

LARGE SCALE CELL CULTURE IN BIOTECHNOLOGY

A decorative graphic at the bottom of the slide consists of a solid green trapezoidal shape pointing downwards, which is overlaid on a yellow trapezoidal shape pointing upwards. Both shapes have a white border.

Large-Scale Cell Culture in Biotechnology

W. R. ARATHOON AND J. R. BIRCH

The purpose of this article is to review the current state of large-scale cell culture in terms of its applications, problems, and potential. Because of the commercial and proprietary nature of most large-scale cell culture processes, this review does not contain many detailed scientific results although an attempt is made to address some key issues and findings. Much of this summary deals with processes having an established, commercial track record but some attention is given to more recent innovations with interesting potential applications. Reference is made to plant cell culture but the main emphasis is on mammalian cells.

PROBLEMAS E LIMITAÇÕES NA CULTURA CELULAR EM LARGA ESCALA

- ▶ Origens no trabalho de Telling e Capstick.
 - ▶ Células de rim de hamster bebê (BHK cells).
- ▶ Aperfeiçoamento para base de indústria multimilionária.

PROBLEMAS E LIMITAÇÕES NA CULTURA CELULAR EM LARGA ESCALA

- ▶ Fabricação rentável de vacina contra febre aftosa (foot-and-mouth disease – FMD).
- ▶ 1983: 2,1 milhões de litros.

PROBLEMAS E LIMITAÇÕES NA CULTURA CELULAR EM LARGA ESCALA

- ▶ No final dos anos 70: processos adaptados por várias empresas e institutos.
 - ▶ Produção de interferons em linhagens contínuas.

PROBLEMAS E LIMITAÇÕES NA CULTURA CELULAR EM LARGA ESCALA

- ▶ Mais recentemente.
 - ▶ Produção de anticorpos monoclonais e glicoproteínas em células de mamíferos geneticamente modificadas.
- ▶ Motivo: corretos folding e glicosilação.

PROBLEMAS E LIMITAÇÕES NA CULTURA CELULAR EM LARGA ESCALA

- ▶ Maior perigo é a contaminação microbiana.
- ▶ Mais aguda em larga escala.
 - ▶ Grandes perdas.
- ▶ Mycoplasma: ameaça à cultura de células animais.
 - ▶ Difícil detecção e altamente contagioso.

PROBLEMAS E LIMITAÇÕES NA CULTURA CELULAR EM LARGA ESCALA

- ▶ Contaminação viral não é grande problema.
 - ▶ Exceção: parvovírus.
- ▶ Fontes:
 - ▶ Soro animal.
 - ▶ Banco de células inadequadamente selecionados.

PROBLEMAS E LIMITAÇÕES NA CULTURA CELULAR EM LARGA ESCALA

- ▶ Sucesso da cultura em larga escala evidencia-se trabalhando com banco de células.
- ▶ Criação e teste adequado dos bancos de células são bastante praticados.

PROBLEMAS E LIMITAÇÕES NA CULTURA CELULAR EM LARGA ESCALA

- ▶ Uso de antibióticos no meio.
 - ▶ Microrganismos droga-resistente.
- ▶ Alternativamente:
 - ▶ Projetos adequados para os recipientes, sistemas de filtração e tubulações. Atenção cuidadosa aos detalhes operacionais.
 - ▶ 95% de sucesso.

PROBLEMAS E LIMITAÇÕES NA CULTURA CELULAR EM LARGA ESCALA

- ▶ Projetos de recipientes convencionais.
 - ▶ Boa mistura das células em suspensão.
- ▶ Apropriada mistura provê homogeneidade.
 - ▶ Temperatura, O_2 e pH.

PROBLEMAS E LIMITAÇÕES NA CULTURA CELULAR EM LARGA ESCALA

- ▶ Qualidade das matérias-primas.
- ▶ Uso de meios mais definidos.
 - ▶ Minimização de soro.
- ▶ Toxicidade celular.
 - ▶ Meios sem soro.

PROBLEMAS E LIMITAÇÕES NA CULTURA CELULAR EM LARGA ESCALA

- ▶ Água de alta pureza.
- ▶ Água demasiadamente pura é corrosiva.
 - ▶ Tratamento pelo contato com recipientes e tubos de aço inoxidável.

PROBLEMAS E LIMITAÇÕES NA CULTURA CELULAR EM LARGA ESCALA

- ▶ Filtração *upstream* (meio).
 - ▶ Bastante eficiente.
- ▶ Grande controle nos processos *downstream*.
 - ▶ Pré-requisito para licenciamento pelo Food and Drug Administration (FDA).

SISTEMAS E CRITÉRIOS DE DESIGN PARA CULTURAS EM LARGA ESCALA

- ▶ Maioria das culturas: células adaptadas para crescimento em suspensão.
- ▶ Cultivo em recipientes de aço inoxidável.
 - ▶ Relação altura x diâmetro 1:1 ou 3:1.

SISTEMAS E CRITÉRIOS DE DESIGN PARA CULTURAS EM LARGA ESCALA

- ▶ Agitadores com rotores baseados em lâmina em disco ou em padrões de hélice marinha.
- ▶ Condições de agitações variam com geometria do recipiente.

SISTEMAS E CRITÉRIOS DE DESIGN PARA CULTURAS EM LARGA ESCALA

- ▶ Densidade populacional de cerca de 5×10^6 células por mL.
- ▶ Fácil fornecimento e controle de pH e O_2 .
 - ▶ O_2 : 0,1 volume por volume do reservatório por minuto.
 - ▶ pH: CO_2 em taxas similares ao O_2 e/ou adição de solução básica estéril (NaOH ou Na_2CO_3).

SISTEMAS E CRITÉRIOS DE DESIGN PARA CULTURAS EM LARGA ESCALA

- ▶ Comum uso de controle automático.
- ▶ Controle de O_2 :
 - ▶ Eletrodos redox menos frágeis que eletrodos de oxigênio.

SISTEMAS E CRITÉRIOS DE DESIGN PARA CULTURAS EM LARGA ESCALA

- ▶ Controle meio celular tem sido usado com sucesso com base para *scaling up* de culturas de linhas celulares.
 - ▶ Ex.: BHK e células de ovário de hamster chinês (CHO cells).

SISTEMAS E CRITÉRIOS DE DESIGN PARA CULTURAS EM LARGA ESCALA

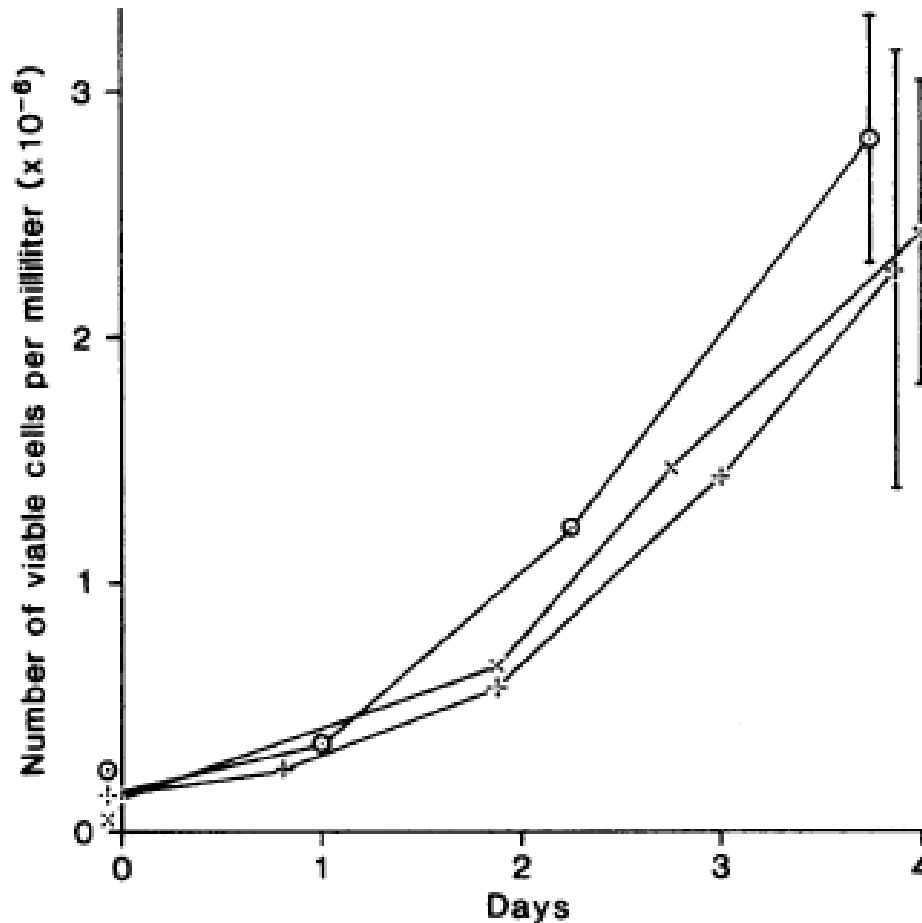


Fig. 1. CHO cell growth in enriched Eagle's medium containing 1% bovine serum at the 10-liter (O), 100-liter (x), and 1000-liter (+) scales. Vertical bars represent 2 SD's around the means, as measured in nine determinations.

SISTEMAS E CRITÉRIOS DE DESIGN PARA CULTURAS EM LARGA ESCALA

- ▶ Espuma: causada pela pulverização do ar e agravada pelo soro.
 - ▶ Danifica células e produtos.
- ▶ Controle:
 - ▶ Aditivos antiespumantes.
 - ▶ Dispositivos de armadilha pra espuma.

SISTEMAS E CRITÉRIOS DE DESIGN PARA CULTURAS EM LARGA ESCALA

- ▶ Fermentadores de transporte aéreo (*airlift*).
 - ▶ Cultivo de células microbianas.
 - ▶ Atualmente de células BHK21, linfoblastóides, CHO e vegetais.

SISTEMAS E CRITÉRIOS DE DESIGN PARA CULTURAS EM LARGA ESCALA

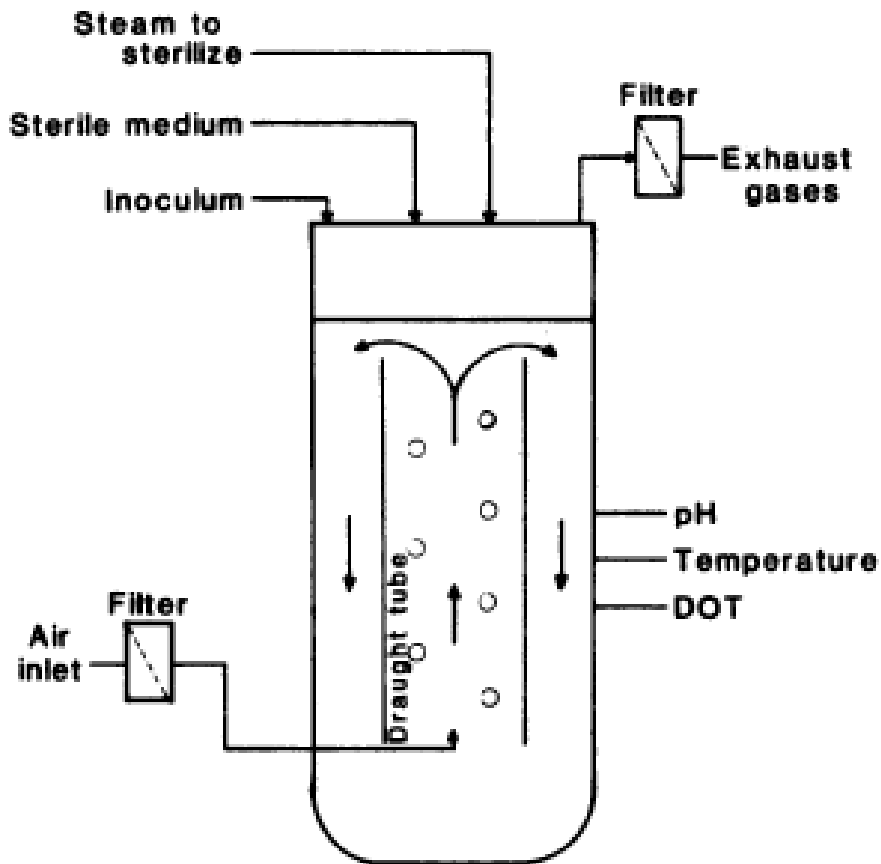


Fig. 2. Principle of an airlift reactor (52). DOT, dissolved oxygen tension. [Courtesy of Celltech, Ltd.]

SISTEMAS E CRITÉRIOS DE DESIGN PARA CULTURAS EM LARGA ESCALA

- ▶ Tecnologia de microcarregadores.
 - ▶ Células dependentes de ancoragem.
 - ▶ Ex.: linhagens de células diplóides.
- ▶ Esferas microcarregadoras.
 - ▶ Formas mais eficiente de fornecer grande superfície de contato.

SISTEMAS E CRITÉRIOS DE DESIGN PARA CULTURAS EM LARGA ESCALA

- ▶ Dificuldades:
 - ▶ Transferência de células.
 - ▶ Células formam “pontes” entre esferas.
 - ▶ Enzimas proteolíticas requeridas.
 - ▶ Evitar condições de cisalhamento.
 - ▶ Grande agitação.
 - ▶ Necessária agitação vigorosa.
 - ▶ Evitar agregação de esferas.

SISTEMAS E CRITÉRIOS DE DESIGN PARA CULTURAS EM LARGA ESCALA

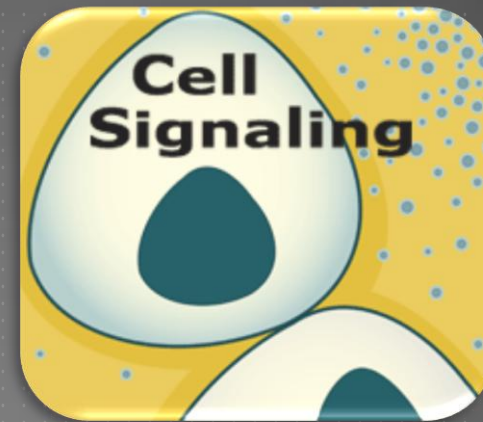
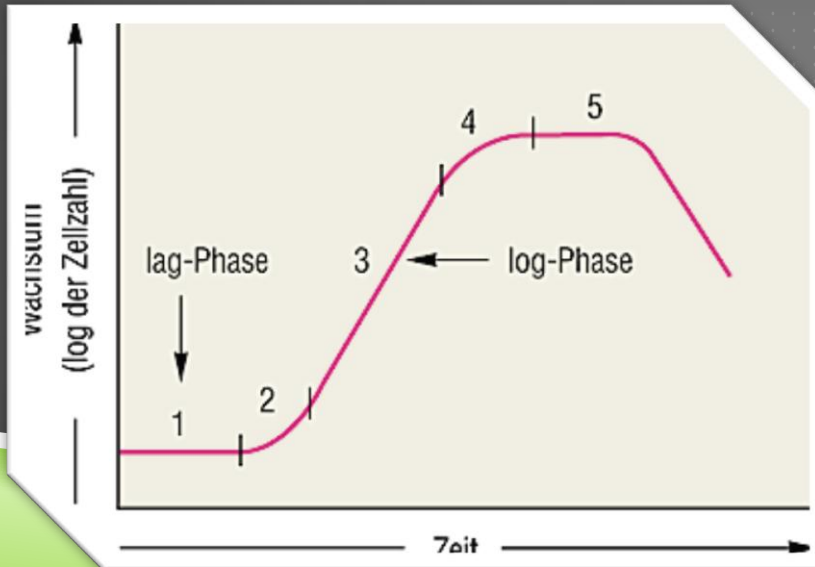
- ▶ O_2 e pH adequadamente controlados.
 - ▶ Mistura suficiente para manter as esferas em suspensão.
- ▶ Espuma é uma armadilha para as esferas.
- ▶ Bastante complexo.
 - ▶ Usado só quando necessário.

OPTIMIZING CONDITIONS FOR ANIMAL CELL GROWTH AT SCALE

- ▶ Requisitos, avanços, pesquisas no campo

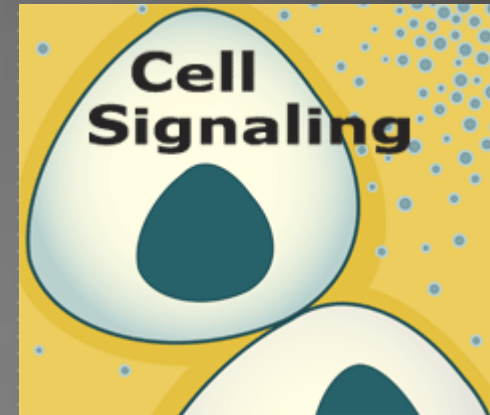
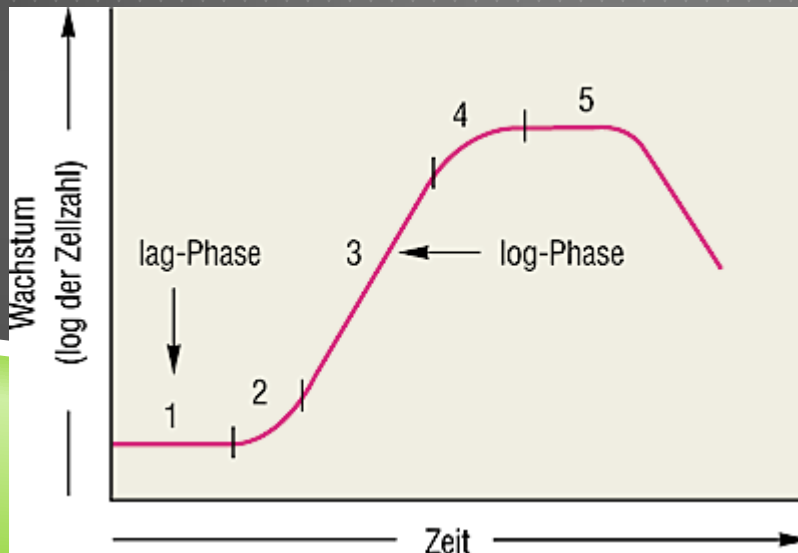
OPTIMIZING CONDITIONS FOR ANIMAL CELL GROWTH AT SCALE

- ▶ O Crescimento celular = Célula X Ambiente em termos físicos, nutricionais e hormônais.
- ▶ Células crescem no padrão clássico:



OPTIMIZING CONDITIONS FOR ANIMAL CELL GROWTH AT SCALE

- ▶ Alterações no ritmo de crescimento ocasionado por alterações bioquímicas, intrínsecas a atividade celular, no meio de cultivo
- ▶ Alterações morfológicas em resposta à mudança das propriedades do meio

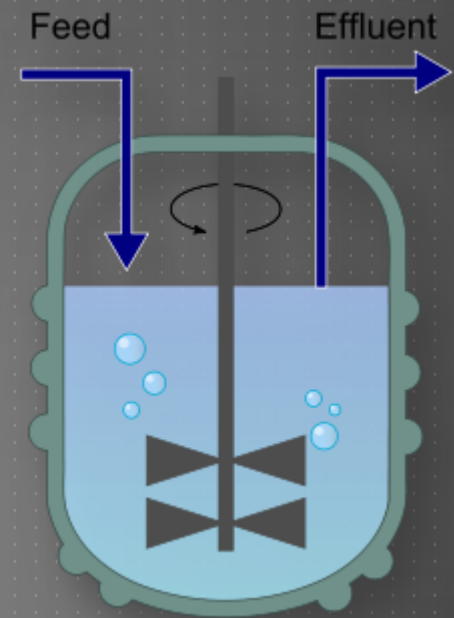


OPTIMIZING CONDITIONS FOR ANIMAL CELL GROWTH AT SCALE

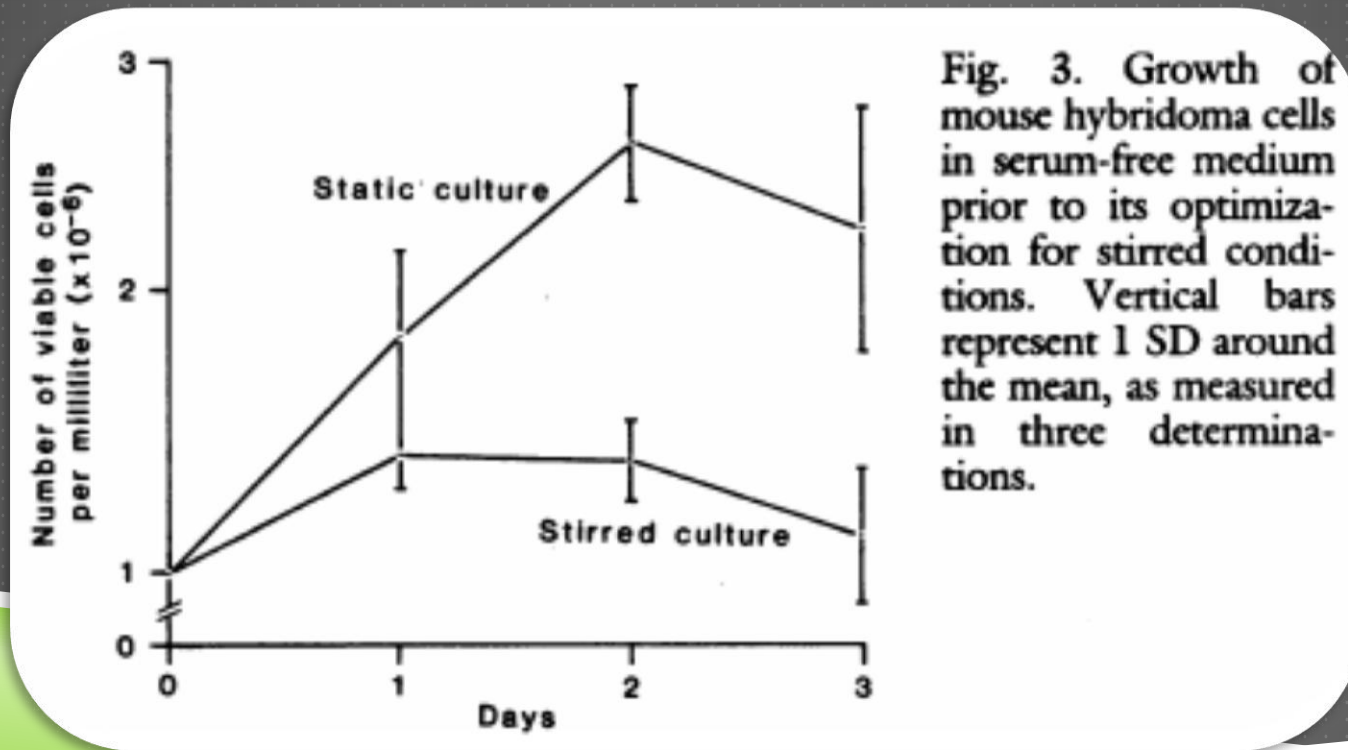
- ▶ Vários estudos foram conduzidos para se definir as formulações dos meios atuais
- ▶ Estudos relacionados ao crescimento celular em larga escala são em sua maioria conduzidos por empresas
- ▶ Otimização dos meios é feita em escala laboratorial X análise de várias variáveis simultaneamente

OPTIMIZING CONDITIONS FOR ANIMAL CELL GROWTH AT SCALE

- ▶ Quantificação dos requisitos nutricionais
- ▶ Uso de “Chemostats”: Ambiente químico estável
- ▶ Permite que uma variável seja testada por vez



- ▶ Transição de um cultivo estático para um cultivo com agitação pode agir como um impedimento ao aumento de escala



OPTIMIZING CONDITIONS FOR ANIMAL CELL GROWTH AT SCALE

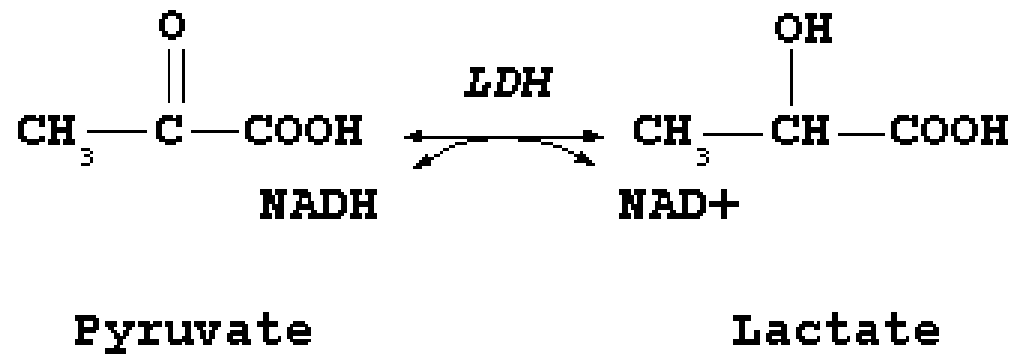
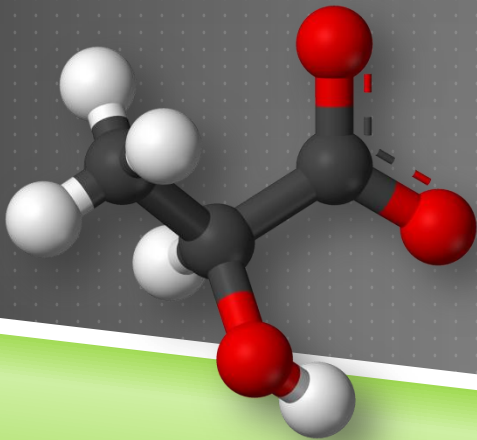
- ▶ Linhagens celulares contendo DNA recombinante variam em requisitos nutricionais
- ▶ Não necessariamente produzem em nível ótimo em meio genérico

SAÚDE CELULAR

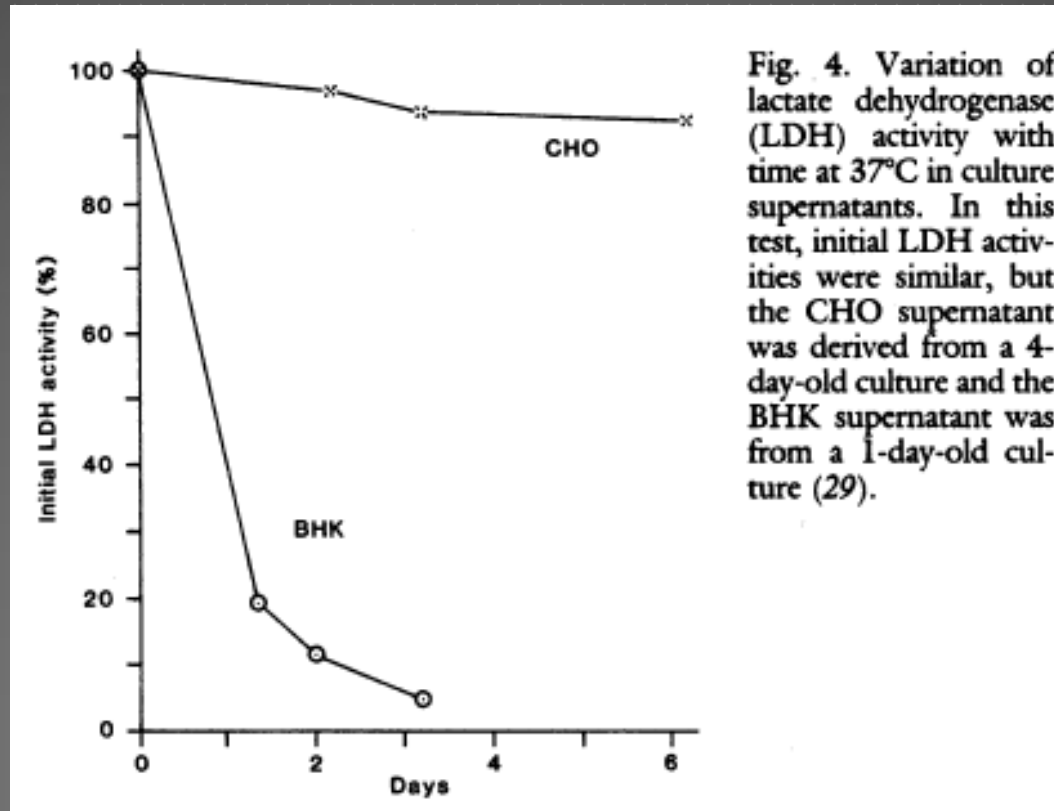
- ▶ Observação Microscópica Direta
- ▶ Densidade celular, viabilidade, índice de mitose, morfologia celular e “debris” celulares
- ▶ Em culturas automáticas, as taxas de aeração são utilizadas como parâmetro. (Fluxo de gases)

PARÂMETROS ADICIONAIS

- ▶ Níveis de Lactato e *lactato desidrogenase* (LDH)
- ▶ LDH não pode ser utilizada como padrão para todas os cultivos (baixa estabilidade em alguns sobrenadantes e presença da mesma em soro bovino)

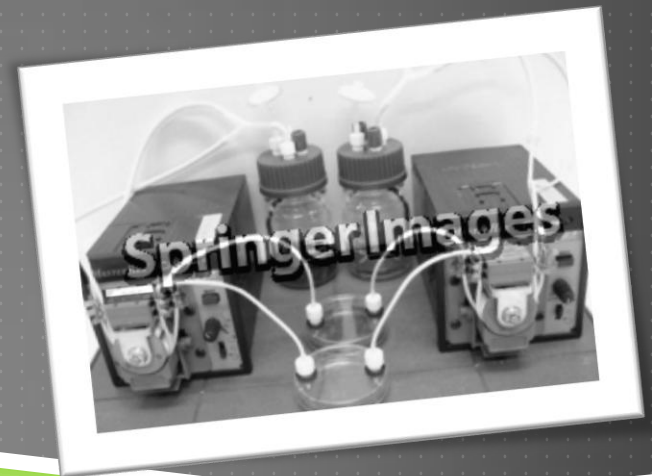


SAÚDE CELULAR



CULTURAS DE PERFUSÃO

- ▶ Onde o fluxo do meio de cultivo é constante (meio retirado = meio adicionado)
- ▶ Produto coletado continuamente , rápida purificação
- ▶ Ao contrário do “Chemostat”, as taxas de replicação celular aumentam de forma incontrolável até a estabilização
- ▶ “Biomass feedback”



SISTEMAS DE PERFUSÃO

- ▶ Sistemas Homogêneos Microscópicos
(Suspensões)
- ▶ Sistemas Homogêneos Macroscópicos
(Células encapsuladas em matrizes)
- ▶ Sistemas Não-Homogêneos
(Células livres, immobilizadas por um filtro)

PRESENT AND FUTURE PRODUCTS RELEVANT TO LARGE-SCALE CELL CULTURE



VACINAS

- ▶ Vacinas FMD (Food and Mouth Disease), Anti-rábica, anti-pólio,
- ▶ Os processos de produção de vacinas devem e são conduzidos com maiores rigores em termos de biossegurança
- ▶ Vacinas derivadas de vírus inativados são relativamente impuras
- ▶ Possibilidade das impurezas se integrarem com a vacina

INTERFERONS

- ▶ Já realizados em larga escala
- ▶ Culturas com mais de 8000 litros – Wellcome Foundation
- ▶ Produção de interferon *B* – Sistema de Microcarreadores - + 1000 litros

ANTICORPOS MONOCLONAIS

- ▶ Crescente uso.
 - ▶ Diagnóstico *in vitro*, imageamento *in vivo* e aplicações industriais.
 - ▶ Processos econômicos e confiáveis.
- ▶ Inicialmente era disponível mg.
- ▶ Atualmente são requeridos Kg por ano.

ANTICORPOS MONOCLONAIS

- ▶ Duas abordagens na produção de Ig monoclonais de hibridomas.
 - ▶ *In vivo*: tumores ascíticos.
 - ▶ *In vitro*.

ANTICORPOS MONOCLONAIS

- ▶ *In vitro* melhor que *in vivo*.
 - ▶ Ex.: 1 Kg de anticorpos – único fermentador X 20 mil ratos.
- ▶ Outra vantagem.
 - ▶ Menor risco de contaminação.
 - ▶ Importante quando finalidade é aplicação em humanos (*in vivo*).

ANTICORPOS MONOCLONAIS

- ▶ Células hibridoma crescem em suspensão.
 - ▶ Fermentadores de transporte aéreo e fermentadores agitados.
- ▶ Grupos que trabalham com células imobilizadas.
- ▶ Fermentadores *airlift* de aço inoxidável de 10, 100 e 1000 litros operados em cascata.

ANTICORPOS MONOCLONAIS

- ▶ Altos níveis de automação.
- ▶ Computador baseado em microprocessador.
 - ▶ pH, O₂ dissolvido e temperatura.
 - ▶ Sequências de ativação de válvulas e bombas.
 - ▶ Sistema de alarmes.
- ▶ Após fermentação:
 - ▶ centrifugação de fluxo contínuo.
 - ▶ sobrenadante concentrado via ultrafiltração de fluxo tangencial.
 - ▶ purificação.

ANTICORPOS MONOCLONAIS

- ▶ Métodos de crescimento em *airlift* aplicáveis para inúmeras linhas de células.
- ▶ Meio sem soro usado com sucesso (1000 L).
 - ▶ 260g; 260h.
- ▶ Ciclos variam de 140-400h.

ANTICORPOS MONOCLONAIS

- ▶ Produtividade de 40-500mg/L (concentração final).
 - ▶ Quatro a cinco vezes que em sistemas laboratoriais.
 - ▶ Ex.: garrafas *roller*.
- ▶ Processo em batelada interessante.
 - ▶ Síntese na fase de declínio.

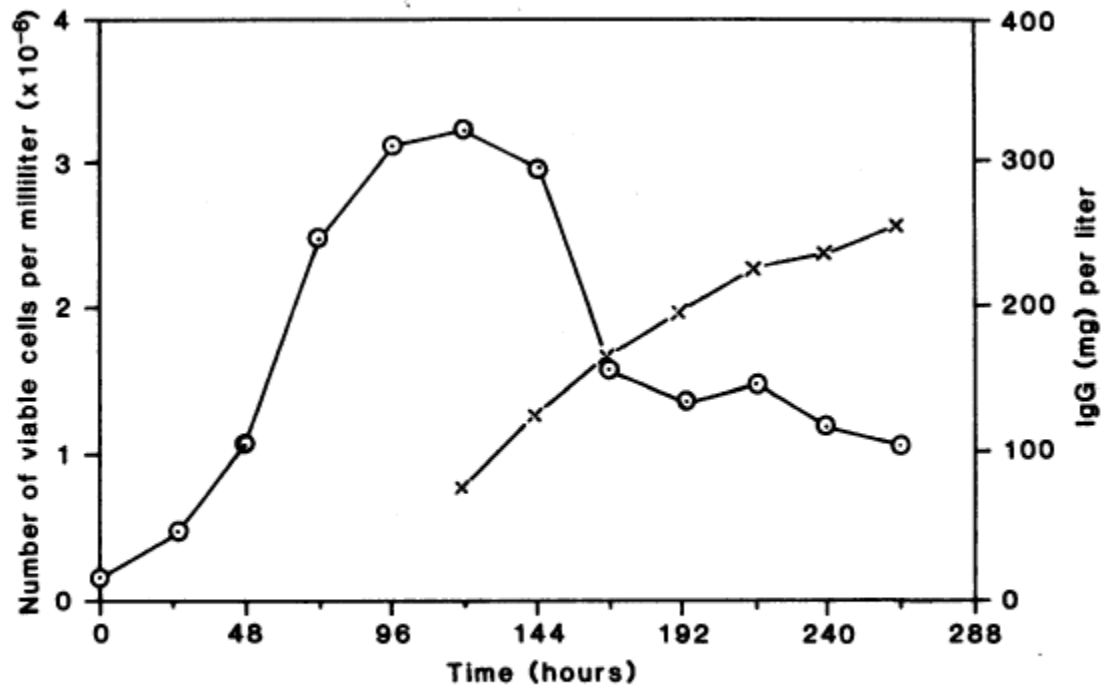


Fig. 5. Growth and antibody synthesis by mouse hybridoma cells in serum-free medium in a 1000-liter fermenter (53); O, cell number; x, antibody concentration. [Courtesy of Celltech, Ltd.]

PRODUTOS RECOMBINANTES

- ▶ Certos produtos necessitam passos adicionais relativos à expressão gênica que estão ausentes em microorganismos clássicos,
- ▶ Produtos com alta demanda: Necessidade de vários Quilos por ano.
- ▶ tPA, fatores sanguíneos, hormônios, antígenos vírais (Hepatite B, Herpes, Citomegalovírus, HIV, outros)

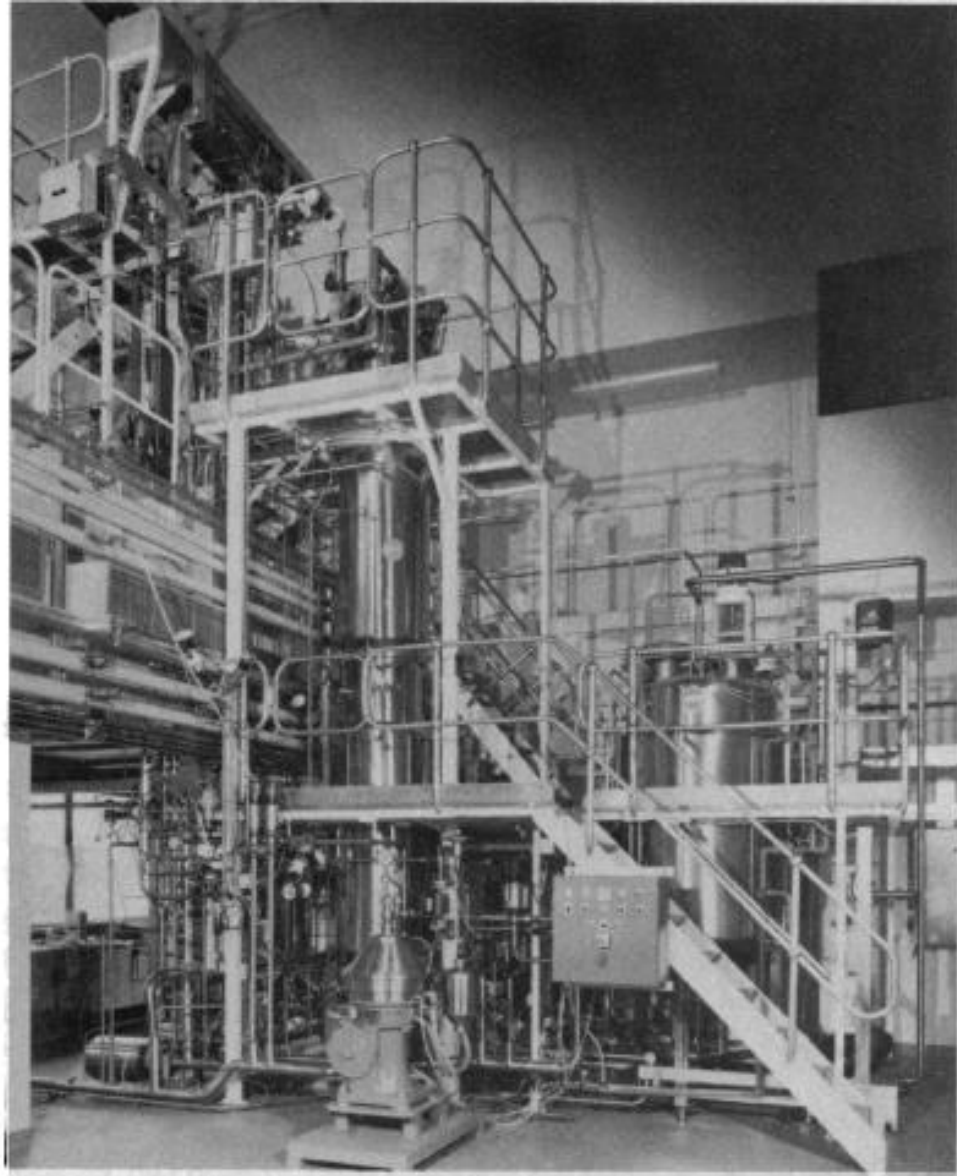


Fig. 6. A 1000-liter fermenter at Celltech Ltd. has the capacity to produce monoclonal antibodies in kilogram quantities per year. [Courtesy of Celltech, Ltd.]

MUITO OBRIGADO!

