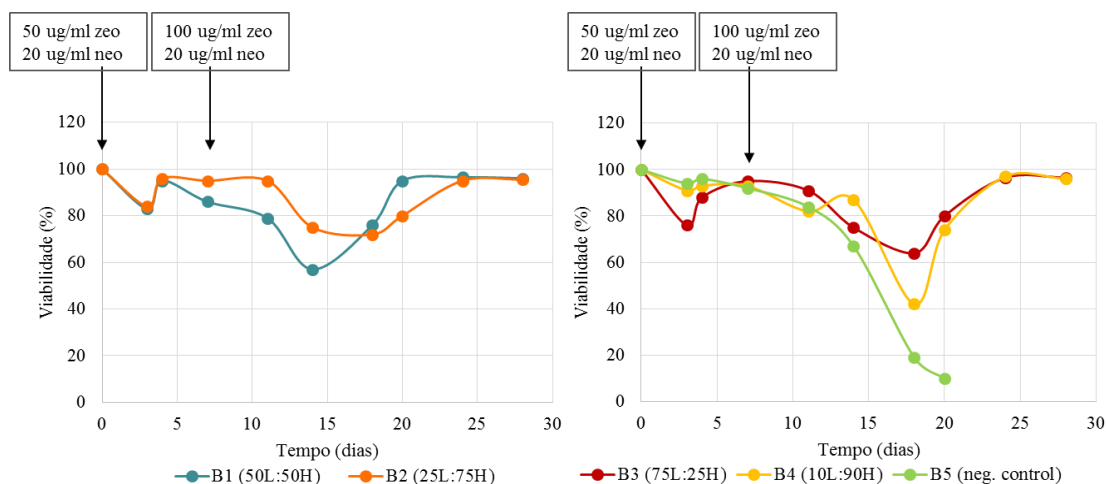


Figura 3.5 – representação da morte celular ao longo do tempo e influência das concentrações de zeocina e neomicina utilizadas na selecção das células CHO-S corretamente transfectadas. A curva a verde representa o controlo negativo (células não-transfectadas).

Observa-se na figura que o abalo provocado nas células aquando da adição das concentrações de antibiótico determinadas pelos estudos de morte é pouco significativo. É possível também concluir que essas concentrações não são suficientes para o processo de selecção pois o controlo negativo,

que não contem qualquer resistência a antibiótico, continua com uma viabilidade de cerca 90% após 7 dias. Com o aumento da concentração de zeocina verificou-se uma diminuição da viabilidade celular mais acentuada e a morte do controlo negativo o que permite concluir que essa é a concentração de zeocina mais adequada a usar.

De forma a compreender a razão da morte das células HEK293F, foram consideradas diferentes hipóteses para tal acontecimento: i) as concentrações de antibiótico usadas são demasiado altas; ii) o tipo de cultivo, suspensão ou aderência, influência a sobrevivência; iii) o antibiótico neomicina não é adequado para células animais; iv) o plasmídeo com o gene de resistência *Neo* não é totalmente eficaz ou pode não ter integrado corretamente no genoma.

Para compreender qual das hipóteses anteriores foi a causa da morte celular foi realizado um segundo ensaio, no qual a concentração de antibióticos foi reduzida para a metade e uma transfecção adicional foi realizada com uso de dois vetores de expressão ambos com resistência à zeocina.

As células HEK293F e CHO-S, após co-transfectadas foram cultivadas em *shake flask* e em *T-Flask* respetivamente, sob pressão seletiva com 25 µg/ml de zeocina e 10 µg/ml de neomicina. Para assegurar a existência de material proteico no fim do ensaio, parte das células foram cultivadas transientemente durante 7 dias.

Apesar de se esperar a sobrevivência celular neste ensaio, as células expostas aos agentes de selecção morreram novamente o que indica que tal não se deve à concentração de antibiótico usada pois neste caso foi menor ao determinado ou indicado na literatura. Visto que as células transfectadas com os vetores com marcador de resistência à zeocina e expostos apenas a esse agente de selecção também perderam viabilidade, pode concluir-se que a utilização do gene *Neo* ou do antibiótico neomicina não influenciaram a morte celular. Concluiu-se assim que o motivo mais provável para a morte das células HEK293F terá sido o protocolo utilizado, indicado para transfecção transiente e não para transfecção estável, em que fatores como tempos de incubação e quantidade de DNA utilizada, poderão não ter sido os mais indicados a utilizar tendo em conta os antibióticos, tipos celulares e vetores usados. Quanto às células CHO-S em aderência, não foi possível concluir qual a causa para tal acontecimento uma vez que o protocolo utilizado foi especialmente concebido e otimizado para criação de uma linha celular estável em aderência.

Em suma, no final dos ensaios, obtiveram-se 4 *pools* de células CHO-S estavelmente transfectadas, as quais permitiram a produção de material de forma estável por CHO-S. Esse material foi obtido por cultivo em *shake flask* durante 10 a 14 dias num processo em fed-batch de modo a avaliar-se posteriormente a quantidade e qualidade de Tribody™5 produzido. Por outro lado, o material produzido transientemente por ambas as linhas celulares, foi obtido após 7 dias de cultivo pós-

transfecção através da fracção de sobrenadante das culturas transientes, contendo a proteína desejada.

3.4.4 Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação e caracterização do Tribody™5 produzido

3.4.4.1 ELISA

O método ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) permite detectar e quantificar proteínas presentes numa mistura complexa, de forma simples, sensível e robusta (Rulker *et al.* 2010). Baseia-se na interacção antigénio-anticorpo e a detecção da presença ou ausência do produto é feita pela interpretação de um sinal mensurável obtido por intermédio de reacções enzimáticas.

Um dos maiores problemas na detecção de Tribody™ é a formação de agregados de cadeia leve, que na grande maioria das vezes são detectados em conjunto devido a terem o mesmo peso molecular, podendo influenciar de forma indesejada a seleção das *pools* ou clones mais produtivos. A utilização do anticorpo de detecção, *anti-kappa light chain* nos estudos de ELISA, mostrou sérias desvantagens, pois uma vez que a sua afinidade é para a cadeia leve, todas as biomoléculas constituídas por ela são detectadas, dando origem a uma falsa interpretação dos resultados.

O desenvolvimento deste método teve por objetivo a avaliação quantitativa do produto obtido permitindo identificar a *pool* de células mais produtiva e pretende ser utilizado como um método de avaliação inicial. Adicionalmente, uma das grandes vantagens a ele associadas é a capacidade de análise e quantificação de amostras provenientes diretamente do meio sem necessidade de purificação prévia.

Neste ELISA utilizou-se um antigénio específico, a proteína 5T4 presente na membrana de células tumorais, o qual permite a ligação de todas as biomoléculas constituídas por pelo menos uma cadeia leve, na qual se localiza o epítopo 5T4. Foram adicionados aos poços amostras de cadeia leve e Tribody™5 a concentrações conhecidas, provenientes de um fed-batch A purificado. Em seguida, foram utilizados três anticorpos de detecção distintos, o *anti-kappa light chain*, que tem afinidade para a cadeia leve, o *anti-Fab*, do qual não é conhecida a cadeia para a qual tem afinidade e o *anti-Fd* que possui afinidade para a cadeia pesada do Fab. Após incubadas, foi possível detectar um sinal mensurável nos poços das placas através da reacção de um substrato específico com a enzima fosfatase alcalina que permitiram posteriormente comparar as concentrações obtidas pelo ensaio

imunoenzimático com as concentrações estimadas por cromatografia catiónica. A figura 3.6 a seguir esquematiza o ELISA realizado e os resultados obtidos estão descritos na figura 3.7.

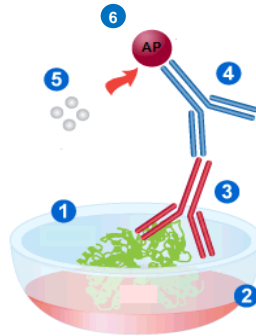


Figura 3.6 – Representação esquemática de um ELISA indireto. 1) o antígeno é adicionado ao poço. 2) um tampão de bloqueio preenche os espaços que não foram cobertos por antígenos. 3) o anticorpo primário (Tribody™5) presente no meio de cultura liga-se ao antígeno. 4) um anticorpo secundário conjugado com a enzima fosfatase alcalina (6) reconhece e liga-se ao anticorpo primário. 5) o substrato é adicionado promovendo a formação de cor e de um sinal mensurável.

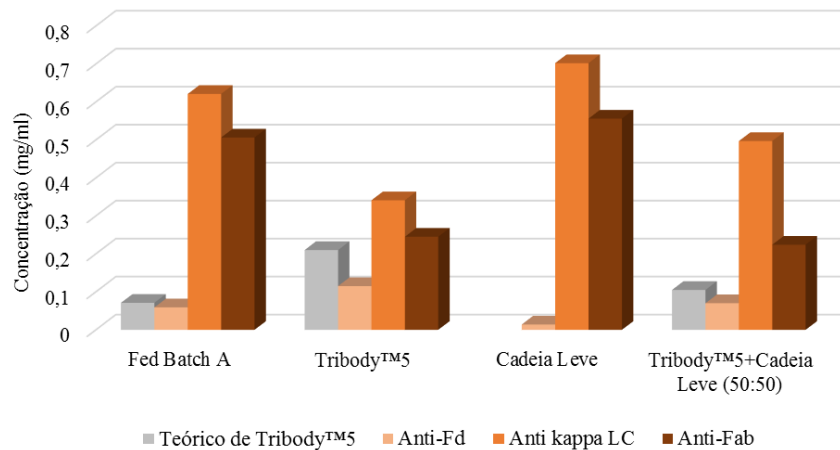


Figura 3.7 – Concentrações obtidas pelo ensaio de ELISA, com diferentes amostras e anticorpos de detecção. Fed-batch A (FB A): concentração de Tribody™5 presente no fed-batch A; Tribody™5: concentração de Tribody™5 purificado do FB A; Cadeia leve: concentração de cadeia leve purificada de FB A; Tribody™5+Cadeia leve: concentração de uma mistura de Tribody™5 e cadeia leve (50:50), ambas purificadas de FB A. A cinzento apresentam-se os valores de concentração teórica de Tribody™5 estimadas por cromatografia.

Pela análise da figura e analisando o comportamento do anticorpo *anti-kappa LC* (barra laranja) é possível constatar que para além de detectar o Tribody™5, este anticorpo detecta também as biomoléculas constituídas por cadeia leve. Este facto é notório na amostra do fed-batch A onde a

concentração de proteína detectada é muito mais elevada do que a concentração teórica de Tribody^{TM5} presente. Adicionalmente, é também evidente nas restantes amostras que as concentrações estimadas de Tribody^{TM5} (barras a cinza) são sempre inferiores àquelas obtidas na presença do anticorpo de detecção *anti-kappa LC*. Tais observações, permitem desde já concluir que este anticorpo não é indicado para quantificar o Tribody^{TM5} produzido uma vez que o mesmo tem afinidade para outras biomoléculas. Quanto ao anticorpo *anti-Fab* (barra laranja-escura), no começo do ensaio, desconhecia-se em qual das cadeias do fragmento Fab o mesmo se ligaria. Após analisados os resultados concluiu-se que o *anti-Fab* liga à cadeia leve do Fab ou seja, ao Tribody^{TM5} e aos dímeros/multímeros de cadeia leve presentes no meio. Esta conclusão é suportada pelos resultados evidenciados na figura 3.7 na qual se observa um comportamento muito semelhante entre o anticorpo *anti-Fab* e o *anti-kappa LC*. Uma vez que as concentrações detectadas por esse anticorpo são sempre mais elevada que as estimadas para os constituintes do fed-batch A, conclui-se que este não é um anticorpo adequado para quantificar o Tribody^{TM5}.

Finalmente, pela análise dos resultados obtidos com a utilização de *anti-Fd* (barra laranja-clara) como anticorpo de detecção, verifica-se que esse detectou uma concentração de Tribody^{TM5} no fed-batch A muito semelhante à concentração teórica determinada por cromatografia. Adicionalmente, a concentração de cadeia leve por ele detectada é praticamente nula o que suporta o facto de este anticorpo se ligar apenas à cadeia pesada do fragmento Fab. Observando os resultados obtidos para o Tribody^{TM5} e para o Tribody^{TM5}+Cadeia leve é visível que esses são também muito semelhantes à concentração estimada de proteína desejada correspondente. Tais evidências, permitem assim concluir que o *anti-Fd* é o anticorpo de detecção mais adequado para quantificar de forma correta o Tribody^{TM5} presente no meio de cultura das diferentes *pools* ou o produzido pelos clones provenientes de diluição limitante.

Com a escolha do anticorpo de detecção mais adequado a usar neste método tornou-se possível quantificar as diferentes amostras proveniente do processo de transfecção e seleccionar os parâmetros que favorecem a produção de maior quantidade de Tribody^{TM5}.

As amostras provenientes das transfecções transientes de HEK293F e CHO-S e as amostras resultantes das quatro *pools* de células CHO-S estavelmente transfectadas foram analisadas por ELISA. A análise foi realizada em triplicado em diferentes alturas e de acordo com a curva padrão correspondente a cada um dos ensaios. Na figura 3.8, a seguir, estão descritas as concentrações em Tribody^{TM5} presentes nas diferentes *pools* de células provenientes dos dois métodos de transfecção realizados a diferentes rácios de cadeia leve e pesada.

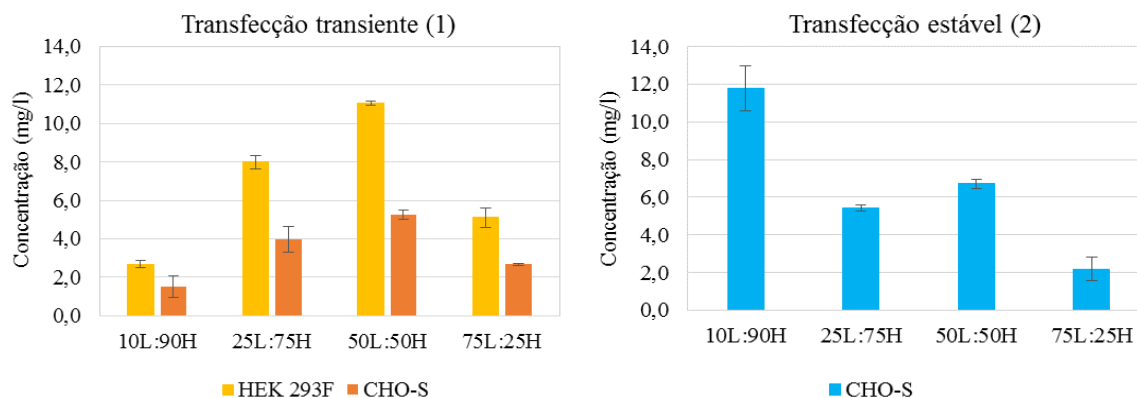


Figura 3.8 – Representação gráfica da concentração de Tribody™5 atendendo ao rácio de cadeia leve e pesada transfectada. (1) concentração presente nas culturas transitentes de HEK293F e CHO-S; (2) concentração presente nas culturas estáveis de CHO-S.

Pela análise dos gráficos anteriores, e analisando os resultados obtidos nas transfecções transitentes é possível concluir que independentemente do rácio de vetores de expressão transfectados as células FreeStyle™HEK293 produzem uma concentração mais elevada de proteína-alvo comparativamente às CHO-S. Quanto aos rácios estudados, aqueles que permitem obter uma concentração mais elevada de Tribody™5 são o de 50L:50H seguido de 25L:75H.

Segundo Schlatter *et al.* 2005, a grande maioria dos sistemas de expressão para proteínas recombinantes utilizam uma proporção equimolar de cadeia leve e pesada codificada por um ou dois plasmídeos. No entanto, não existem evidências de que esse é o rácio óptimo para produção de proteínas recombinantes de forma transitente ou estável.

No artigo publicado por Schlatter *et al.* 2005, é realizado um estudo utilizando uma linha celular de CHO a qual é transfectada com dois plasmídeos a diferentes rácios com o objetivo de compreender qual a proporção óptima para produzir um determinado anticorpo. Os resultados obtidos indicaram que as proporções que permitem maior produção do anticorpo em estado transitente e em células CHO são o de 40L:60H seguido de 50L:50H. Estas proporções são muito semelhantes às obtidas neste trabalho, no entanto, para uma maior proximidade dos resultados teóricos aos revelados no artigo poderiam ser futuramente estudados mais rácios dentro do intervalo de 25L:75H e 50L:50H. Ainda assim, os resultados obtidos da análise das amostras por ELISA presentes na figura 3.8(1) vão de encontro aos descritos na literatura.

Quanto à transfecção estável realizada em CHO-S o rácio de plasmídeos que se mostrou mais eficiente permitindo uma produção mais elevada de Tribody™5 foi o de 10L:90H seguido de 50L:50H. Como referido anteriormente, este ensaio foi realizado com o intuito de estudar e

compreender a influência do número de cópias de cadeia leve presentes na célula na formação de Tribody^{TM5} e respetivos agregados. Assim, ao aumentar-se o número de cópias de cadeia pesada face à cadeia leve poderia reduzir-se a quantidade de moléculas de cadeia leve excretadas para o meio de cultura. Uma vez que a cinética de produção de cadeia leve e pesada é desconhecida e que apenas a cadeia leve é excretada para o meio de cultura e quantificada, este estudo pretendia minimizar a quantidade de cadeia leve livre e consequentemente aumentar a proporção de Tribody^{TM5} produzida. Para tal, teve-se como objectivo apurar se o aumento do número de cópias de cadeia pesada face à cadeia leve levaria ao aumento da produção de Tribody^{TM5} a qual poderia estar limitada pela cinética de síntese da cadeia pesada. Verificou-se que o aumento da proporção do vetor que codifica para a cadeia pesada face ao vetor da cadeia leve levou ao aumento da concentração de Tribody^{TM5} sendo que a sua produção com um rácio de 10L:90H duplicou quando comparado com o produzido a um rácio de 50L:50H, rotineiramente utilizado em processos de transfecção. Este resultado, mostra que na transfecção estável a cadeia pesada era limitante o que consequentemente provocaria uma limitação na formação de Tribody^{TM5}. Ao aumentar o número de cópias da cadeia pesada aumentou-se a proporção de Tribody^{TM5} produzido e diminuiu-se a probabilidade da cadeia leve sair livre para o meio.

3.4.4.2 Cromatografia de afinidade por proteína L

A cromatografia líquida de alta eficiência, a pressões elevadas, permite o uso de partículas de pequeno diâmetro na fase estacionária, possibilitando uma separação eficiente dos diferentes componentes da amostra. Este tipo de separação, propícia o uso de colunas menores, volumes de amostra na gama dos µl, menos gastos de fase móvel e ainda uma análise mais rápida num curto espaço de tempo. Para a captura da proteína desejada, através do método de HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*), recorreu-se ao uso de uma coluna de afinidade com proteína L, a qual interage com uma porção específica do anticorpo, a cadeia leve, ou seja, para além do anticorpo desejado também os dímeros/multímeros de cadeia leve têm afinidade com a resina.

Durante o desenvolvimento deste método foram testados diferentes tampões de equilíbrio e eluição, de forma a compreender qual a combinação de ambos mais adequada para separar a proteína com o maior rendimento possível. Três dos tampões eram já indicados pelo fornecedor da coluna, entre os quais, o tampão de equilíbrio 0,05M fosfato com 0,15M NaCl a pH7, e os tampões de eluição 0,1% HCl com 0,15M NaCl e 0,1M Glicina a pH2. Os restantes, foram definidos tendo em conta os seguintes parâmetros descritos no manual da coluna: i) o tampão de equilíbrio deveria ter um pH entre 6 a 8, concentração de NaCl entre 0,1 e 0,2M e 10 a 50mM de tampão fosfato ou tris; ii) o

tampão de eluição deveria ter um pH entre 2 a 3,5, concentração de fosfato, glicina, ácido acético ou HCl de 2 a 100mM e cerca de 150mM de cloreto de sódio.

Atendendo a essas especificações, o tampão de equilíbrio 0,05M fosfato com 0,15M NaCl a pH7, foi testado com os tampões de eluição inicialmente referidos e adicionalmente com 0,1M de ácido acético e 0,1M fosfato com 0,15M NaCl a pH2. Assim, foi possível observar o comportamento dos diferentes tampões de eluição à mesma concentração e a pH semelhante (1 a 2) sendo que alguns continham também sal. Após testadas as várias combinações, foram analisados os respectivos cromatogramas representados na figura seguinte tendo-se em consideração a altura e simetria do pico, normalmente definidas pelo tampão de eluição, na seleção da combinação mais adequada.

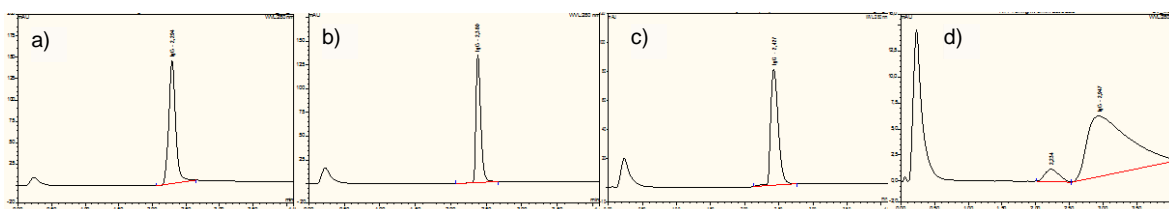


Figura 3.9 – Cromatogramas obtidos após análise da combinação do tampão de equilíbrio 0,1M de fosfato com 0,15M NaCl a pH7 com os respectivos tampões de eluição numa coluna com proteína L. a) 0,1% HCl com 0,15M NaCl; b) 0,1M fosfato com 0,15M NaCl a pH2; c) 0,1M glicina a pH2; d) 0,1M ácido acético.

Comparando os quatro cromatogramas verifica-se que as representações a) e d) originaram picos relativamente largos ou assimétricos e o pico c) revelou uma linha de base um pouco instável o que não é desejável uma vez que estes comportamentos podem dar origem a dificuldades na quantificação, perda de resolução cromatográfica, ou ainda dificuldade no reconhecimento da separação. Considerando-se o pico b), o melhor entre os anteriores, e de forma a testar tampões que seguissem as especificações indicadas pelo fornecedor, realizou-se um segundo ensaio no qual se usou o mesmo tampão de equilíbrio e o tampão de eluição 0,1M fosfato com 0,15M NaCl alterando-se o seu pH para 3,5.

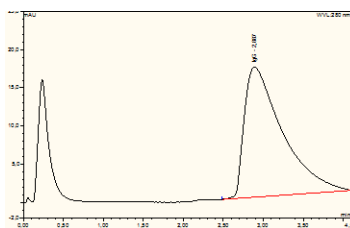


Figura 3.10 – Cromatograma resultante da combinação do tampão de equilíbrio 0,1M fosfato com 0,15M NaCl a pH7 e do tampão de eluição 0,1M fosfato com 0,15M NaCl a pH3,5.

Analisando o pico da figura 3.10 e tendo em conta o que foi referido acima, este tampão de eluição não é adequado para ser utilizado neste método pois origina um pico assimétrico e largo. Obtidos estes resultados, conclui-se que o tampão de eluição mais adequado para ser usado neste método é o 0,1M fosfato com 0,15M NaCl a pH2.

Depois de selecionado o tampão de eluição, fez-se variar o tampão de equilíbrio, responsável por manter a proteína estável no interior da coluna e não interferir com a sua eluição. Uma vez que o tampão fosfato se mostrou eficaz no teste anterior, e atendendo às indicações dadas pelo fornecedor definiram-se os seguintes tampões de equilíbrio, 0,05M fosfato com 0,15M NaCl a pH8, 0,02M fosfato com 0,15M NaCl a pH7 e tampão Tris a 0,05M com 0,15M NaCl a pH8. Os cromatogramas obtidos pela combinação dos tampões de equilíbrio referidos acima e o tampão de eluição encontram-se na figura 3.11.

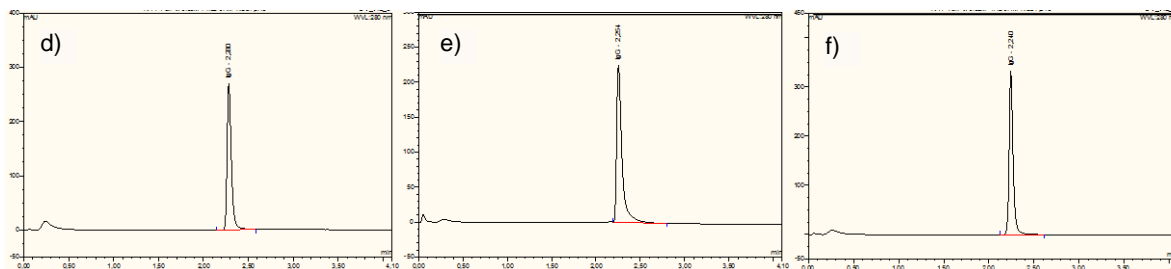


Figura 3.11 – Cromatogramas obtidos pela combinação de diferentes tampões de equilíbrio com o tampão de eluição 0,1M fosfato com 0,15M NaCl a pH2. d) 0,05M fosfato com 0,15M NaCl a pH8; e) 0,02M fosfato com 0,15M NaCl a pH 7; f) Tris com 0,05M NaCl a pH8.

Ao examinar os cromatogramas acima representados é visível que em relação aos restantes, o pico e) apresenta uma pequena cauda, no entanto, todos eles inclusivé o pico b) da figura 3.9 evidenciam uma estrutura estreita e simétrica tendendo a um perfil gaussiano. Para selecionar entre esses qual o melhor a ser usado neste método, teve-se em conta a altura do pico e a estabilidade da sua linha de base. Visto que a indicação do fornecedor para o tampão de equilíbrio foi o 0,05M fosfato com 0,15M NaCl a pH7 e a diferença entre os picos não é significativa, concluiu-se que os tampões mais adequados a usar são o tampão de eluição 0,1M fosfato com 0,15M NaCl a pH2 e o tampão de equilíbrio 0,05M fosfato com 0,15M NaCl a pH7.

Em seguida, amostras de Tribody™5 caracterizado a diferentes concentrações foram injetadas no cromatógrafo do qual se obtiveram diferentes picos com determinada área. Para cada concentração a análise foi realizada em triplicado garantindo a reprodutibilidade do método e uma curva de

calibração foi estabelecida pela representação da área do pico em função da concentração da amostra. No anexo III encontra-se a tabela e respetiva curva de calibração obtidas, na qual se evidenciam os valores obtidos para as diferentes concentrações.

Conhecida a equação que representa o ajuste linear dos pontos, tornou-se possível calcular a concentração em proteína total de uma determinada amostra através da área do pico obtido após a sua análise por cromatografia de afinidade por proteína L analítica.

3.4.5 Produção do Tribody^{TM5} a partir das *pools* geradas

As *pools* obtidas após selecção, foram cultivadas em *shake flask* por 12 dias de modo a aferir a quantidade e qualidade de Tribody^{TM5} produzido e qual a mais produtiva. Uma vez que o Tribody^{TM5} produzido é excretado para o meio de cultivo a fracção de sobrenadante foi obtida e analisada recorrendo aos métodos analíticos desenvolvidos anteriormente. Os vários sobrenadantes obtidos das culturas transientes foram também recolhidos e com base na linha celular a que correspondiam foram misturados no intuito de se obter material suficiente para a análise de actividade. Todas as amostras obtidas foram posteriormente purificadas por cromatografia catiónica de modo a calcular a proporção de Tribody^{TM5} face às restantes biomoléculas existentes e analisadas por SDS-PAGE.

3.4.5.1 Análise através dos métodos analíticos desenvolvidos

Após desenvolvimento dos métodos analíticos ELISA e cromatografia de afinidade por proteína L, as amostras resultantes do processo de transfecção/selecção foram analisadas, e a quantidade de Tribody^{TM5} produzido face à quantidade total de proteína presente no sobrenadante foi aferida. Esta análise, permitiu obter uma estimativa inicial de qual a percentagem de Tribody^{TM5} presente em cada amostra e estabelecer um *ranking* inicial.

Na tabela 3.1, a seguir, encontram-se os valores obtidos para as produções em fed-batch (FB) e transiente (TT) por ambos os métodos analíticos. Através do método de ELISA, realizado em duplicado, estimou-se a concentração de Tribody^{TM5} presente na amostra e pelo método de cromatografia de afinidade por proteína L analítica determinou-se a quantidade de proteína total na amostra, a qual corresponde a todas as biomoléculas constituídas por pelo menos uma cadeia leve.

Tabela 3.1 – % de Tribody^{TM5} obtido para as várias amostras após análise pelos métodos analíticos desenvolvidos.

	ELISA 1 (mg/l)	ELISA 2 (mg/l)	Proteína L Anal. (mg/l)	%Tribody ^{TM5}
FB1 (50L:50H)	6,88	6,53	61,5	11%
FB2 (25L:75H)	5,29	5,52	24,1	22-23%
FB3 (75L:25H)	1,75	2,63	75,3	2-4%
FB4 (10L:90H)	10,95	12,61	60,5	18-21%
TT HEK 293F	6,64	6,48	7,89	82-84%
TT CHO-S	4,01	3,97	5,72	69-70%

Por observação destes resultados, e analisando separadamente os obtidos para fed-batch e para transiente, é notório que o FB4 é aquele que produz maior quantidade de Tribody^{TM5} (em média 11,8 mg/l). Neste e no FB2 foram obtidas as maiores proporções de Tribody^{TM5} face à proteína recombinante produzida. Como discutido anteriormente (secção 3.4.4.1) o aumento do número de cópias de cadeia pesada em transfecção estável, potenciou a ligação da cadeia leve e pesada para a produção de Tribody^{TM5} diminuindo-se a quantidade de cópias de cadeia leve a ser excretada da célula.

Por sua vez, entre as culturas de estado transiente, o sistema que produziu maior quantidade de proteína desejada e se mostrou como o mais eficiente foi o TT HEK293F (em média 6,56 mg/l). Este resultado vai de encontro às expectativas iniciais tendo em conta que as células HEK293F são as mais utilizadas em processos de produção em estado transiente (Rajendra *et al.* 2015).

3.4.5.1 Purificação do Tribody^{TM5}

As amostras de sobrenadante, respetivas a cada um dos fed-batch e culturas transientes, foram inicialmente purificadas por cromatografia de afinidade através da sua injeção numa coluna preparativa com proteína L. Após recuperado o material proteico que aderiu à coluna, as fracções nas quais existiria Tribody^{TM5} foram recolhidas e analisadas por cromatografia de exclusão molecular analítica. Visto que esta técnica de purificação não permite determinar a fracção de Tribody^{TM5} apenas, só é possível determinar a % de proteína com 100 kDa entre as quais está contida a proteína-alvo. Os valores obtidos estão descritos na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Resultados obtidos pela análise das fracções recolhidas dos fed-batch e transientes por SEC, após purificação por proteína L preparativa.

	Proteína total (mg/l)	Proteína com 100 kDa (mg/l)	%Proteína com 100 kDa
FB1 (50L:50H)	15,4	2,5	16%
FB2 (25L:75H)	7,6	2,3	30%
FB3 (75L:25H)	21,7	2,8	13%
FB4 (10L:90H)	13,2	6,0	45%
TT HEK 293F	7,6	3,4	45%
TT CHO-S	3,6	1,5	42%

Analisando os resultados, é possível verificar que a quantidade de proteína com um peso molecular de 100 kDa, encontrada na amostra é muito baixa quando comparada com a quantidade de proteína total presente. Além disso, e recordando o que foi referido anteriormente, a quantidade de proteína com 100 kDa indicada na tabela pode não ser na sua totalidade Tribody™5, uma vez que existem outras moléculas que podem igualmente exibir esse peso molecular como é o caso dos dímeros de cadeia leve os quais também possuem afinidade para a coluna de proteína L. Comparando também a concentração de proteína total obtida a partir de cromatografia por proteína L analítica e preparativa é evidente que nesta última ocorreu uma perda considerável de material.

Na porção identificada como proteína total para além de estar contida a fracção de moléculas com um peso de 100 kDa, estão também implícitas as biomoléculas com um peso molecular de 50 kDa no qual se incluem as cadeias leves livres e ainda as proteínas com um peso molecular de aproximadamente 200 kDa, correspondente aos agregados de Tribody™5. Dado que o objectivo seria obter a proteína de interesse separada e livre das restantes impurezas, a fracção identificada como sendo uma mistura de proteínas com 100 kDa foi recolhida e submetida a um segundo passo de purificação.

De acordo com os resultados presentes na tabela 3.1 são os FB2 e FB4 que permitem obter um rendimento mais elevado em Tribody™5, sendo o FB4 aquele que detém uma maior concentração de proteína-alvo produzida tendo por isso sido escolhido como a *pool* mais produtiva. Este resultado é concordante com os resultados obtidos após purificação do Tribody™5 descritos na tabela 3.2, no entanto, devido às perdas no processo de purificação o Tribody™5 não foi totalmente recuperado. Por este se tratar de um processo de purificação que ainda não se encontra optimizado obtiveram-se rendimentos de cerca 30%. Apesar disso, a optimização do método não se encontra no

âmbito deste estudo, tendo-se como único objectivo a obtenção de material puro para a realização de um ensaio de atividade.

Após a purificação por proteína L preparativa, ocorreram significativas perdas de material (cerca de 70-80%) como se verifica pela comparação dos resultados em proteína total descritos na tabela 3.1 e 3.2, o que resultou numa fracção de interesse muito baixa para ser injetada numa coluna catiónica preparativa. Assim, houve necessidade de realizar uma concentração do produto e utilizar uma coluna de cromatografia catiónica analítica para a purificação final. Para verificar os efeitos dessa operação unitária na quantidade de proteína-alvo final obtida utilizou-se o FB1 como amostra de teste, tendo-se constatado que este procedimento permite a obtenção de uma amostra pura em quantidade suficiente para a análise de atividade e caracterização final do produto. Este processo foi depois realizado para o FB4 e amostras transientes. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Resultados obtidos pela análise das fracções recolhidas dos fed-batch e transientes por SEC, após purificação por proteína L preparativa e cromatografia catiónica analítica.

	Cromatografia por proteína L preparativa	Cromatografia catiónica analítica	%Tribody TM 5
	Proteína total (mg/l)	Tribody TM 5 (mg/l)	
FB1 (50L:50H)	15,4	1,0	11%
FB4 (10L:90H)	13,2	2,7	21%
TT HEK 293F	7,6	1,3	17%
TT CHO-S	3,6	0,6	18%

Por observação da tabela 3.3, é possível verificar que no caso dos fed-batch os resultados obtidos após o processo de purificação estão de acordo com os resultados obtidos na análise analítica das amostras provenientes do meio de cultura. A utilização de um rácio de 10L:90H comparativamente a um rácio de 50L:50H permitiu aumentar a proporção de TribodyTM5 na quantidade de proteína recuperada por proteína L de 11% para 21% conforme tinha sido previsto pelos métodos analíticos (tabela 3.1). Dessa forma, os resultados obtidos após purificação permitiram validar os métodos analíticos desenvolvidos.

No caso das culturas transientes, a percentagem de TribodyTM5 obtida após a purificação das amostras do meio de cultivo foi inferior à estimada pelos métodos analíticos. Uma vez que as amostras TT HEK293F e TT CHO-S resultam da junção das várias amostras a diferentes rácios de

vetores, a análise de rendimento do processo e comparação com os resultados obtidos nos métodos analíticos não pôde ser efetuada.

3.4.6 Análise do TribodyTM5 purificado por SDS-PAGE

O produto obtido após purificação por cromatografia catiónica foi analisado por SDS-PAGE, uma técnica caracterizada pela aplicação de um campo elétrico que promove a migração das proteínas dependendo da sua dimensão, forma e carga. De tal forma foi possível verificar se as amostras obtidas se tratavam realmente do TribodyTM5. Foi usada uma amostra de TribodyTM5 caracterizado (1 mg/ml) a qual serviu como padrão para as restantes. Na figura 3.12 a seguir, encontra-se representado o gel obtido após ter sido submetido ao ensaio e a respetiva legenda das diferentes bandas.

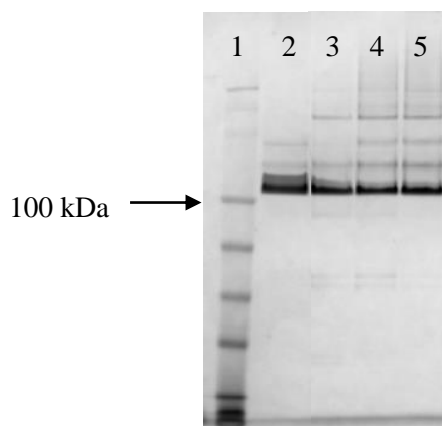


Figura 3.12 – Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). 1) marcador molecular (kDa); 2) amostra de TribodyTM5 humanizado e caracterizado; 3) amostra resultante da purificação do fed-batch 4; 4) amostra purificada da cultura transiente de HEK293F; 5) amostra purificada da cultura transiente de CHO-S.

Nas amostras 3, 4 e 5 é possível observar diferentes bandas nas quais a mais demarcada coincide com o peso de 100 kDa o que indica a presença de TribodyTM5 no material purificado. As restantes bandas menos evidentes e menos coradas indicam a presença de biomoléculas com um peso molecular mais elevado o que pode sugerir a presença de alguns agregados de TribodyTM5 na amostra ou outras impurezas.

3.4.7 Avaliação da eficiência do TribodyTM5 produzido

A citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos trata-se de um mecanismo de defesa mediada por anticorpos específicos, na qual células do sistema imunitário provocam a lise de uma célula-alvo. O TribodyTM5 produzido pelas culturas transientes e pela *pool* selecionada como a mais produtiva e com maior qualidade, foi testado num ensaio citotóxico em que a actividade do TribodyTM5 foi determinada, quando este se encontra numa solução com células-alvo (células tumorais) e células T humanas. Para melhor compreender o impacto da linha celular na actividade da proteína produzida, o valor da concentração à qual o anticorpo induz 50% do seu do efeito máximo (EC50) foi determinada. Na figura 3.13, apresentam-se as diferentes curvas dose-resposta obtidas para as diferentes amostras testadas.

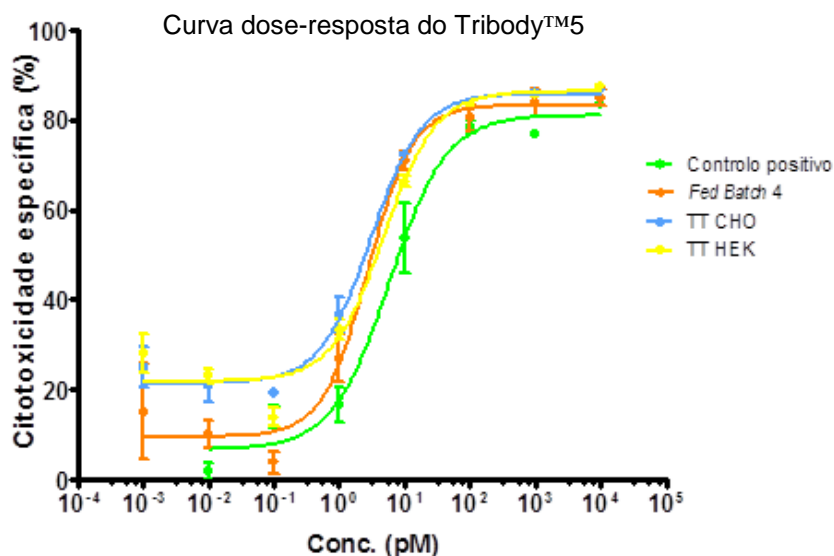


Figura 3.13 – Curva dose-resposta obtida na utilização de TribodyTM5 sobre células-alvo de mesotelioma. Efeito do aumento da concentração do anticorpo sobre a citotoxicidade desse às células-alvo.

Numa primeira avaliação observa-se que em todos os casos, com o aumento da concentração de anticorpo presente no meio de cultura, maior é a sua citotoxicidade específica sobre as células tumorais. Pela análise mais detalhada das curvas, os valores de EC50 obtidos foram de $5,8 \pm 1,5$ pM, $2,7 \pm 0,8$ pM, $3,0 \pm 0,5$ pM e $4,7 \pm 1,2$ pM para o TribodyTM5 (controlo positivo), fed-batch 4, TT CHO e TT HEK respetivamente.

Pela interpretação dos valores anteriores, é a amostra de anticorpo caracterizado (controlo positivo) aquele que detém um valor mais elevado o que indica a necessidade de uma concentração mais

elevada para induzir 50% do seu efeito sobre as células-alvo. Por outro, aquele que possui um valor de EC50 menor é o fed-batch 4 logo a concentração de anticorpo necessária para induzir metade do efeito é menor. Ainda assim, todos os valores se encontram dentro do erro experimental, o que indica que os resultados obtidos foram concordantes e o Tribody™5 mantém a sua actividade anti-tumoral esperada independentemente da linha celular animal utilizada ou transfecção realizada.

4 Conclusões

Através do estudo de morte levado a cabo para ambas as linhas celulares, concluiu-se que as concentrações de zeocina e neomicina mais adequadas a usar durante a pressão seletiva são respetivamente 50 µg/ml e 20 µg/ml. Todavia, após transfectadas e quando sujeitas às concentrações anteriores as células FreeStyleTMHEK293 morreram enquanto as células CHO-S não foram suficientemente seleccionadas tendo-se por isso aumentado a concentração de zeocina para o dobro. No fim do ensaio, as células CHO-S foram transfectadas e seleccionadas correctamente enquanto que para as células HEK293F (e após testadas diferentes hipóteses) se concluiu que o protocolo utilizado não é adequado promovendo a sua morte.

O desenvolvimento de dois métodos analíticos, ELISA e cromatografia de afinidade, permitiu quantificar o TribodyTM5 isoladamente e conjuntamente com agregados de cadeia leve, permitindo determinar a proporção de TribodyTM5 na amostra de proteína recombinante. O desenvolvimento do método de cromatografia de afinidade por proteína L permitiu determinar a melhor combinação de tampões de eluição e equilíbrio a usar neste método e ainda obter uma equação que permite determinar a concentração de biomoléculas constituídas por cadeia leve presentes nas amostras a analisar. Por sua vez, o método de ELISA desenvolvido, por se basear na ligação ao epítopo 5T4 que se encontra na cadeia leve do TribodyTM5 e ser detectado com o anticorpo *Anti-Fd*, o qual detecta a cadeia pesada do fragmento Fab, evita a interferência dos dímeros/multímeros de cadeia leve presentes na amostra. Este método provou ser preciso para quantificar a concentração de TribodyTM5 diretamente de uma amostra de meio de cultivo.

Analisando por ELISA as amostras provenientes das *pools* transfectadas estavelmente e transientemente, verificou-se que a transfecção com diferentes proporções dos vetores altera não só a quantidade total de proteína produzida como a proporção de TribodyTM5. Na *pool* transfectada transientemente a proporção 50L:50H permitiu obter a concentração mais alta de TribodyTM5 em ambas as linhas celulares testadas, 11,0 mg/l no caso das HEK293F e 5,3 mg/l no caso das CHO-S. Por outro lado, a utilização de uma proporção de 10L:90H na transfecção estável das células CHO-S permitiu aumentar em cerca de o dobro a concentração de TribodyTM5 (11,8 mg/l) face à concentração obtida pela proporção de 50L:50H (6,7 mg/l).

A percentagem de TribodyTM5 obtida após purificação dos sobrenadantes resultantes das *pools* estáveis foi igual à estimada pelos métodos analíticos o que valida os métodos desenvolvidos e apesar de terem existido perdas ao longo do processo de purificação essas foram proporcionais na quantidade de TribodyTM5 e de proteína total. O rendimento obtido em TribodyTM5 após purificação

foi de 11% para o FB1 e 21% para o FB4, sendo este último o fed-batch mais produtivo entre os restantes.

Através da análise de actividade do Tribody^{TM5} purificado, verificou-se que independentemente do tipo de transfecção aplicada ou linha celular, a actividade obtida para os anticorpos das diferentes amostras estudadas foi muito semelhante à de uma amostra caracterizada de Tribody^{TM5}.

4.1 Objectivos Realizados

A pesquisa efetuada ao longo deste trabalho permitiu a compilação de diversos conhecimentos, nomeadamente, métodos de transfecção e processo de selecção de células animais, assim como a compreensão da necessidade de avaliação das *pools* numa primeira etapa evitando a escolha e purificação de culturas com baixa produção em Tribody^{TM5}.

Um dos resultados alcançados na realização deste trabalho foi a optimização do formato de cultura durante a realização de estudos de morte e crescimento, através do uso de *spin tubes*, permitindo uma redução de cerca de 80% no volume de meio de cultura necessário e consequentemente da quantidade de antibióticos. A realização deste projeto permitiu também o desenvolvimento de um ELISA de quantificação de Tribody^{TM5} isoladamente e sem a interferência das moléculas de cadeia livre, a partir de amostras diretamente provenientes do meio de cultivo. Este desenvolvimento permitirá à empresa acompanhar o processo de produção e purificação do anticorpo ao longo do tempo, assim como evitará os vários passos de purificação das amostras para quantificar a quantidade de Tribody^{TM5} produzida. Além disso, a quantidade de amostra necessária para o ELISA é mínima o que permitirá a produção de proteína numa escala reduzida. Foi igualmente desenvolvido uma cromatografia de afinidade por proteína L a qual permite à empresa estimar a concentração de biomoléculas constituídas por cadeia leve presentes na amostra de forma a determinar o rendimento em Tribody^{TM5}.

Foi ainda avaliada a actividade da proteína de interesse produzida pelas diferentes linhas celulares animais nos quais o rácio de cadeia leve e pesada eram distintos permitindo assim observar o comportamento da proteína aquando da variação desses parâmetros. O estudo da variação na estequiometria dos plasmídeos usados fornecerá à empresa nova informação sobre qual a melhor proporção de vetores a usar dependendo do tipo de transfecção realizada. Além disso, permitiu verificar que independentemente da linha celular utilizada a proteína manteve a sua actividade.

4.2 Limitações e Trabalho Futuro

Durante este projecto, não foi possível criar uma linha estável em FreeStyleTMHEK293, o que tornou inexecutável realizar qualquer tipo de conclusão acerca da influência do uso dessa linha celular na produção estável de proteína de interesse.

De tal forma, seria de grande interesse variar alguns parâmetros de transfecção e selecção de forma a estudar o efeito desses sobre as células. Propõe-se a mudança dos vetores de expressão, uma vez que os utilizados neste trabalho eram caracterizados por uma estrutura muito simples, bem como a variação da quantidade de DNA e respetivos tempos de incubação usados durante a transfecção de uma linha estável de HEK293F.

A realização de ensaios com diferentes antibióticos, mais específicos e adequados para as linhas celulares animais usadas, seria interessante de forma a observar-se a acção desses agentes nas células visto que o tipo de antibiótico a usar depende da linha celular utilizada e de certa forma os antibióticos usados durante o processo de selecção e respetivas concentrações podem ter estado na origem da morte celular.

Propõe-se também a realização dos ensaios em volumes de meio mais elevados permitindo uma purificação do TribodyTM5 mais eficiente e com menores perdas ou necessidade de concentração do produto.

4.3 Apreciação Final

O trabalho desenvolvido ao longo desta dissertação permitiu adquirir conhecimentos importantes e mais aprofundados quer sobre práticas laboratoriais em específico quer sobre conceitos teóricos essenciais à sua realização.

Quanto ao trabalho desenvolvido em laboratório, a oportunidade de trabalhar em diferentes departamentos, nomeadamente de cultura de células animais, de analítica e ainda de purificação, permitiu a aquisição de conhecimentos práticos e teóricos acerca de cultura de células animais, ensaios analíticos e cromatográficos, que possibilitaram a quantificação e avaliação da pureza e qualidade do produto.

Adicionalmente, e sendo este trabalho inserido na área da biotecnologia, foi possível experienciar num meio empresarial, as tecnologias envolvidas na produção de anticorpos, aplicar conhecimentos e compreender quais as necessidades e contribuições da biotecnologia nos dias de hoje.

Referências

- Agrawal, V., Bal, M. Strategies for rapid production of therapeutic proteins in mammalian cells. *BioProcess International*, **10** (4), 32–48, 2012.
- Al-Dosari, M.S., Gao, X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*, **11** (4), 671–681, 2009.
- Alkan, S.S. Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. *Nature Reviews. Immunology*, **4** (2), 153–156, 2004.
- Amorim, I. *Engenharia Genética*. Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal, 2011.
(<https://nebm.ist.utl.pt/repositorio/download/2425>)
- Anspach, F.B. Affinity Chromatography. In *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods - Part A: Fundamentals and techniques*, 6th edition, E. Heffman (ed.), Elsevier, 2004.
- Balbás, P., Bolívar, F., 1998. Molecular Cloning by Plasmid Vectors. In *Recombinant DNA Principles and Methodologies*, J. Greene, V.B. Rao (eds.), CRC Press, 1998.
- Bioclon. Bioclon - Immunotherapies for Life. 2014. Disponível em:
<http://www.bioclon.com/?tribody-technology> [Acedido em Março de 2015].
- Brooks, S. Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system. *Molecular biotechnology*, **28** (3), 241–255, 2004.
- Brown, T.A. The basic principles of gene cloning and DNA analysis. In *Gene Cloning and DNA Analysis: An introduction*. Wiley-Blackwell, 2010.
- Butler, M., Spearman, M. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, **30**, 107–112, 2014.
- Câmara, H. Terapia génica viral. 2014. Disponível em:
<http://www.portaleducacao.com.br/biologia/artigos/56297/terapia-genica-viral> [Acedido em Março de 2015].

- Carson, S., Robertson, D. Manipulation of DNA. In *Manipulation and expression of recombinant DNA: a laboratory manual*. Academic Press, 2005.
- Castoldi, R. *Generation and characterization of multi-specific antibodies for therapeutic applications in oncology*. Tese de doutoramento, Ludwig Maximilians Universidade de Munique, Munique, Alemanha, 2014.
- Cevher, E., Sezer, A., Çağlar, E. Gene delivery systems: Recent progress in viral and non-viral therapy. In *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, A.D. Sezer (Ed.), Intech, 2012.
- Chadd, H.E., Chamow, S.M. Therapeutic antibody expression technology. *Current Opinion in Biotechnology*, **12** (2), 188–194, 2001.
- Chedrese, P. Recombinant DNA technology. In *Reproductive Endocrinology: A Molecular Approach*. P.J. Chedrese (Ed.), Springer Science & Business, New York, 2009.
- Chernajovsky, Y., Nissim, A. Historical Development of Monoclonal Antibody Therapeutics. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Y. Chernajovsky & A. Nissim, (eds.), Springer Science & Business, New York, 2008.
- Costa, R. *et al.* Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **74** (2), 127–138, 2010.
- Costa, S. *et al.* Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology*, **5** (63), 1–20, 2014.
- Creative Biolabs. Fab-scFv Fusion Protein (Tribody). 2015. Disponível em: <http://www.creative-biolabs.com/Fab-scFv-Fusion-Protein-Tribody.html> [Acedido em Março de 2015].
- Cromwell, M.E.M., Hilario, E., Jacobson, F. Protein aggregation and bioprocessing. *The AAPS Journal*, **8** (3), 572–579, 2006.
- Day, M.J., Schultz, R.D. Antigens and Antibodies. In *Veterinary Immunology: Principles and Practice*. CRC Press, Flórida, 2014.
- DrugBank. Neomycin. 2005. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00994> [Acedido em Abril de 2015].

- Dyck, M.K. *et al.* Making recombinant proteins in animals - Different systems, different applications. *Trends in Biotechnology*, **21** (9), 394–399, 2003.
- Ehrenfeld, G.M. *et al.* Copper-dependent cleavage of DNA by bleomycin. *Biochemistry*, **26** (3), 931–942, 1987.
- Felgner, P.L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84** (21), 7413–7417, 1987.
- Firidin, S. Recombinant DNA technology. *YUNUS Research Bulletin*, **10** (4), 16–19, 2010.
- Fischer, D. *et al.* A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharmaceutical research*, **16** (8), 1273–1279, 1999.
- Garcia, E.S., Chamas, C.I. Genética molecular: avanços e problemas. *Cadernos de Saúde Pública*, **12** (1), 103–107, 1996.
- GE Healthcare. Antibody Purification Handbook. 1–171, 2015.
- Geigert, J. Complexity of Biologic CMC Regulation. In *The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and Other Biologics*. Springer Science & Business Media, New York, 2013.
- Ghaderi, D. *et al.* Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **28** (1), 147–175, 2012.
- Goldsby, R.A. *et al.* Antibodies: Structure and Function. In *Immunology*, 5th edition. W.H. Freeman, New York, 2003.
- Griep, R., McDougall, J. Antibody Engineering, Volume 2. In *Analysis and Purification of Antibody Fragments Using Protein A, Protein G and Protein L*, R. E. Konermann, S. Dubel, (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg, 2010.

- Griffiths, A.J. *et al.* Making Recombinant DNA. In *Modern Genetic Analysis*. W. H. Freeman, New York, 1999.
- Groll, A.V. *Lípidos catiônicos anfifílicos como neutralizadores da carga elétrica do DNA para transfecção in vitro de células eucarióticas*. Tese de Mestrado, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2003.
- Gupta, M.N., Jain, S., Roy, I. Immobilized Metal Affinity Chromatography without Chelating Ligands: Purification of Soybean Trypsin Inhibitor on Zinc Alginate Beads. *Biotechnology Progress*, **18** (1), 78–81, 2002.
- Hacker, D., Jesus, M., Wurm, F. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - Where do we go from here? *Biotechnology Advances*, **27** (6), 1023–1027, 2009.
- Hames, D., Hooper, N. Antibodies. In *Instant Notes: Biochemistry*, 3th edition, Elizabeth Owen (ed.), Taylor & Francis Group, New York, 2005.
- Ho, S.C.L. *et al.* Control of IgG LC: HC ratio in stably transfected CHO cells and study of the impact on expression, aggregation, glycosylation and conformational stability. *Journal of Biotechnology*, **165** (3-4), 157–166, 2013.
- Hoch, I. *et al.* Antibiotic inhibition of RNA catalysis: neomycin B binds to the catalytic core of the td group I intron displacing essential metal ions. *Journal of molecular biology*, **282** (3), 557–569. 1998.
- Imai, K., Takaoka, A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature reviews cancer*, **6** (9), 714–727, 2006.
- Invitrogen, L.T. *Potent, reliable selection reagents for gene expression*. 2002. Disponível em: http://www.pottslab.org/protocols/Cell%20Culture/710_011094_Antibiotics_bro.pdf
- Invitrogen, L.T. *Zeocin™ Selection Reagent*. 2012. Disponível em: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/zeocin_man.pdf
- Jayapal, K. *et al.* Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, **103** (10), 40–47, 2007.

- Jones, S.D., Castillo, F.J., Levine, H.L. Advances in the Development of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *BioPharm International*, 96–114, 2007.
- Jostock, T. Expression of Antibody in Mammalian Cells. In *Antibody Expression and Production*, M. Al-Rubeai (ed.), Springer Science & Business Media, New York, 2011.
- Julin, D. Selection with Antibiotics. In *Molecular Life Sciences*, R.D. Wells (ed.), Springer Science & Business Media, New York, 2014.
- Khatun, I. Recombinant Adenoviral Vector Systems. *Mater Methods*, **2** (126), 2012.
- Kim, T.K., Eberwine, J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **397** (8), 3173–8, 2010.
- Kingston, R.E. Introduction of DNA into Mammalian Cells. In *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, New York, 2003.
- Lai, T., Yang, Y., Ng, S.K. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals*, **6** (5), 579–603, 2013.
- Lanza, A., Kim, D., Alper, H. Evaluating the influence of selection markers on obtaining selected pools and stable cell lines in human cells. *Biotechnol. Journal*, **8** (7), 811–821, 2013.
- Lerner, E.A. How to make a hybridoma. *The Yale journal of biology and medicine*, **54** (5), 387–402, 1981.
- Li, J. *et al.* A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. *Journal Immunol. Methods*, **318**, 113–124, 2007.
- Lingg, N. *et al.* The sweet tooth of biopharmaceuticals: Importance of recombinant protein glycosylation analysis. *Biotechnology Journal*, **7** (12), 1462–1472, 2012.
- Liu, H., May, K. Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. *mAbs*, **4** (1), 17–23, 2012.

Lodish, H. *et al.* Protein glycosilation in the ER and Golgi complex. In *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman, New York, 2000.

Lotfipour, F., Hallaj-Nezhadi, S. Microbial Quality Concerns for Biopharmaceuticals. In *Latest Research into Quality Control*, I. Akyar (ed.), Intech, 2012.

Maccarrone, M., Rossi, A., Agró, A.F. Gene Transfer to Plants by Lipofection and Electroporation. In *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes, Vol IV From Gene Delivery and Diagnosis to Ecology*, D.D. Lasic, Y. Barenholz (eds.), CRC Press, Flórida, 1996.

Madigan, M.T. *et al.* Genetic Engineering. In *Brock Biology of Microorganisms*. Benjamin Cummings, San Francisco, 2010.

Marques, S., Almeida, I. *Imunoglobulinas*. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2006. Disponível em: http://users.med.up.pt/cc04-10/Imunologia/desgravadas/6_Imunoglobulinas.pdf

Mertens, N. Tribodies:Fab –scFv Fusion Proteins as a Platform to Create Multifunctional Pharmaceuticals. In *Bispecific Antibodies*, R. Kontermann (ed.), Springer, New York, 2011.

Mirus Bio LLC. *Antibiotic Kill Curve*. Disponível em:

<https://www.mirusbio.com/applications/stable-cell-line-generation/antibiotic-kill-curve>
[Acedido em Março de 2015].

Muller, N. *Transient Gene Expression for Rapid Protein Production: studies and optimizations under serum-free conditions*. Tese de doutoramento, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausana, Suíça, 2005.

National Research Council (US) Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies, I. for L.A.R. *Monoclonal Antibody Production*, National Academy Press, Washington DC., 1999.

Nayerossadat, N., Maedeh, T., Ali, P.A. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced biomedical research*, **1**, 1–27, 2012.

Onakunle, Y., Birch, J. Biopharmaceutical Proteins: opportunities and challenges. *Methods in Molecular Biology*, **308**, 1–16, 2005.

- OpenWetWare. *Neomycin*. 2007. Disponível em: <http://openwetware.org/wiki/Neomycin> [Acedido em Março de 2015]
- Overton, T. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov Today*, **19** (5), 590–610, 2014.
- Pandey, S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **1** (2), 88–94, 2010.
- Promega, Protocols & Applications Guide - Transfection. 2013. Disponível em: <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/paguide/a4/chap12a4.pdf?la=en>
- Raju, T.S. *et al.* Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*, **10** (5), 477–486, 2000.
- Rajendra, Y. *et al.* A High Cell Density Transient Transfection System for Therapeutic Protein Expression Based on a CHO GS-Knockout Cell Line: Process Development and Product Quality Assessment. *Biotechnology and Bioengineering*, **112** (5), 977–986, 2015.
- Reis, C. *et al.* Biotecnologia Para Saúde Humana: Tecnologias, Aplicações e Inserção na indústria farmacêutica. *BNDES Setorial*, **29**, 359–392, 2009.
- Robbins, P.D., Ghivizzani, S.C. Viral Vectors for Gene Therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, **80** (1), 35–47, 1998.
- Ross, P.C., Hui, S.W. Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency. *Gene Therapy*, **6** (4), 651–659, 1999.
- Rulker, T., Meier, D., Schirrmann, T. Quantification of Human IgG and Related Fc Fusion Proteins by a Human IgG/Fc Capture ELISA. In *Antibody Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- San, K.-Y., Bennet, G.N. Expression Systems for DNA Processes. In *Molecular Biology and Biotechnology: a comprehensive desk reference*, R. A. Meyers (ed.), Jonh Wiley & Sons, New York, 1995.

- Santos, R. V *et al.* Monoclonal antibodies therapeutic applications. *Rev. bras. alerg. imunopatol.*, **29** (2), 77–85, 2006.
- Schlatter, S. *et al.* On the Optimal Ratio of Heavy to Light Chain Genes for Efficient Recombinant Antibody Production by CHO Cells. *Biotechnol. Prog.*, **21** (1), 122–133, 2005.
- Schlokot, U. *et al.* Permanent Gene Expression in Mammalian Cells: Gene Transfer and Selection. In *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, Hansjorg Hauser e Roland Wagner (eds.), Walter de Gruyter, Berlin, 1997.
- Sena, J.A.D., Goldman, M.H. Plantas produtoras de anticorpos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, **23**, 20–26, 2001.
- Senger, R.S., Karim, M.N. Neural Network-Based Prediction of Variable Site-Occupancy of N-Linked Glycosylation. In *Computer Applications in Biotechnology 2004*, Marie-Noelle Pons e Jan F.M. Van Impe, (eds.), Elsevier, Oxford, 2005.
- Simões, S. *et al.* Cationic liposomes for gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2** (2), 1–19, 2005.
- Spearman, M. *et al.* Effect of Culture Conditions on Glycosylation of Recombinant beta-Interferon in CHO Cells. *Cell Technology for Cell Products*, 71–85, 2007.
- Stenesh, J. Carbohydrates. In *Biochemistry*. Springer Science & Business Media, New York, 2013.
- Stone, D. Novel viral vector systems for gene therapy. *Viruses*, **2** (4), 1002–7, 2010.
- Stryjewska, A. *et al.* Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacological reports*, **65** (5), 1075–85, 2013.
- Turgeon, M.L. *Immunology & Serology in Laboratory Medicine*, Elsevier Health Sciences, 2013.
- Val, I.J., Kontoravdi, C., Nagy, J.M. Towards the implementation of quality by design to the production of therapeutic monoclonal antibodies with desired glycosylation patterns. *Biotechnology Progress*, **26** (6), 1505–1527, 2010.
- Walsh, G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: An issue of nomenclature. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **15**, 135–138, 2002.

- Walsh, G. Pharmaceuticals, biologics and biopharmaceuticals. In *BioPharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*. John Wiley & Sons, England, 2003.
- Wang, X. *et al.* Potential aggregation prone regions in biotherapeutics: A survey of commercial monoclonal antibodies. *mAbs*, **1** (3), 254–267, 2009.
- Warnock, J.N., Daigre, C., Al-Rubeai, M. Introduction to viral vectors. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **737**, 1–25, 2011.
- Wurm, F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, **22** (11), 1393–1398, 2004.
- Zhang, J. Mammalian Cell Culture for Biopharmaceutical Production. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, A.L. Demain (ed.), ASM Press, Washington DC, 2010.

Anexo I – Vetores de expressão utilizados

Figura I.1 – Representação do plasmídeo pBio1-Neo.

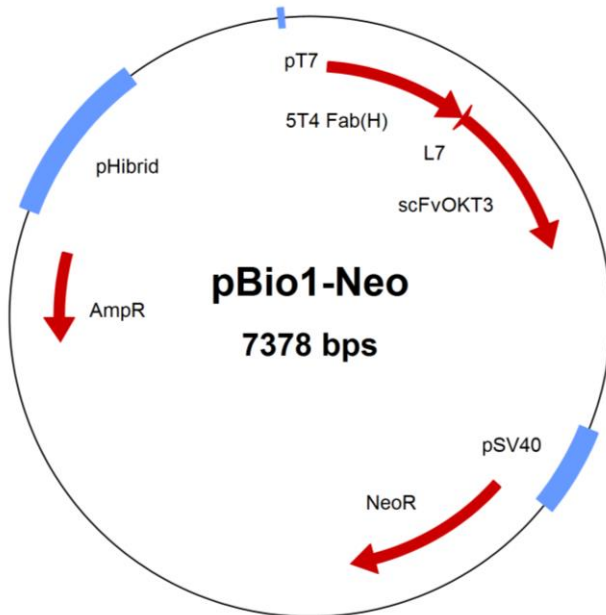
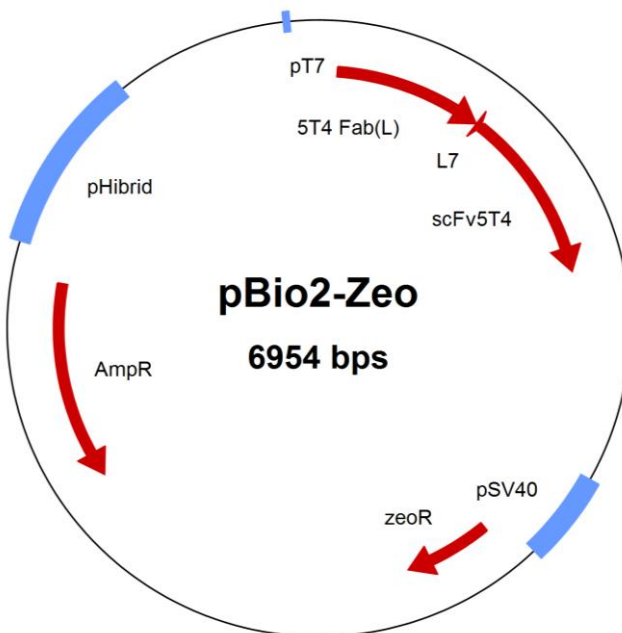


Figura I.2 – Representação do plasmídeo pBio2-Zeo.



Anexo II – Determinação da concentração de antibiótico óptima a usar na fase de selecção

Tabela II.1 – Valores obtidos para a taxa específica de morte em h^{-1} atendendo à concentração de zeocina em $\mu g/ml$ administrada às células HEK293F.

conc. antibiótico ($\mu g/ml$)	0	50	100	200	400
k_d (h^{-1})	0	0,007	0,010	0,013	0,015

Tabela II.2 – Valores obtidos para a taxa específica de morte em h^{-1} atendendo à concentração de zeocina em $\mu g/ml$ administrada às células CHO-S.

conc. antibiótico ($\mu g/ml$)	0	50	100	200	400
k_d (h^{-1})	0	0,011	0,019	0,023	0,026

Tabela II.3 – Valores obtidos para a taxa de inibição de crescimento (%) em função da concentração de neomicina administrada às células HEK293F.

Conc. Neomicina ($\mu g/ml$)	Taxa específica de crescimento, μ (h^{-1})	PDT(dias)	Taxa de inibição de crescimento (%)
0	0,026	1,10	0
20	0,023	1,24	11
30	0,020	1,47	25
40	0,015	1,98	44
50	0,012	2,48	56
100	0,012	2,39	54

Tabela II.4 – Valores obtidos para a taxa de inibição de crescimento (%) em função da concentração de neomicina administrada às células CHO-S.

Conc. Neomicina ($\mu g/ml$)	Taxa específica de crescimento, μ (h^{-1})	PDT(dias)	Taxa de inibição de crescimento (%)
0	0,031	0,93	0
20	0,020	1,44	35
30	0,014	2,06	55
40	0,011	2,63	65
50	0,002	16,99	95

Anexo III – Desenvolvimento do método de cromatografia de afinidade por proteína L para quantificação do Tribody™5 produzido

Tabela III.1 – Média e desvio padrão das áreas dos picos obtidos por cromatografia de afinidade por proteína L em função da concentração de Tribody™ caracterizado analisado.

Concentração (mg/ml)	Área 1 (mAu*min)	Área 2 (mAu*min)	Área 3 (mAu*min)	Média	Desvio Padrão	Erro %	Backcalc	Recuperação
0,04	2,0	2,0	1,9	1,9	0,1	3,0	0,035	88,4
0,2	10,8	10,1	9,9	10,2	0,5	4,6	0,2	100,9
0,3	15,2	15,3	15,3	15,2	0,0	0,2	0,3	100,7
0,4	20,2	20,1	21,0	20,4	0,5	2,4	0,4	101,6
0,6	29,7	30,1	29,6	29,8	0,2	0,8	0,6	99,1

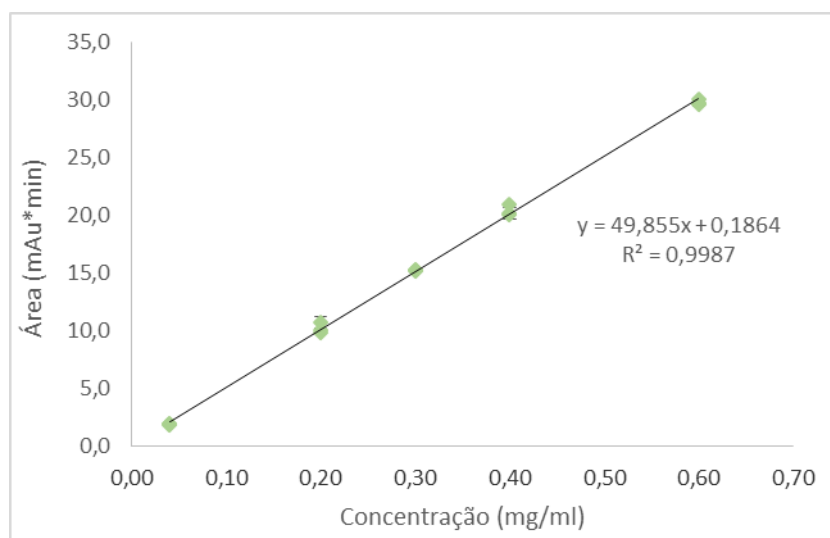


Figura III.1 – Curva de calibração obtida pela representação da área dos picos em função da concentração de amostra de Tribody™ caracterizada utilizada.