

CÁSSIA MARIA RAMACIOTTI DE ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
FATOR VIII RECOMBINANTE EM BIORREATOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth de Fatima Pires
Augusto

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

ANDRADE, C. M. R. **Desenvolvimento de processo de produção de fator VIII recombinante em biorreator.** 2013. 319 p. Tese [Doutorado em Biotecnologia] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A deficiência de atividade do fator VIII (FVIII) de coagulação associa-se a uma doença crônica, hemofilia A, cujo controle depende da reposição desta proteína na corrente sanguínea. Atualmente, no Brasil, todo o FVIII utilizado é importado e originário de plasma sanguíneo. No entanto, o FVIII recombinante (rFVIII) é uma alternativa mais segura, apresentando menor risco de contaminantes. Visando obter atividade adequada e evitar reações imunológicas, é desejável que o rFVIII seja produzido em sistemas capazes de realizar modificações pós-traducionais semelhantes àquelas encontradas na proteína normal. Neste sentido, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer um processo de produção de rFVIII em biorreator de bancada, *bubble-free*, utilizando duas linhagens humanas transfectadas pelo Hemocentro de Ribeirão Preto - rHeLa e rSKHep. Quando cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB), estas linhagens apresentaram comportamentos semelhantes com relação ao crescimento e metabolismo celular. Ambas apresentaram crescimento celular (ΔX) médio de $1,47 \times 10^6$ cel/mL (CV=4%) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X,MÁX}$) de $0,0284\text{ h}^{-1}$ (CV=2%). Os valores de $Y_{X/GLC}$ e $Y_{LAC/GLC}$ também foram próximos, apresentando valores médios de $3,65 \times 10^8$ cel/g (CV=14%) e 0,734 g/g (CV=2%), respectivamente. A principal diferença observada foi para $Y_{NH4/X}$, cujo valor obtido com a rHeLa foi 4,15 vezes maior que com a rSKHep. A linhagem rHeLa foi facilmente adaptada ao cultivo em suspensão e a meios livres de SFB, livres de componentes de origem animal e quimicamente definidos. Com esta linhagem foram desenvolvidos estudos preliminares para avaliar as condições mais favoráveis ao crescimento e metabolismo celular. Entretanto, técnicas analíticas implantadas durante o projeto mostraram que a rHeLa perdeu a capacidade de expressar o rFVIII. As tentativas de adaptação da rSKHep ao cultivo em suspensão e meios livres de SFB não foram bem sucedidas, de forma que adotou-se o cultivo com microcarregadores (mic). Os estudos que identificaram as melhores condições para operação neste sistema (3 g mic/L e 3 cel/mic) foram conduzidos a partir de resultados previamente obtidos com a rHeLa. Estudos de estabilidade da proteína mostraram altos índices de degradação (65%) quando exposta a 37 °C por 48 horas. Assim, optou-se pelo cultivo em modo perfusão, utilizando um *spinfilter* interno, como alternativa para produzir continuamente uma proteína cuja atividade seria pouco afetada devido ao baixo tempo de exposição à altas temperaturas. O cultivo em perfusão foi iniciado com 3 cel/mic e foi utilizada uma concentração de 3 gmic/L. O modo perfusão foi iniciado antes da interrupção da fase exponencial de crescimento, com tempo de residência hidráulico de 24 horas e alimentações independentes de glicose e glutamina, visando manter as concentrações destes substratos em 1 e 0,35 g/L, respectivamente. As variáveis controladas (concentração celular, glicose e glutamina) foram mantidas constantes durante três tempos de residência. A concentração de rFVIII máxima obtida foi semelhante à do ensaio em batelada, no entanto, a quantidade total produzida no ensaio em perfusão (16156,27 UI) foi 5,5 vezes superior à obtida na batelada, resultando em uma produtividade 2,5 vezes maior.

Palavras-chave: Biorreator. Células humanas. Proteína recombinante. Fator de coagulação VIII. Metabolismo. Microcarregador.

ABSTRACT

ANDRADE, C. M. R. **Development of a process for recombinant factor VIII production in bioreactor.** 2013. 319 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The deficiency of activity of the coagulation fator VIII (FVIII) is associated to a cronical disease, heamophilia A, which is controlled by the reposition of this protein in the blood. Nowadays, in Brazil, all the factor VIII consumed is produced abroad and has blood plasma origin. However, the recombinant factor VIII (rFVIII) is a safer regarding contamination risks. Aiming to obtain the proper activity and to avoid immunogenic reactions, it is desirable to produce a rFVIII in post-translation modifications similar to those observed at the normal protein. The objective of this work was to establish a process for rFVIII production in a bench bioreactor, bubble-free, using two human cell lines transfected by Hemocentro de Ribeirão Preto – rHeLa e rSKHep. When cultured in DMEM medium with 10% of fetal bovine serum (FBS), these cell lines showed similar behaviors regarding cell growth and metabolism. Both had an average cell production (ΔX) of $1,47 \times 10^6$ cells/mL (CV=4%) and average specific cell growth rate ($\mu_{X,MÁX}$) of $0,0284 \text{ h}^{-1}$ (CV=2%). Results for $Y_{X/GLC}$ and $Y_{LAC/GLC}$ were also similar, with average values of $3,65 \times 10^8$ cell/g (CV=14%) and 0,734 g/g (CV=2%), respectively. The main difference was observed in the $Y_{NH4/X}$ value that was 4,15 times higher in the rHeLa cell line than in SKHep. The rHeLa cells were easily adapted to suspension and to serum-free, animal-component-free and chemically defined media. Preliminary studies to evaluate the best conditions to cell growth and metabolism were developed using this cell line. were developed. However, analytical techniques implemented during the project showed that rHeLa cells had lost its ability to produce the rFVIII. The rSKHep cell line couldn't be successfully adapted to suspension growth or to serum free media, so it was necessary to adopt microcarrier (mic). The studies to idenitify the best conditions for the culture system (3 gmic/L and 3 cells/mic) were performed using previous results from the rHeLa studies. Studies of rFVIII stability showed that it degradates 65% when exposed to 37 °C for 48 hours. Therefore, the perfusion mode, with and internal spinfilter, was an alternative to produce continuously a protein which activity wouldn't be seriously affected due to its low exposure time to high temperatures. The culture in perfusion mode was started with 3 cells/mic and it was used 3 g mic/L. The perfusion mode started before the interruption of the exponential growth phase, with a hydraulic residence time of 24 hours and independent glucose and glutamine feeds aiming to maintain the concentrations of these substrates at 1 and 0,35 g/L, respectively. The controlled variables (cell concentration, glucose and glutamine) were kept constant for three hydraulic residence times. The maximum rFVIII concentration obtained was similar to the one from the batch culture. However, the total amount of rFVIII produced at the perfusion mode (16,156.27 UI) was 5,5 times higher than in batch mode, resulting in a productivity of 2,5 times higher.

Keywords: Bioreactor. Human cells. Recombinant protein. Coagulation fator VIII. Metabolism. Microcarrier.

INTRODUÇÃO

O fator VIII de coagulação sanguínea (FVIII) é uma glicoproteína plasmática de alto peso molecular, estimado em 265 kDa, e que possui algumas características específicas como seu elevado tamanho e alta complexidade, quando comparada a outras proteínas.

A atividade desta proteína está diretamente relacionada às modificações pós-traducionais. O fator VIII é uma proteína altamente ocupada por N- e O-glicanos sendo que, de 25 sítios consensos de N-glicosilação, 23 são ocupados. Além disso, apresenta sulfatação em resíduos de tirosina em cinco posições de sua estrutura (WHITE et al., 1998). A presença destas modificações contribuem para a complexidade desta proteína.

A sua função é atuar como um cofator essencial na ativação proteolítica do fator X pela ativação do fator IX, dentro da via de coagulação do sangue. A deficiência da atividade deste fator essencial está relacionada a uma doença hereditária, hemofilia A, ligada ao cromossomo X, que ocorre mundialmente em 1 a cada 5.000 a 10.000 nascimentos masculinos e está relacionada em 75 a 80% dos casos de hemofilia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), sendo necessária a reposição do mesmo para o seu controle.

O FVIII pode ser obtido diretamente através de derivados de plasma sanguíneo (pdFVIII) ou na forma de proteínas recombinantes (rFVIII) expressas por linhagens de murinos modificadas geneticamente (MIAO et al., 2004), sendo que este último está disponível apenas para 25% dos pacientes no mundo (STONEBRACKER et al., 2010).

No Brasil, há cerca de 10.000 hemofílicos e o tratamento é realizado com pdFVIII de indivíduos normais, produto 100% importado pelo governo (RESENDE; SILVA, 2009). Essa estratégia apresenta duas desvantagens. A primeira é o risco de transmissão de doenças, devido à transferência de produtos do plasma sanguíneo de um doador para a corrente sanguínea de um paciente. Nas décadas de 1970 e 1980, cerca de 60 a 70% de pacientes dos EUA e da Europa Ocidental foram contaminados por vírus causadores de doenças como HIV e hepatites B e C (SOUKHAREV et al., 2002). Desde então, a segurança e eficácia terapêutica destes produtos aumentaram significativamente, com a implementação de medidas mais rigorosas de seleção de doadores e métodos de *screening*, purificação monoclonal e introdução de novas técnicas de inativação viral. No entanto, estes métodos são considerados pouco efetivos em relação a transmissão do parvovírus B19, do vírus causador da hepatite A e ainda resta a dúvida, quanto à patógenos emergentes, como o causador da doença de Creutzfelt-Jakob (SOUKHAREV et al., 2002).

A segunda desvantagem está relacionada à grande quantidade de plasma sanguíneo normal necessário para atender os pacientes, que contam com a genorosidade de doadores. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2012), o aumento na expectativa de vida e o consequente crescimento de doenças crônicas relacionadas ao avanço da idade, exigem transfusões de sangue e uso de hemoderivados, que vão além da oferta existente. Cerca de 92 milhões de doações são feitas todos os anos no mundo, a maioria por voluntários. Entretanto, deste total, 30 milhões realizam o procedimento uma única vez e não retornam aos hemocentros para novas doações.

O Brasil importa cerca de 210 milhões de UI/ano de fator VIII, quando deveria importar cerca de 600 milhões de UI/ano. Portanto, no país, pacientes com Hemofilia A não recebem um tratamento preventivo, mas sim curativo, isto é, apenas quando sofrem algum tipo de trauma. Segundo o Ministério da Saúde brasileiro o custo deste tipo de tratamento é de 100 milhões de dólares anuais (ROSA et al., 2012).

Entre as opções de fontes de obtenção de fatores de coagulação sanguínea, as formas recombinantes tendem a substituir a produção tradicional dos fatores a partir do plasma humano (JIANG et al., 2002). Com o avanço tecnológico, a caracterização da maquinaria de expressão, tradução e secreção destas moléculas, assim como a geração de novos vetores, tem-se tornado viável o emprego de estratégias mais promissoras para a obtenção deste fator.

Em geral, a produção de proteínas recombinantes terapêuticas requer processos com alta densidade celular para obtenção de concentrações elevadas de produto, reduzindo a escala de produção e minimizando custos de recuperação/purificação das proteínas. A obtenção de altas densidades exige conhecimento profundo do metabolismo e das cinéticas de produção, a fim de reduzir efeitos limitantes e inibidores e garantir o potencial máximo das células, em termos de crescimento e expressão do produto.

Linhagens com elevada capacidade de expressão não garantem sozinhas um bom desempenho de produção. É necessário investir em engenharia de processo, principalmente para proteínas terapêuticas, tendo em vista as exigências regulatórias para aprovação. Robustez, reproduzibilidade e garantias quanto à qualidade, à pureza e à segurança são imprescindíveis. Do ponto de vista da indústria, a simplicidade e uma produtividade elevada, que minimize investimentos em equipamentos e áreas GMP, são desejáveis.

A complexidade do fator VIII acarreta em uma desvantagem crítica para o processo produtivo, que está relacionada à estabilidade da proteína. Quando em estado líquido, a proteína apresenta altas taxas de degradação e perda de atividade, as quais estão relacionadas a diversos fatores, tais como altas temperaturas, pH, presença de íons metálicos ou de sais

(WANG; WANG; KELNER, 2003). Desta forma, o processo deve ser altamente controlado para minimizar o tempo no qual a proteína é exposta às condições adversas. Os processos são, em geral, operados em batelada alimentada ou em contínuo com reciclo (perfusão). Dada a labilidade do rFVIII, perda de 50% da atividade em 6-12h em condições de cultivo (KONSTANTINOV, 2008), a perfusão com alta taxa de alimentação e resfriamento imediato do produto é uma alternativa interessante para preservar sua atividade biológica (BHATTACHARYYA et al., 2003; KONSTANTINOV, 2008).

Outro fator importante está relacionado com as modificações pós-traducionais da proteína, segundo Pipe (2008), sua complexidade requer que ela seja produzida num sistema de expressão de células de mamíferos. Atualmente, os produtos de rFVIII disponíveis comercialmente utilizam células de murinos (CHO ou BHK) transfectadas utilizando vetores plasmidiais convencionais (SPENCER et al., 2011).

A utilização de células de murinos levanta questionamentos, pois estas linhagens não apresentam algumas glicosidases, glicosiltransferases e doadores específicos de açúcares, necessários para fazer a glicosilação da proteína com padrões semelhantes aos encontrados em humanos, o que pode resultar em reações imunes nos pacientes ou em menores tempos de meia-vida da proteína (SWIECH; PICANÇO-CASTRO; COVAS, 2012). Desta forma, esforços têm sido direcionados no sentido de utilizar células humanas para a produção desta proteína (SWIECH; PICANÇO-CASTRO; COVAS, 2012).

Este trabalho está inserido em um projeto Finep, com uma parceria entre a Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT). O grande diferencial é a utilização de uma linhagem humana transfectada para produção de rFVIII, capaz de fazer todas as modificações pós-traducionais necessárias para a conformação correta da proteína. Outro fator importante é a utilização de vetores lentivirais, que apresentam maior eficiência do que vetores não-virais (NHISHIKAWA; HUANG, 2001) e são uma alternativa promissora, com a qual já foi possível obter altos níveis de expressão e de estabilidade *in vitro* de rFVIII em linhagens humanas de SkHep, em torno de 1,5 a 2,1 UI/10⁶ células em 24 horas (PICANÇO et al., 2007; ROSA et al., 2012; RUSSO-CARBOLANTE et al., 2011). Uma UI (Unidade Internacional) equivale a 100% de atividade da proteína, que é o valor observado em pessoas sadias.

Inicialmente, os estudos foram concentrados em uma linhagem de HepG2FVIIIDBP140K (rHepG2), enviada ao IPT. A quantificação de rFVIII expresso por esta linhagem era realizada através da metodologia PTTa. Em 2010, quando métodos alternativos de quantificação da proteína foram implementados (Cromogênico e ELISA), foi

detectado um problema de inconsistência entre os resultados destas três metodologias. Na busca de uma explicação, a equipe do Hemocentro de Ribeirão Preto realizou um estudo sobre a análise dos sítios de integração do FVIII-P140K da linhagem celular (rHepG2) utilizada até o momento e constatou, que a integração ocorreu com alta frequência em sítios frágeis (20%). Isso poderia explicar a perda do gene do FVIII na linhagem, após longos períodos de cultivo celular.

Para complementar este estudo foi realizado também, um Exame de Vínculo Genético (*STR-Fingerprint*), no qual verificou-se que a cultura rHepG2, na verdade era uma cultura de uma linhagem tumoral humana denominada HeLa. Após este resultado, pode-se concluir que a linhagem modificada geneticamente para expressar o rFVIII tratava-se de uma rHeLa.

A grande demora em identificar essa perda de expressão ocorreu devido ao fato das células sintetizarem alguma substância desconhecida capaz de promover a coagulação no teste TTPa, com resultados elevados e promissores.

Enquanto isso, foi enviado pelo Hemocentro de Ribeirão Preto uma nova linhagem humana SkHep-FVIIIGFP-CMVdelB (rSKHep), cuja produção de rFVIII pode ser quantificada tanto pelo método TTPa, quanto pelos métodos Cromogênico e ELISA. Além de toda caracterização da linhagem celular ter sido feita pelo Hemocentro, foi realizado no IPT um RT-PCR para verificar se, efetivamente, o gene de produção de rFVIII estava inserido no genoma desta célula e obteve-se resultado positivo.

Os experimentos com a linhagem humana rHeLa continuaram, devido ao fato destas células serem um importante modelo para estudos de câncer, por sua utilização no controle de qualidade de biofármacos, por servir como hospedeira para expressão de proteínas recombinantes e por ser utilizada na produção de vacinas (EL-ENSAHY et al., 2009). Além disso, pretendia-se correlacionar os resultados obtidos nos estudos com esta linhagem com os da linhagem rSKHep, visando implementar o processo de produção da proteína mais rapidamente.

Com a linhagem rSKHep foram realizados experimentos, que tinham por finalidade avaliar as condições que otimizavam o crescimento celular e a produção de rFVIII. Após a definição das condições mais adequadas e utilizando dados previamente obtidos nos estudos com rHeLa, passou-se à etapa de cultivo em perfusão, que era a principal meta do trabalho.

CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho podem ser divididas em:

- a) Conclusões sobre o cultivo com a linhagem rHeLa:
 - 1) Em um ensaio típico, com meio contendo soro, a linhagem apresentou $\mu_{X,MÁX}$ de 0,028 h^{-1} e crescimento celular (ΔX) de $1,5 \times 10^6$ cel/mL. Com relação ao metabolismo celular, a linhagem apresentou $Y_{X/GLC}$ igual a 4×10^8 cel/g, $Y_{LAC/GLC}$ igual a 0,725 g/g e $Y_{NH4/X}$ de $9,34 \times 10^{-2}$ mg/ 10^6 células.
 - 2) A linhagem foi adaptada com sucesso ao cultivo em suspensão e em meios livres de soro fetal bovino com as seguintes características: livres de proteína animal e quimicamente definidos;
 - 3) Em ensaios referência, com meio quimicamente definido e livre de soro (HyCD), a linhagem adaptada ao crescimento em suspensão apresentou, em média, valores de $\mu_{X,MÁX}$ de 0,024 h^{-1} (CV = 7,2%) e crescimento celular (ΔX) de $1,35 \times 10^6$ cel/mL (CV = 23,1%). A linhagem apresentou valores médios de $Y_{X/GLC}$ igual a $2,9 \times 10^8$ cel/g (CV = 16,9%), de $Y_{LAC/GLC}$ igual a 0,573 g/g (CV = 13,2%) e de $Y_{NH4/X}$ de $3,68 \times 10^{-2}$ mg/ 10^6 células (CV = 16,7%);
 - 4) O aumento da osmolalidade apresentou efeitos deletérios ao crescimento e metabolismo cujas intensidades variaram de acordo com o meio de cultura testados- DMEM com 10% de SFB (347 a 450 mOsmol/kg), HyCD (317 a 440 mOsmol/kg) e Si-ACF (319 a 426,5 mOsmol/kg). Todas as condições apresentaram queda nos valores de $Y_{X/GLC}$ e aumento nos valores de $Y_{LAC/GLC}$ e $Y_{NH4/X}$. O aumento da osmolalidade também causou queda em $\mu_{X,MÁX}$ e ΔX . No entanto, esta queda foi menos acentuada nas condições com meio DMEM com soro, indicando que o soro tem efeito protetor contra os efeitos deletérios do aumento da osmolalidade;
 - 5) A adição de Pluronic F68 ao meio HyCD não apresentou mudanças significativas no crescimento ou no metabolismo celular. No entanto, o aumento da concentração de 0 para 0,2% de Pluronic causou um aumento de 70% nos valores de $Y_{LAC/GLC}$;
 - 6) A adição de glutamina apresentou melhores resultados quando feita no meio da fase de crescimento exponencial de cultivos em frascos *Spinner*. A adição de

175 mg/L apresentou aumento de 33% no crescimento celular e redução de 15% no valor de $Y_{LAC/GLC}$. A adição de 350 mg/L, por sua vez, apresentou a menor produção de amônio com redução de 13% no valor de $Y_{NH4/X}$, quando comparada ao ensaio referência;

- 7) A adição de serina ao cultivo durante a fase de crescimento exponencial resultou em maior crescimento celular. A cistina, por outro lado, causou diminuição no crescimento celular;
- 8) A suplementação do meio de cultura com aprotinina aumentou o crescimento e a velocidade específica de crescimento celular em 11 e 5%, respectivamente. A albumina, por sua vez, quando adicionada reduziu estes parâmetros em 105 e 14%, respectivamente. A adição de ambos os suplementos ao meio de cultura teve efeitos similares ao da adição de apenas albumina;
- 9) Os cultivos em biorreator mostram que, sob condições controladas de pH (7,4) e pO_2 (5-50%), o crescimento e a viabilidade celular foram limitados por glicose;
- 10) A disponibilidade de glutamina, serina e cistina não pareceram influenciar o crescimento celular em biorreatores, uma vez que o esgotamento destes aminoácidos não apresentou efeitos significativos no cultivo;
- 11) A via da alanina aminotransferase esteve ativa quando houve excesso de glicose e glutamina no meio de cultura. O esgotamento de um destes substratos causou o aumento da produção de lactato e/ou NH_4^+ ;
- 12) A condição com 30% de oxigênio dissolvido apresentou crescimento e velocidade específica máxima de crescimento celular aproximadamente 20% melhor que as outras condições estudadas;
- 13) A variação de oxigênio dissolvido no sistema causou alterações no metabolismo da glicose, evidenciadas pelas variações nos fatores de conversão de glicose a biomassa ($Y_{X/GLC}$) e de conversão de glicose a lactato ($Y_{LAC/GLC}$);
- 14) Variações nas concentrações iniciais de glutamina (GLN_0) não alteraram a velocidade específica máxima de crescimento. No entanto, o aumento de GLN_0 de 175 para 700 mg/L aumentou em 4,73 vezes o crescimento celular. Por outro lado, o aumento de GLN_0 de 700 para 1050 mg/L, causou uma diminuição de 40% no crescimento;
- 15) As variações em GLN_0 causaram alterações nos metabolismos de glutamina e de glicose, evidenciados pelas mudanças nos valores de $Y_{X/GLC}$ e $Y_{LAC/GLC}$, mostrando que ambos estão interrelacionados;

- 16) Quando variada entre 4 e 17 g/L, a GLC_0 não mostrou efeitos significativos em $\mu_{X,\text{MÁX}}$. Entretanto, a diminuição de 2 para 4 g/L de GLC_0 resultou em uma diminuição de 35% neste parâmetro. Em contrapartida, o crescimento celular mostrou-se diretamente relacionado a GLC_0 , de forma que o aumento de 2 para 17 g/L apresentou um incremento de 11,6 vezes no crescimento celular;
- 17) Não foi possível executar o ensaio em modo perfusão, devido à fragilidade da linhagem celular, a qual apresentou uma diminuição significativa da viabilidade celular em poucas horas de experimento.

b) Conclusões sobre o cultivo da linhagem rSKHep:

- 1) Em um ensaio típico, com meio contendo SFB, a linhagem apresentou $\mu_{X,\text{MÁX}}$ de 0,028 h^{-1} e crescimento celular (ΔX) de $1,46 \times 10^6$ cel/mL. Com relação ao metabolismo celular, a linhagem apresentou $Y_{X/\text{GLC}}$ igual a $3,3 \times 10^8$ cel/g, $Y_{\text{LAC}/\text{GLC}}$ igual a 0,743 g/g e $Y_{\text{NH}_4/X}$ de $2,25 \times 10^{-2}$ mg/ 10^6 células. Com exceção deste último, esse valores foram muitos semelhantes àqueles obtidos no cultivo da linhagem rHeLa com meio com SFB. A concentração máxima de rFVIII obtida foi de 5,27 UI/mL;
- 2) Não foi possível adaptar a linhagem rSKHep ao cultivo em suspensão e a meios isentos de SFB;
- 3) A condição de cultivo em microcarregadores que maximizou a produção de rFVIII por célula foi: 3 cel/mic e 3 gmic/L no sistema. A condição com 1 cel/mic e 3 gmic/L apresentou crescimento celular 20% superior à segunda melhor condição com 3 cel/mic;
- 4) O aumento do número de células por microcarregador de 1 para 8 causou uma diminuição de quase 3 vezes em $Y_{X/\text{GLC}}$. No entanto, $Y_{\text{LAC}/\text{GLC}}$ não foi afetado significativamente por estas variações. O valor de $Y_{\text{NH}_4/X}$, por sua vez, apresentou um aumento de 3,5 vezes.
- 5) O aumento da concentração de microcarregadores adicionados de 3 para 9 g/L provocou uma redução de 15% no crescimento celular, devido ao aumento da frequência de choques entre as partículas. A adição de 15 g/L inibiu completamente o crescimento celular. A produção de rFVIII não foi afetada

significativamente entre 3 e 9 g/L, mas sofreu uma redução de 45%, quando a concentração de microcarregadores aumentou para 15 g/L;

- 6) Os resultados de crescimento celular e de produção de rFVIII foram maximizados em cultivos com 10% de SFB, em comparação com aqueles com 5% de SFB, mostrando o efeito protetor do soro, tanto no que se refere às forças cisalhantes do sistema, como à estabilidade da proteína;
- 7) A partir dos parâmetros estabelecidos com os cultivos em biorreator com as linhagens rHeLa (pO_2) e rSKHep (relação cel/mic e gmic/L), realizou-se com sucesso o cultivo em perfusão. Foi possível manter todos os parâmetros estáveis por quatro tempos de residência;
- 8) O cultivo em perfusão permitiu a maximização da produção de rFVIII, de forma a se obter uma quantidade total de proteína 5,5 vezes superior à condição em batelada. Em termos de produtividade, o ensaio em perfusão apresentou valores 3,5 vezes superiores. Além disso, a proteína ficou menos tempos exposta às condições do cultivo, diminuindo os efeitos de degradação sobre a mesma.

c) Conclusões dos ensaios para determinação de variáveis de operação:

- 1) Os melhores tempos de mistura foram obtidos com impelidores tipo *Rushton*. Fatores como posição de adição do traçador, volume de trabalho, números de impelidores e distância entre eles não apresentaram respostas uniformes e devem ser analisados caso a caso;
- 2) Foram obtidas diversas condições de operação que maximizaram a retenção em *spinfilter* externo. Dentre as variáveis estudadas, a rotação do *spinfilter* mostrou-se crítica, apresentando depósito de partículas e, consequentemente, afetando a homogeneidade do sistema, a 400 rpm.

REFERÊNCIAS*

- ABRANCHES, E.; BEKMAN, E.; HENRIQUE, D.; CABRAL, J. M. S. Expansion of mouse embryonic stem cells on microcarriers. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 1211-1221, 2007.
- ADAMSON, R. Design and operation of recombinant mammalian cell manufacturing process for rFVIII. **Annals of Hematology**, v. 68, p. S9-S14, 1994.
- AGUIAR, M. A. **Estudo cinético de células de *Drosophila melanogaster* transfetadas para a produção da glicoproteína da raiva em biorreator**. 2010. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Essential cell biology**. 3rd ed. New York: Taylor & Francis, 2010.
- ALOI, L. E.; CHERRY, R. S. Cellular response to agitation characterized by energy dissipation at the impeller tip. **Chemical Engineering Science**, v. 51, p. 1523-1529, 1996.
- ALTAMIRANO, C.; PAREDES, C.; CAIRÓ, J. J.; GÒDIA, C. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 69-75, 2000.
- ALTAMIRANO, C.; ILLANES, A.; CASABLANCAS, A.; GÁMEZ, X.; CAIRÓ, J. J.; GÒDIA, C. Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 1032-1041, 2001.
- ALTAMIRANO, C.; PAREDES, C.; ILLANES, A.; CAIRÓ, J. J.; GÒDIA, C. Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 171-179, 2004.
- ALTAMIRANO, C.; ILLANES, A.; BECERRA, S.; CAIRÓ, J. J.; GODIA, F. Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 547-556, 2006.
- ALTAMIRANO, C.; GODIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolismo de células de mamíferos cultivadas *in vitro*. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 81-104.
- AMABLE, P.; BUTLER, M. Cell metabolism and its control in culture. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; BUTLER, M. **Animal cell technology:** from biopharmaceuticals to gene therapy. London: Taylor & Francis, 2008. p. 75-110.
- ANTONE, P. D. Energy metabolism in cancer cells: How to explain the Warburg and Crabtree effects? **Medical Hypotheses**, v. 79, p. 388-392, 2012;
- ATANASSOV, C. L.; SEILER, N.; REBEL, G. Reduction of ammonia formation in cell cultures by L-alanyl-L-glutamine requires optimization of the dipeptide concentration. **Journal of Biotechnology**, v. 62, p. 159-162, 1998.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: informação e documentação: referências:**
elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ATCC. **Misidentified cell lines.** Disponível em: <http://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines/Misidentified_Cell_Lines.aspx>. Acesso em: 31 ago. 2010.

AUGUSTO, E. F. P.; LÉO, P.; SEVERO, A. C. R.; SCHMIDELL, W.; VILAÇA, P. R.; MOZER, O. D.; OLIVEIRA, M.S. A study of the influence of pH and dissolved oxygen concentration on BHK-21 cells growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 1-8, 2000.

AUGUSTO, E. F. P.; OLIVEIRA, M. S. Processos com células animais. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. v. 3. p. 547-582.

AUGUSTO, E. F. P.; BARRAL, M. F.; PICCOLI, R. A. M. Modelos de crescimento e formação de produtos no cultivo de células animais. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 105-119.

AVERY, M.; PLZAK, K.; GASS, J. **The production of recombinant factor VIII.** Process design – Final Report. ChemE 250A. November 25, 2003.

BARNABÉ, N.; BUTLER, M. The effect of glucose and glutamine on the intracellular nucleotide pool and oxygen uptake rate of a murine hybridoma. **Cytotechnology**, v. 34, p. 47-57, 2000.

BATISTA, F. R. X.; MORAES, A. M.; BÜNTEMEYER, H.; NOLL, T. Influence of culture conditions on recombinant Drosophila melanogaster S2 cells producing rabies virus glycoprotein cultivated in serum-free medium. **Biologicals**, v. 37, p. 108-118, 2009.

BERG, T. M.; OYAAS, K.; LEVINE, D. W. Betaine will protect hybridoma cells from hyperosmotic stress. **Biotechnology Techniques**, v. 5, p. 179-182, 1991.

BERRIOS, J., DÍAZ-BARRERA, A., BAZÁN, C., ALTAMIRANO, C. Relationship between tissue plasminogen activator production and specific growth rate in Chinese Hamster Ovary cells cultured in mannose at low temperature. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1493–1497, 2009

BHATTACHARYYA, M. S.; SINGH, J.; SONI, P.; BANERJEE; U. C. Recombinant factor VIII for haemophilia. An overview of production technologies. **CRIPS**, v. 4, p. 2-8, 2003.

BIGGERS, J. D.; McGINNIS, L. K.; LAWITTS, J. A. Enhanced effect of glycyl-L-glutamine on mouse preimplantation em bryos in vitro. **Reproductive medicine online**, v. 9, p. 59-69, 2004.

BIOPLAN ASSOCIATES. A study of Biotherapeutic Developers and Contract Manufacturing Organizations. In: ANNUAL REPORT AND SURVEY OF BIOPHARMACEUTICAL MANUFACTURING CAPACITY AND PRODUCTION, 9, 2012, Rockville, EUA.

BLACK, D. J.; BARFORD, J. P.; HARBOUR, C.; PACKER, N.; FLETCHER, A. Serum content affects the structure and activity of the antibody produced by animal cells in culture. In.: BEUVREY, E. C.; GRIFFITHS, J. B.; ZEIJLEMAKER, W. P. **Animal Cell Technology:** Developments Toward the 21st Century. Netherlands: Springer, 1995, p. 365-369.

BLECKWENN, N. A.; GOLDING, H.; BENTLEY, W. E.; SHILOACH, J. Evaluation of production parameters with the vaccinia virus expression system using microcarrier attached HeLa cells. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 554-556, 2005a.

BLECKWENN, N. A.; GOLDING, H.; BENTLEY, W. E.; SHILOACH, J. Production of recombinant proteins by vaccinia virus in a microcarrier based mammalian cell perfusion bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, p. 663-674, 2005b.

BLÜML, G. **Culture of Animal Cell (Adherent and Suspension Cells) on Microcarriers**. Palestra proferida no curso “*Production of Biopharmaceuticals in Animal cell Cultures*”, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

BOEDEKER, B. G. D. The manufacturing of the recombinant factor VIII, Kogenate. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 6, n. 4, p. 256-260, 1992.

BORYS, M. C.; LINZER, D. I. H.; PAPOUTSAKIS, E. T. Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by Chinese Hamster Ovary cells in a pH-dependent manner. **Biotechnology and Bioengineering**, 1994.

BORYS, M. C.; LINZER, D. I.; PAPOUTSAKIS, E. T. Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Biotechnology (NY)**, v. 11, p. 720-724, 1993.

BOWEN, D. J. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 55, p. 1-18, 2002.

BURGENER, A.; BUTLER, M. Medium Development. In: OZTURK, S. S.; HU, W. S. **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 41-79.

BUTLER, M. **Animal cell culture and technology**. London: BIOS, 2004.

BUTLER, M. Modificações pós-tradução em proteínas recombinantes. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 122-137.

BUTLER, M.; JENKINS, H. Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. **Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 97-110, 1989.

CAPES-DAVIS, A.; THEODOSOPOULOS, G.; ATKIN, I.; DREXLER, H. G.; KOHARA, A.; MACLEOD, R. A. F.; MASTERS, J. R.; NAKAMURA, Y.; REDI, Y. A.; REDDEL, R. R.; FRESHNEY, R. I. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 127, p. 1-8, 2010.

CARRONDO, M. J. T. Animal cell technology in the biopharmaceutical industry. In: **INTERNATIONAL SCHOOL ON PRODUCTION OF BIOLOGICALS USING ANIMAL CELL CULTURE**, 4., 2011, Rio de Janeiro. **Proceedings**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2011.

CARSTENS, J. N.; CLARKE, H. R. G.; JENSEN, J. P. Perfusion! Jeopardy or the ultimate advantage? **Bioprocess International Webinar**, Oct 2009.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A. Processos de separação de células animais. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 288-319.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Universal Data Collection program (UDC) data report**. 2011. Disponível em: <https://www2a.cdc.gov/ncbddd/htcweb/UDC_Report/UDC_Report.asp>. Acesso em: 10 abr. 2013.

CLINKE, M. F.; MÖLLERYD, C.; ZHANG, Y.; LINDSKOG, E.; WALSH, K.; CHOTTEAU, V. Study of a recombinant CHO cell line producing a monoclonal antibody by ATF or TFF external filter perfusion in a WAVE BioreactorTM. In: HAUSER, H. (Ed.). **Proceedings of the the 22nd ESACT Meeting**, v. 5, p. 105-107, 2011. Suppl. 8.

CHA, H. J.; SHIN, H. S.; LIM, H. J.; CHO, H. S.; DALAL, N. N.; PHAM, M. Q.; BENTLEY, W. E. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 225-233, 2005.

CHEN, R. Bacterial expression. Systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1102-1107, 2012.

CHERRY, R. S.; PAPOUTSAKIS, E. T. Physical mechanisms of cell damage in microcarrier cell culture bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 1001-1014, 1988.

CHICO, E.; RODRÍGUEZ, G.; FIGUEREDO, A. Biorreatores para células animais. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 216-254.

CHISTI, Y.; JAUREGUI-HAZA, U. J. Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 143-153, 2002.

CHU, L.; ROBINSON, D. K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 180-187, 2001.

CROUGHAN, M. S. **Hydrodynamic effects on animal cells in microcarrier bioreactors.** 1988. Ph. D. thesis (Chemical Engineering) - University of California at Berkeley, California, 1988.

CROUGHAN, M. S.; HAMEL, J. F. P.; WANG, D. I. C. Effects of microcarrier concentration in animal cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 975-982, 1988.

CRUZ, H. J.; FERREIRA, A. S.; FREITAS, C. M.; MOREIRA, J. L.; CARRONDO, M. J. T. Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 579-585, 1999.

CRUZ, H. J.; FREITAS, C. M.; ALVES, P. M.; MOREIRA, J. L.; CARRONDO, M. J. T. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 43-52, 2000.

ÇELIK, E.; ÇALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1108-1118, 2012.

DALM, M. C. F.; JANSEN, M.; KEIJZER, T. M. P.; VAN GRUNSVEN, W. M. J.; OUDSHOORN, A.; TRAMPER, J.; MARTENS, D. E. Stable hybridoma cultivation in a pilot-scale acoustic perfusion system: Long-term process performance and effect of recirculation rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 91, p. 894-900, 2005.

DAVIS, K. M.; BRIGSTOCK, D. R.; JOHNSON, P. R.; CRISSMAN-COMBS, M. A.; MCCARTHY, D. W.; DOWNING, M. T.; BESNER, G. E. Production of glycosylated heparin-binding EGF-like growth factor in HeLa cells using vaccinia virus. **Protein Expression and Purification**, v. 8, p. 57-67, 1996.

DESAINTES, C.; DEMERET, C.; GOYAT, S.; YANIV, M.; THIERRY, F. Expression of papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. **The EMBO Journal**, v. 16, p. 504-514, 1997.

DEZENGOTITA, V. M.; KIMURA, R.; MILLER, W. M. Effects of CO₂ and osmolality on hybridoma cells: growth, metabolism and monoclonal antibody production. **Cytotechnology**, v. 28, p. 213-227, 1998.

DEZENGOTITA, V. M.; SCHMELZER, A .E.; MILLER, W. M. Characterization of hybridoma cell responses to elevated pCO₂ and osmolality: Intracellular pH, cell size, apoptosis and metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 360-380, 2002.

DIAZ-RUIZ, R.; RIGOULET, M.; DEVIN, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 568-576, 2011.

DOVERSKOG, M.; LJUNGGREN, J.; ÖHMAN, L.; HÄGGSTRÖM, L. Physiology of cultured animal cells. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 103-115, 1997.

DOWD, J. E.; WEBER, I.; RODRIGUEZ, B.; PIRET, J. M.; KWOK, K. E. Predictive controlo f hollow-fiber bioreactors for the production of monoclonal antibodies. **Biotechnology and bioengineering**, v. 63, p. 484-492, 1999.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. **Cell and tissue culture:** laboratory procedures in biotechnology. England: John Wiley and Sons, 1999.

DRUGMAND, J. C.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cells as factories for biomanufacturing. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1140-1157, 2012.

DUCOMMUN, P.; RUFFIEUX, P. A.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I. The role of vitamins and amino acids on hybridoma growth and monoclonal antibody production. **Cytotechnology**, v. 37, p. 65-73, 2001.

DUPONT. **History of biotechnology.** Disponível em <http://www2.dupont.com/Biotechnology/en_US/intro/history.html>. Acesso em: 30 mar. 2013.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 700-707, 2009.

DUVAL, D.; DEMANGEL, C.; MUNIERJOLAIN, K.; MIOSSEC, S.; GEAHEL, I. Factors controlling cell-proliferation and antibody-production in mouse hybridoma cells. I. Influence of the amino acid supply. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 561-570, 1991.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v. 122, p. 501-504, 1955.

EIBL, R.; KAISER, S.; LOMBRISE, R.; EIBL, D. Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 41-49, 2010.

EL-ENSAHSY, H. A.; ABDEEN, A.; ABDEEN, S.; ELSAYED, E. A.; DEMELLAWY, M. E.; EL-SHEREEF, A. A. Serum concentration effects on the kinetics and metabolism of HeLa-S3 cell growth and cell adaptability for successful proliferation in serum free medium. **World Applied Sciences Journal**, v. 6, p. 608-615, 2009.

ENFORS, S. O.; JAHIC, M.; ROZKOV, A.; XU, B.; HECKER, M.; JÜRGGEN, B.; KRÜGER, E.; SCHWEDER, T.; HAMER, G.; O'BEIRNE, D.; NOISSOMMIT-RIZZI, N.; REUSS, M.; BOONE, L.; HEWITT, C.; MCFARLANE, C.; NIENOW, A.; KOVACS, T.; TRÄGARDH, C.; FUCHS, L.; REVSTEDT, J.; FRIBERG, P. C.; HJERTAGER, B.; BLOMSTEN, G.; SKOGMAN, H.; HJORT, S.;

HOEKS, F.; LIN, H. Y.; NEUBAUER, P.; VAN DER LARS, R.; LUYBEN, K.; VRABEL, P.; MANELIUS, A. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 85, p. 175-185, 2001.

ERIKSON, R. K.; FENGE, C.; LINDNER-OLSSON, E.; LJUNGQVIST, C.; ROSENQUIST, J.; SMEDS, A. L.; ÖSTLIN, A.; CHARLEBOIS, T.; MEONARD, M.; KELLEY, B. D.; LJUNGQVIST, A. The manufacturing process for B-Domain deleted recombinant factor VIII. **Seminars in Hematology**, v. 38, p. 24-31, 2001. Suppl. 4.

FAHRNER, R. L.; KNUDSEN, H. L.; BASEY, C. D.; GALAN, W.; FEUERHELM, D.; VANDERLAAN, M.; BLANK, G. S. Industrial purification of pharmaceutical antibodies: Development, operation, and validation of chromatography processes. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 18, p. 301-327, 2001.

FATOUROS, A.; OSTERBERG, T.; MIKAELSSON, M. Recombinant factor VIII SQ – Influence of oxygen, metal ions, pH and ionic strength on its stability in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 155, p. 121-131, 1997.

FAY, P. J.; ANDERSON, M. T.; CHAVIN, S. I.; MARDER, V. J. The size of human factor VIII heterodimers and the effects produced by thrombin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 371, p. 268-278, 2001.

FENG, Q.; MI, L.; LI, L.; RONG, L.; XIE, L.; TANG, H.; CHEN, Z. Application of “oxygen uptake rate-amino acids” associated mode in controlled-fed perfusion culture. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 422-430, 2006.

FENGE, C.; KLEIN, C.; HEUER, C.; SIEGEL, U.; FRAUNE, E. Agitation, aeration and perfusion modules for cell culture bioreactors. **Cytotechnology**, v. 11, p. 233-244, 1993.

FENGE, C.; LÜLLAU, E. Cell culture bioreactors. In: OZTURK, S. S.; HU, W. S. **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 155-224.

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 416-421, 2010.

FERRER-MIRALLES, N., DOMINGO-ESPÍN, J., CORCHERO, J. L., VÁZQUEZ, E., VILLAVERDE, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial cell factories**, v. 8, p. 1-8, 2009.

FIGUEREDO-CARDERO, A. **Filtros de malha rotativa internos e externos como dispositivos de retenção de células animais:** um estudo com o auxílio de velocimetria por imagem de partículas e fluidodinâmica computacional. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

FISCHER, A. C.; HAITJEMA, C. H.; GUARINO, C.; CELIK, E.; ENDICOTT, C. E.; READING, C. A.; MERRITT, J. H.; PTAK, A. C.; ZHANG, S.; DELISA, M. P. Production of secretory and extracellular N-linked glycoproteins in *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, p. 871-881, 2011.

FITZPATRICK, L.; JENKINS, H. A.; BUTLER, M. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, p. 93-116, 1993.

FLIEDL, L.; KAISERMAYER, C. Transient gene expression in HEK293 and vero cells immobilized on microcarriers. **Journal of Biotechnology**, v. 153, p. 15-21, 2011.

FOUNTOULAKIS, M.; TSANGARIS, G.; OH, J.; MARIS, A.; LUBEC, G. Protein profile of the HeLa cell line. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, p. 247-265, 2004.

FRANCHINI, M.; TAGLIAFERRI, A.; MENGOLI, C.; CRUCIANI, M. Cumulative inhibitor incidence in previously untreated patients with severe hemophilia A treated with plasma-derived versus recombinant factor VIII concentrates: A critical systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 81, p. 82-93, 2012.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 34, p. 229-237, 2001.

FRAZZATI-GALLINA, N. M.; PAOLI, R. L.; MOURÃO-FUCHES, R. M.; JORGE, S. A. C.; PEREIRA, C.A. High production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 67-72, 2001.

FRAZZATI-GALLINA, N. M.; MOURÃO-FUCHES, R. M.; PAOLI, R. M.; SILVA, M. L.; MIYAKI, C.; VALENTINI, E. J.; RAW, I.; HIGASHI, H. C. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. **Vaccine**, v. 23, p. 511-517, 2004.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 5. ed. Hoboken: John Wiley and Sons, 2005.

GAMBHIR, A.; ZHANG, C.; EUROPA, A.; HU, W. S. Analysis of the use of fortified medium in continuous culture of mammalian cells. **Cytotechnology**, v. 31, p. 243-254, 1999.

GAWLITZEK, M.; RYLL, T.; LOFGREN, J.; SLIWOWSKI, M. B. Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 637-646, 2000.

GAWLITZEK, M.; VALLEY, U.; NIMTZ, M.; WAGNER, R.; CONRADT, H. S. Characterization of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 42, p. 117, 131, 1995.

GE HEALTHCARE. **Microcarrier cell culture. Principles and Methods**, 2005.

GÓDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Cell Metabolism. In: OZTURK, S. S.; HU, W. S. **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 81-112.

GOMPERTS, E.; LUNDBLAD, R.; ADAMSON, R. The manufacturing process of recombinant factor VIII, Recombinate. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 6, n. 4, p. 247-251, 1992.

GORJÃO, R. Contagem de células. In: CURI, R.; PERES, C. M. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 22-24.

GOUDAR, C.; BIENER, R.; BOISART, C.; HEIDEMANN, R.; PIRET, J.; DE GRAAF, A.; KONSTANTINOV, K. Metabolic flux analysis of CHO cells in perfusion culture by metabolite balancing and 2D [¹³C, ¹H] COSY NMR spectroscopy. **Metabolic Engineering**, v. 12, p. 138-129, 2010.

GUH, S.; GROSSE, S. D.; MCALLISTER, S.; KESSLER, C. M.; SOUCIE, J. M. Costs of care for privately insured males with hemophilia in the United States. Abstracts of the Hemostasis &

Thrombosis Research Society, 2011 Annual Scientific Symposium, April 28-30, Northwestern Memorial Hospital, Chicago, IL. **Haemophilia**, v. 17, p. 566, 2011

HACKER, D. L., DE JESUS, M., WURM, F. M. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells – Where do we go from here ? **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 1023-1027, 2009.

HAGGSTRÖM, L.; LJUNGGREN, J.; OHMAN, L. Metabolic engineering of animal cells. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 782, p. 40-52, 1996.

HARCUM, S. W. Protein Glycosylation. In: OZTURK, S. S.; JU, W. S. **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 113-153.

HASSELL, T.; GLEAVE, S.; BUTLER, M. Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, p. 29-41, 1991.

HAYASHI, I.; SATO, G. H. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. **Nature**, v. 259, p. 132-134, 1976.

HAYTER; P. M.; CURLING, E. M.; BAINES, A. J.; JENKINS, N.; SALMON, I.; STRANGE, P. G.; TONG, J. M.; BULL, A. T. Glucose-limited chemostat culture of Chinese hamster ovary cells producing recombinant human interferon-gamma. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 327-335, 1992.

HAYTER, P. M.; CURLING, E. M.; GOULD, M. L.; BAINES, A. J.; JENKINS, N.; SALMON, I.; STRANGE, P. G.; BULL, A. T. The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-gamma production in glucose-limited chemostat culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 1077-1085, 1993.

HENDRICK, V.; SOUZA, D. R.; PEDREGAL, A. R. S.; BASSENS, C.; RIGAUX, P.; SATO, K.; KOTARSKY, K.; WERENNE, J. Expression of recombinant protein in CHO and HeLa cells and its follow-up using EGF reporter gene. In: IIJIMA, S.; NISHIJIMA, K. I. **Animal cell technology: basic & applied aspects**. Netherlands: Springer, 2006. p. 55-59.

HENRY, O.; PERRIER, M.; KAMEN, A. Metabolic flux analysis of HEK-293 cells in perfusion cultures for the production of adenoviral vectors. **Metabolic Engineering**, v. 7, p. 467-476, 2005.

HEPCENTRO. Avaliação hepática inicial. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/avaliacaohepaticainicial.htm>>. Acesso em: 05 abr. 2013.

HERLITSCHKA S. E.; SCHLOKAT, U.; FALKNER, F. G.; DORNER F. High expression of a B-domain deleted factor VIII gene in a human hepatic cell line. **Journal of Biotechnology**, v. 61, p. 165-173, 1998.

HUFFORD, K. **Comparison of the growth and monoclonal antibody production of suspended mammalian cells in three perfusion systems**. Masters thesis (Biological Engineering) - Massachusetts Institute of Technology, Massachusetts, 2007.

INFOMÉDICA. Coagulação Sanguínea. Disponível em: <http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Coagula%C3%A7%C3%A3o_Sangu%C3%ADnea>. Acesso em: 05 abr. 2013.

JAN, D. C. H.; PETCH, D. A.; HUZEL, N.; BUTLER, M. The effect of dissolved oxygen on a metabolic profile of a murine hybridoma grown in serum-free medium in continuous culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, p. 153-164, 1997.

JARDON, M. A.; SATTHA, B.; BRAASCH, K.; LEUNG, A. O.; CÔTÉ, H.C.F.; BUTLER, M.; GORSKI, S. M.; PIRET, J. M. Inhibition of glutamine-dependent autophagy increases t-PA production in CHO cell fed-batch processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 1228-1238, 2012.

JENKINS, N.; CURLING, E. M. A. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 354-364, 1994.

JENTOFT, N. Why are proteins O-glycosylated ? **Trends in Biochemistry Science**, v. 15, p. 291-294, 1990.

JEONG, Y. H.; WANG, S. S. Role of glutamine in hybridoma cell culture: effects on cell growth, antibody production, and cell metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 47-55, 1995.

JIANG, R.; MONROE, T.; MCROGERS, R.; LARSON, J. Manufacturing challenges in the commercial production of recombinant coagulation factor VIII. **Haemophilia**, v. 8, p.1-5, 2002. Supplement s2

KARLMAN, M.; HOLMSTRÖM, M.; WIMAN, B. A new method measuring the interaction between von Willebrand factor and coagulation factor VIII. **Thrombosis Research**, v. 127, p. 47-50, 2011.

KAUFMAN, R. J.; WASLEY, L. C.; DORNER, A. J. Synthesis, processing and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 6352-6362, 1988.

KAUFMAN, R. J.; WASLEY, L. C.; DAVIES, M. V.; WISE, R. J.; ISRAEL, D. I.; DOMER, A. J. Effect of von Willebrand factor coexpression on the synthesis and secretion of factor VIII in Chinese Hamster Ovary cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, p. 1233-1242, 1989.

KIMURA, R.; MILLER, W. M. Effects of elevated pCO₂ and/or osmolality on the growth of recombinant tPA production of CHO cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, p. 152-160, 1996.

KIRSCH, P.; HAFNER, M.; ZENTGRAF, H.; SCHILLING, L. Time course of fluorescence intensity and protein expression in HeLa cells stably transfected with hrGFP. **Molecules and Cells**, v. 15, p. 341-348, 2003.

KNIBBS, R. N.; DAME, M.; ALLEN, M. R.; DING, Y.; HILLEGAS, W. J.; VARANI, J.; STOOLMAN, L. M. Sustained high-yield production of recombinant proteins in transiently transfected COS-7 cells grown on trimethylamine-coated (hillex) microcarrier beads. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 9-13, 2003.

KOLIND, M. P.; NORBY, P. L.; BERCHTOLD, M. W.; JOHNSEN, L. B. Optimisation of the factor VIII yield in mammalian cell cultures by reducing the membrane bound fraction. **Journal of Biotechnology**, v. 151, p. 357-362, 2011.

KONSTANTINOV, K. Development of processes for manufacturing of therapeutic proteins In: INTERNATIONAL SCHOOL ON PRODUCTION OF BIOLOGICALS USING ANIMAL CELL CULTURE, 3., 2008, Rio de Janeiro. **Proceedings**: UFRJ, 2008.

KUNAS, K. T.; PAPOUTSAKIS, E. T. Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 476-483, 1990a.

KUNAS, K. T.; PAPOUTSAKIS, E. T. The protective effect of serum against hydrodynamic damage of hybridoma cells in agitated and surface-aerated bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 57-70, 1990b,

KUNKEL, J. P.; JAN, D. C.; JAMIESON, J. C.; BUTLER, M. Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. **Journal of Biotechnology**, v. 62, p. 55-71, 1998.

KURANO, N.; LEIST, C.; MESSI, F.; KURANO, S.; FIECHTER, A. Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor: 1. effects of physical and chemical environments. **Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 101-112, 1990.

KYUNG, Y. S.; HU, W. S. Enhanced productivity of protein C by recombinant human cells in automated fed-batch cultures. **Cytotechnology**, v. 17, p. 109-115, 1995.

LACROIX-DESMAZES, S.; NAVARRETE, A. M.; ANDRÉ, S.; BAYRY, J.; KAVERI, S. V.; DASGUPTA, S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. **Blood**, v. 112, p. 240-249, 2008.

LANTIERI, V. S. **Cultivo de célula ST em microcarregadores, em sistema de spinner e de biorreator bubble-free**. 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LAO, M. S.; TOTH, D. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese Hamster Ovary cell culture. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 688-691, 1997.

LeFLOCHE, F.; TESSIER, B.; CHENUET, S.; GUILLAUME, J. M.; CANS, P.; GOERGEN, J. L.; MARC, A. Related effects of cell adaptation to serum-free conditions on murine EPO production and glycosylation by CHO cells. **Cytotechnology**, v. 52, p. 39-53, 2006.

LENAS, P.; KITADE, T.; WATANABE, H.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Adaptive fuzzy control of nutrients concentration in fed-batch culture of mammalian cells. **Cytotechnology**, v. 25, p. 9-15, 1997.

LENTING, P. J.; VAN MOURIK, J.A.; MERTENS, K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. **Blood**, v. 92, p. 3983-3996, 1998.

LÉO, P.; GALESI, A. L. L.; SUAZO, C. A. T.; MORAES, A. M. Células animais: Conceitos básicos. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R.; **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 15-41.

LIN, A. A.; KIMURA, R.; MILLER, W. M. Production of tPA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 339-350, 1993.

LINK, T.; BÄCKSTRÖM, M.; GRAHAM, R.; ESSERS, R.; ZÖRNER, K.; GÄTGENS, J.; BURCHELL, J.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.; HANSSON, G. C.; NOLL, T. Bioprocess development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 51-62, 2004.

LJUNGREEN, J; HÄGGSTRÖM, L. Glutamine limited fed-batch culture reduces ammonium ion production in animal cells. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 705-710, 1990.

LOLLAR, P.; PARKER, C. G.; TRACY, R. P. Molecular characterization of commercial porcine factor VIII concentrate. **Blood**, v. 71, p. 137-143, 1988.

LU, S.; SUN, X.; ZHANG, Y. Insight into metabolism of CHO cells at low glucose concentration on the basis of the determination of intracellular metabolites. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1917-1921, 2005.

LUAN, Y. T.; MUTHARASAN, R.; MAGEE, W. E. Strategies to extend longevity of hybridomas in culture and promote yield of monoclonal antibodies. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 691-696, 1987.

LUSHER, J. M.; SCHARRER, I. Evolution of recombinant factor VIII safety: KOGENATE® and Kogenate® FS/BAYER. **International Journal of Hematology**, v. 90, p. 446-454, 2009.

MA, N.; MOLLET, M.; CHALMERS, J. J. Aeration, mixing and hydrodynamics in bioreactors. In: OZTURK, S.S.; HU, W.S. **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 225-248.

MANCO-JOHNSON, M. J.; ABSHIRE, T. C.; SHAPIRO, A. D.; RISKE, B.; HACKER, M. R.; KILCOYNE, R.; INGREM, J. D.; MANCO-JOHNSON, M. L.; FUNK, S.; JACONSON, L.; VALENTINO, L. A.; HOOTS, W. K.; BUCHANAN, G. R.; DIMICHELE, D.; RECHT, M.; BROWN, D.; LEISSINGER, C.; BLEAK, S.; COHEN, A.; MATHEW, P.; MATSUNAGA, A.; MEDEIROS, D.; NUGENT, D.; THOMAS, G.A.; THOMPSON, A. A., MCREDMOND, K.; SOUCIE, J. M.; AUSTIN, H.; EVATT, B. L. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 535-544, 2007.

MASTERS, J. R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature**, v. 2, p. 315-319, 2002.

McMURRAY-BEAULIEU, V.; HISIGER, S.; DURAND, C.; PERRIER, M.; JOLICOEUR, M. Na-butyrate sustains energetic states of metabolism and t-PA productivity of CHO cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, p. 160-167, 2009.

MEI, B.; CHEN, Y.; CHEN, J.; PAN, C. Q.; MURPHY, J.E. Expression of human coagulation factor VIII in a human hybrid cell line, HKB11. **Molecular Biotechnology**, v. 34, p. 165-178, 2006.

MEIER, S. J.; HATTON, T. A.; WANG, D. I. C. Cell death from bursting bubbles: role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, p. 468-478, 1999.

MEHTA, A.; TSE, L. M.; FOGLE, J.; LEN, A.; SHRESTHA, R.; FONTES, N.; LEBRETON, B.; WOLK, B.; VAN REIS, R. Purifying monoclonal antibodies. **Chemical Engineering Progress**, v. 104, p. S14-S20, 2008.

MIAO, H. Z.; SIRACHAINAN, N.; PALMER, L.; JUCAB, P.; CUNNINGHAM, M.A.; KAUFMAN, R.J.; PIPE, S.W. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. **Blood Journal**, v. 103, p. 3412-3419, 2004.

MICHELETTI, M.; BARRETT, T.; DOIG, S. D.; BAGANZ, F.; LEVY, M. S.; WOODLEY, J. M.; LY, G. J. Fluid mixing in shaken bioreactors: Implications for scale-up predictions from microliter-scale microbial and mammalian cell cultures. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 2939-2949, 2006.

MILLER, W. M.; WILKE, C. R.; BLANCH, H. W. Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma cell growth and metabolism in continuous culture. **Journal of Cellular Physiology**, v. 132, p. 524-530, 1987.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hemofilia congênita e inibidor:** manual de diagnóstico e tratamento de eventos hemorrágicos. Brasília/DF, 2009.

MIRRO, R.; VOLL, K. Which impeller is right for your cell line? **BioProcess International**, v. 7, p. 52-57, 2009.

MIZRAHI, A. Oxygen in human lymphoblastoid cell line cultures and effect of polymers in agitated and aerated cultures. **Developments in Biological Standardization**, v. 55, p. 93-102, 1984.

MORAES, A. M. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Meios de cultura para células animais. In.: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais:** de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Ed. Roca, 2008. p. 105-121.

MORAES, A. M. M.; JORGE, S. A. C.; ASTRAY, R. M.; SUAZO, C. A. T.; RIQUELME, C. E. C.; AUGUSTO, E. F. P.; TONSO, A.; PAMBOUKIAN, M. M.; PICCOLI, R. A. M.; BARRAL, M. F.; PEREIRA, C. A. *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: from gene cloning to bioprocess development. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 613-628, 2012.

MUSCHEL, R. J.; ZHANG, H. B.; ILIAKIS, G.; MCKENNA, W. G. Cyclin B expression in HeLa cells during the G2 block induced by ionizing radiation, **Cancer Research**, v. 51, p. 5113-5117, 1991.

MUKHOPADHYAY, A.; MUKHOPADHYAY, S. N.; TALWAR, G. P. Influence of serum proteins on the kinetics of attachment of vero cells to cytodex microcarriers. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 56, p. 369-374, 1993.

MURHAMMER, D. W.; GOOCHEE, C. F. Sparged animal cell bioreactors: Mechanism of cell damage and Pluronic F68 protection. **Biotechnology Progress**, v. 6, p. 391-397, 1990.

MUTHING, J.; KEMMINER, S. E.; CONRADT, H. S.; SAGI, D.; NIMTZ, M.; KARST, U.; PETER-KATALINIC, J. Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, p. 321-334, 2003.

NEERMANN, J.; WAGNER, R. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 166, p. 152-169, 1996.

NI, Y.; CHEN, R. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1661-1670, 2009.

NISHIKAWA, M.; HUANG, L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. **Human Gene Therapy**, v. 12, p. 861-870, 2001.

NIVITCHANYONG, T.; MARTINEZ, A.; ISHAQUE, A.; MURPHY, J. E.; KONSTANTINOV, K.; BETENBAUGH, M. J.; THRIFT, J. Anti-apoptotic genes Aven and E1B-19K enhance performance of BHK cells engineered to express recombinant factor VIII in batch and low perfusion cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, p. 825-841, 2007.

OGAWA, T.; KAMIHIRA, M.; YOSHIDA, H.; IIJIMA, S.; KOBAYASHI, T. Effect of dissolved oxygen concentration on monoclonal antibody production in hybridoma cell cultures. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, p. 372-378, 1992.

OLEJNIK, A.; GRAJEK, W.; MARECIK, R. Effect of hyperosmolarity on recombinant protein productivity in baculavirus expression system. **Journal of Biotechnology**, v. 102, p. 291-300, 2003.

OZTURK, S. S. Cell culture technology – An overview. In: OZTURK, S.S.; HU, W.S. **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 1-13.

OZTURK S. S.; PALSSON, B. O. Effect of initial density on hybridoma growth, metabolism, and monoclonal antibody production. **Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 259-278, 1990.

OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Physiological changes during the adaptation of hybridoma cells to low serum and serum-free media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 35-46, 1991a.

OZTURK, S. S.; PALSSON, B. O. Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism and antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 989-993, 1991b.

OZTURK, S. S.; RILEY, M. R.; PALSSON, B. O. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism and antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 418-431, 1992.

PAPOUTSAKIS, E. T. From CHO-cell to Stem-cell biotechnology: Oxygenation, and mixing in animal-cell culture: Bioreactors, bubbles and cell injury. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 977-979, 2009.

PÉREZ-GOMEZ, F.; BOVER, R. The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage. **Revista Española de Cardiología**, v. 60, p. 1217-1219, 2007.

PETCH, D.; BUTLER, M. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: Glucose and glutamine utilization. **Journal of Cellular Physiology**, v. 161, p. 71-76, 1994.

PHILLIPS, B. W.; HORNE, R.; LAY, T. S.; RUST, W. L.; TECH, T.T.; CROOK, J.M. Attachment and growth of human embryonic stem cells on microcarriers. **Journal of Biotechnology**, v. 138, p. 24-32, 2008.

PICANÇO, V. P.; COVAS, D. T.; BECKER, S.; TONN, T. Produção de FVIII por engenharia genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 32, p. 81-83, 2004.

PICANÇO, V.; HEINZ, S.; BOTT, D.; BEHRMANN, M.; COVAS, D. T.; SEIFRIED, E.; TONN, T. Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. **Cytotherapy**, v. 9, p. 785-794, 2007.

PIPE, S. W. Recombinant clotting factor. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, p. 840-850, 2008.

RAMIREZ, O. Princípios e aplicações del sistema de expressión de células de insecto-baculovírus. In: **Production of Biopharmaceuticals in Animal Cell Culture**, CBAA Course, Rio de Janeiro, R.J., Brasil, jul. 2004.

REITZER, L. J.; WICE, B. M.; KENNELL, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 8, p. 2669-2676, 1979.

REITZER, L. J.; WICE, B.M.; KENNELL, D. The pentose cycle: control and essential function in HeLa cell nucleic acid synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, p. 5616-5626, 1980.

RESENDE, M. A. A.; SILVA, E. V. Administração de fatores de coagulação: quais as evidências? **Medicina Perioperatória**, v. 42, p. 335-341, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** Campinas: Cárita Editora, 2005.

RODRÍGUEZ, G.; ARIAS, M. A.; SUAREZ, J.; CHEA, M.; BOUZÓ, L.; CUERVO, R.; ALVAREZ, I.; CHICO, E. Optimizing cultivation strategies in different scales of hollow fiber bioreactors. In: GÓDIA, F.; FUSSENEGGER, M. (Ed.). PROCEEDING OF THE THE 18TH ESACT MEETING, v. 2, p. 747-750, 2005.

ROSA, N. G.; SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; NETO, M. A. S.; CASTILHO-FERNANDES, A.; FAÇA, V. M.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T. SK-HEP cells and lentiviral vector for production of human recombinant factor VIII. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 1435-1443, 2012.

RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; PICANÇO-CASTRO, V.; ALVES, D. C. C.; FERNANDES, A. C.; ALMEIDA-PORADA, G.; TONN, T.; COVAS, D. T. Integration pattern of HIV-1 based lentiviral vector carrying recombinant coagulation factor VIII in Sk-Hep and 293T cells. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 23-31, 2011.

SCHMELZER, A. E.; DEZENGOTITA, V. M.; MILLER, W. M. Considerations for osmolality measurement under elevated pCO₂: Comparison of vapor pressure and freezing point osmometry. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, p. 189-196, 2000.

SCHMELZER, A. E.; MILLER, W. M. Hyperosmotic stress and elevated pCO₂ alter monoclonal antibody charge distribution and monosaccharide content. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 346-353, 2002.

SCHNEIDER, M.; REYMOND, F.; MARISON, I. W.; VON STOCKAR, U. Bubble-free oxygenation by means of hydrophobic porous membranes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 839-847, 1995.

SEEWOSTER, T.; LEHMANN, J. Influence of targeted asparagine starvation on extra and intracellular amino acid pools of cultivated Chinese Hamster Ovary cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 344-350, 1995.

SELVARAJ, S. R.; SCHELLER, A. N.; MIAO, H. Z.; KAUFMAN, R. J.; PIPE, S. W. Bioengineering of coagulation factor VIII for efficient expression through elimination of a dispensable disulfide loop. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 10, p. 107-115, 2011.

SEN, S.; ROYCHOUDHURY, P. K. Development of optimal medium for production of commercially important monoclonal antibody 520C9 by hybridoma cell. **Cytotechnology**, v. 65, p. 233-252, 2013.

SETHURAMAN, N.; STADHEIM, T. A. Challenges in therapeutic glycoprotein production. **Current opinion in biotechnology**, v. 17, p. 341-346, 2006.

SHUKLA, A. A.; GOTTSCHALK, U. Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing. **Trends in biotechnology**, v. 31, p. 147-154, 2013.

SINACORE, M. S.; DRAUPEAU, D.; ADAMSON, S. R. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. In: JENKINS, N. (Ed.). **Methods in biotechnology**. Nova Jersey: Humana Press, 2000. v. 8, p. 11-22.

SOUKHAREV, S.; HAMMOND, D.; ANANYEVA, N. M.; ANDERSON, J. A. M.; HAUSER, C. A. E.; PIPE, S.; SAENKO, E. L. Expression of factor VIII in recombinant and transgenic systems. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 28, n. 2, p. 234-248, 2002.

SPENCER, H. T.; DENNING, G.; GAUTNEY, R. E.; DROPULIC, B.; ROY, A.J.; BARANYI, L.; GANGADHARAN, B.; PARKER, E. T.; LOLLA, P.; DOERING, C. B. Lentiviral vector platform for production of bioengineered recombinant coagulation factor VIII. **Molecular Therapy**, v. 19, p. 302-309, 2011.

STONEBRAKER, S. A.; BROOKER, M.; AMAND, R. E.; FARRUGIA, A.; SRIVASTAVA, A. A study of reported factor VIII use around the world. **Haemophilia**, v. 16, p. 33-46, 2010.

STORZ, U. The Cabilly patents. **mAbs**, v. 4, p. 274-280, 2012.

STREET, J. C.; DELORT, A. M.; BRADDOCK, P. S. H.; BRINDLE, K. M. A $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ n.m.r. study of nitrogen metabolism in cultured mammalian cells. **Biochemistry Journal**, v. 291, p. 485-492, 1993.

SUN, X.; ZHANG, Y. Glutamine cannot support recombinant CHO cell growth and maintenance in the absence of glucose. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 717-720, 2004.

SUNG, Y. H.; SONG, Y. J.; LIM, S. W.; CHUNG, J. Y.; LEE, G. M. Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneity and biological activity of human thrombopoietin by recombinant Chinese Hamster Ovary cells. **Journal of Biotechnology**, v. 112, p. 323-335, 2004.

SUNLEY, K.; THARMALINGAM, T.; BUTLER, M. CHO cells adapted to hypothermic growth produce high yields of recombinant β -interferon. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 898-906, 2008.

SWIECH, K.; KAMEN, A.; ANSORGE, S.; DUROCHER, Y.; PICANÇO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; NETO, M. S. A.; COVAS, D. T. Transient transfection of serum-free suspension HEK293 cell culture for efficient production of human FVIII. **BMC Biotechnology**, v. 11, p. 114-124, 2011.

SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; COVAS, D. T. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. **Protein Expression and Purification**, v. 84, p. 147-153, 2012.

TAGLIAVACCA; L.; WANG, Q.; KAUFMAN, R. J. ATP- dependent dissociation of non-sulfide-linked aggregates of coagulation factor VIII is a rate- limiting step for secretion. **Biochemistry**, v. 39, p. 1973-1981, 2000.

TAKAGI, M.; MORIYAMA, T.; YOSHIDA, T. Effects of shifts up and down in osmotic pressure on production of tissue plasminogen activator by Chinese Hamster Ovary cells in suspension. **Journal of Biosciences and Bioengineering**, v. 91, p. 509-514, 2001.

TASHIRO, S.; TSUMOTO, K.; SANO, E. Establishment of a microcarrier culture system with serial sub-cultivation for functionally active human endothelial cells. **Journal of Biotechnology**, v. 160, p. 202-213, 2012.

TONN, T.; HERDER, C.; BECKER, S.; SEIFRIED, E.; GREZ, M. Generation and characterization of human hematopoietic cell lines expressing human factor VIII. **Journal of Hematotherapy & stem Cell Research**, v. 11, p. 695-704, 2002.

TOP1000BIO. Atualização de 14/1/2013. Disponível em <<http://www.top1000bio.com/>>. Acesso em: 18 abr. 2013.

TRABELSI, K.; ROUROU, S.; LOUKIL, H.; MAJOU, S.; KALLEL, H. Comparison of various culture modes for the production of rabies virus by Vero cells grown on microcarriers in a 2-l bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 514-519, 2005.

TRILL, J. J.; SHATZMAN, A. R.; GANGULY, S. Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 553-560, 1995.

TSAO, Y. S.; CARDOSO, A. G.; CONDON, R. G. G.; VOLOCH, M.; LIO, P.; LAGOS, J. C.; KEARNS, B. G.; LIU, Z. Monitoring Chinese Hamster Ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. 316-327, 2005.

VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K.; FEX SVENNINGSSEN, A.; HONEGGER, P.; KNUDSEN, L. E.; LINDL, T.; NORABERG, J.; PRICE, A.; SCARINO, M. L.; GSTRAUNTHALER, G. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in vitro**, v. 24, p. 1053-1063, 2010.

VAN DER VELDEN-DE GROOT, C. A. M. Microcarrier technology, present status and perspective. **Cytotechnology**, v. 18, p. 51-56, 1995.

VAN WEZEL. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. **Nature**, v. 216, p. 64-66, 1967.

VERMA, A. S.; AGRAHARI, S.; RASTOGI, S.; SINGH, A. Biotechnology in the realm of history. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, p. 321-323, 2011

VERMASVUORI, R.; KOSHINEN, J.; SALONEN, K.; SIRÉN, N.; WEEGAR, J.; DAHLBACKA, J.; KALKKINEN, N.; VON WEYMARN, N. Production of recombinant HIV-1 Nef protein using different expression host systems: A techno-economical comparison. **Biotechnology Progress**, v. 25, p. 95-102, 2009.

VOIGT, A.; ZINTL, F. Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers. **Journal of Biotechnology**, v. 68, p. 213-226, 1999.

VOISARD, D.; MEUWLY, F.; RUFFIEUX, P. A.; BAER, G.; KADOURI, A. Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. **Biotechnology and Bionengineering**, v. 82, p. 751-765, 2003.

VRIEZEN, N.; ROMEIN, B.; LUYBEN, K. C. A. M.; VAN DIJKEN, J. P. Effects of glutamine supply on growth and metabolism of mammalian cells in chemostat culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, p. 272-286, 1997.

WACKER, M.; LINTON, D.; HITCHEN, P. G.; NITA-LAZAR, M.; HASLAM, S. M.; NORTH, S. J.; PANICO, M.; MORRIS, H. R.; DELL, A.; WREN, B. W.; AEBI, M. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer to *E. coli*. **Science**, v. 298, p. 1790-1793, 2002.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 917-924, 2010.

WANG, W.; WANG, Y. J.; KELNER, D. N. Coagulation factor VIII: structure and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 259, p. 1-15, 2003.

WANG, Y.; OUYANG, F. Recycle of cytodex 3 in vero cell culture. **Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 207-210, 1999.

WHITE, G. C.; PICKENS, E. M.; LILES, D. K.; ROBERTS, H. R. Mammalian recombinant coagulation proteins: Structure and function. **Transfusion Science**, v. 19, p. 177-189, 1998.

WILKENS, C. A.; ALTAMIRANO, C.; GERDTZEN, Z. P. Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 714-724, 2011.

WILSON, G.; KNUDSEN, I. M. NOVO NORDISK, INC. **Industrial-scale serum-free production of recombinant factor VII in mammalian cells**. US 20090263866A1. 01 Jul 2009, 22 Out 2009.

WU, J. Mechanisms of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives. **Journal of Biotechnology**, v. 43, p. 81-94, 1995.

WU, S. C. Influence of hydrodynamic shear stress on microcarrier-attached cell growth: Cell line dependency and surfactant protection. **Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 201-206, 1999.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 1393-1398, 2004.

XING, Z.; BRIAN, M. K.; LI, Z. J.; LEE, S. S. Scale-up analysis for CHO cell culture process in large-scale bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, p. 733-746, 2009.

YANG, M; BUTLER, M. Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 751-759, 2000.

YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERRLER, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 335-347, 2007.

ZAGARI, F.; JORDAN, M.; STETTLER, M.; BROLY, H.; WURM, F. M. Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. **New Biotechnology**, v. 30, p. 238-245, 2013.

ZHANG, S.; HANDA-CORRIGAN, A.; SPIER, R. E. Foaming and media surfactant effects on the cultivation of animal cells in stirred and sparged bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 25, p. 289-306, 1992.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1158-1170, 2012.

ZHU, M. M.; GOYAL, A.; RANK, D. L.; GUPTA, S. K. Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: A case study. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 70-77, 2005.