

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produção de vetores lentivirais em condições escalonáveis para geração de
células T-CAR para terapia celular**

Mariane Cariati Tirapelle

Ribeirão Preto - 2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Produção de vetores lentivirais em condições escalonáveis para geração de células T-CAR para terapia celular

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Bioagentes de Biotecnologia aplicados à farmácia

Orientada: Mariane Cariatí Tirapelle

Orientadora: Profa Dra Kamilla Swiech Antonietto

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 15/03/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Tirapelle, Mariane Cariatí

Produção de vetores lentivirais em condições escalonáveis para geração de células T-CAR para terapia celular. Ribeirão Preto, 2021.

115 f.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Kamilla Swiech Antonietto

1. Lentivírus 2. Células T-CAR 3. Otimização

Ribeirão Preto.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariane Cariatí Tirapelle

Produção de vetores lentivirais em condições escalonáveis para geração de células T-CAR para terapia celular.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientadora: Kamilla Swiech Antonietto

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Dedico este trabalho aos meus pais,
Mário e Roseli, e á minha irmã, Isabela**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo direcionamento, força e todas as oportunidades.

Aos meus pais, Mário e Roseli, por todo o apoio, carinho e exemplo que são em todos os momentos da minha, obrigada por sempre entregarem palavras de amor e confiança.

Á minha irmã Isabela, por todo o carinho e amizade durante toda a vida, sempre me apoiando, incentivando e dando conselhos.

Á professora Kamilla, pela oportunidade de realizar este projeto, pela confiança por toda a orientação, aprendizado que me proporcionou nestes anos e por ser um exemplo de profissional para mim.

Aos meus amigos do laboratório de Tecnologia de cultivos celulares por todo apoio, troca de conhecimento e amizade durante esses anos: Robson, Tárik, Nathália, Larissa, Matheus, Marlon.

Á minha amiga de laboratório e de vida Natália Santos por tudo que me ensinou, pela amizade, apoio e exemplo de pessoa que é para mim.

Aos funcionários e técnicos da FCFRP e Hemocentro de Ribeirão Preto pelo suporte e confiança.

Á equipe do Hemocentro de Ribeirão Preto pelo suporte técnico: Amanda, Mário, Rafael, Virgínia, Lucas, Nádia.

Aos meus avós pelo apoio e confiança que sempre tiveram em mim.

Á minha amiga Renata Nacasaki por tudo que me ensinou de técnicas no laboratório e pela amizade que construímos para vida.

Á Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP).

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto.

Á Pós-Graduação do programa de Biociências e Biotecnologia.

Á Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar este projeto e pela confiança em sua execução. Processo nº 2018/13307-0 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES),
pelo fomento da pesquisa e por todo o suporte - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

RESUMO

TIRAPELLE, M.C. **Produção de vetores lentivirais em condições escalonáveis para geração de células T-CAR para terapia celular.** 2021. 115 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Os vetores lentivirais são muito utilizados como vetores para a modificação gênica em terapias celular e gênica como as que empregam células T-CAR, devido a sua estabilidade de integração no genoma das células, eficiência de transdução e segurança. A produção destes vetores em cultivos em monocamada em meios contendo soro fetal bovino (SFB), tradicionalmente empregada na academia e centros de pesquisa, possui uma série de limitações, dentre elas a incompatibilidade com uma produção de forma mais controlada em maiores escalas, sendo desejável para isto o cultivo celular em suspensão em biorreatores. O objetivo deste projeto foi produzir partículas lentivirais em condições escalonáveis, utilizando células adaptadas para crescimento em suspensão em meio de cultura livre de soro fetal bovino (SFB). Portanto, células da linhagem HEK293T, adaptadas ao cultivo em suspensão, foram utilizadas para produção de partículas lentivirais que expressam a proteína sintética CAR anti-CD19 assim como IL-18 e GFP. A primeira etapa consistiu em produzir partículas lentivirais em monocamada em meio contendo SFB como condição controle e avaliar sua funcionalidade. Em monocamada a produção média, em 48 horas, foi de 8×10^6 partículas/mL. A funcionalidade do vetor foi avaliada por meio da modificação de linfócitos T para expressão da molécula CAR. Os resultados indicaram que o vetor é capaz de induzir resposta antitumoral nos linfócitos T, que por sua vez foram capazes de identificar e levar a morte células CD19 positivas *in vitro*. As células HEK293T adaptadas tiveram seu perfil cinético e metabólico caracterizado, tendo sido obtidos resultados satisfatórios com e sem suplementação com Cellboost. A presença deste componente, no entanto, inibiu a transfecção transiente e por conseguinte a produção de partículas lentivirais. Mesmo na ausência de Cellboost, a produção lentiviral em suspensão sem SFB apresentou resultados inferiores quando comparados com a produção em monocamada em meio suplementado com SFB. Por meio de Design de Experimentos (DoE) – Box-Behnken foi realizada uma otimização do protocolo de transfecção. Os resultados mostraram que a melhor condição envolveu a utilização de $1 \mu\text{g}$ de DNA/ 10^6 células, 1×10^6 células/mL e proporção PEI:DNA de 2,5:1. Este protocolo foi otimizado com a adição de Butirato de Sódio a 5mM e a produção obtida foi maior, em média, $1,5 \times 10^5$ partículas/mL. No presente trabalho foi possível realizar a otimização do protocolo de produção de partículas lentivirais em suspensão em meios livres de SFB mantendo as mesmas funcionais e capazes de induzir resposta antitumoral *in vitro*.

Palavras-chave: vetores lentivirais, células T-CAR, HEK 293T, cultivo em suspensão, otimização.

ABSTRACT

TIRAPELLE, M.C. **Production of lentiviral vectors under scalable conditions for the generation of CAR-T cells for cell therapy.** 2021. 115 f. Thesis (Master's degree). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Lentiviral vectors are widely used as vectors for gene modification in cell and gene therapies, such as dose employing CAR-T cells, due to their stability of integration in the cell genome, transduction efficiency and safety. The production of such vectors in monolayer serum-supplemented culture, traditionally used in academia and research centers, has a number of limitations; amongst them incompatibility with a more controlled large-scale production; being the suspension culture of cells in bioreactors desirable. The aim of this project was to produce lentiviral particles in scalable conditions, using cells adapted for serum-free suspension growth. Therefore, HEK293T cells adapted to serum-free suspension culture, were used to produce lentiviral particles that express the synthetic CAR protein anti-CD19 as well as IL-18 and GFP. The first step was to evaluate the production and functionality of lentiviral particles in monolayer serum-supplemented culture as a control condition. In this condition the average production was 8×10^6 particles/mL. The vector's functionality was assessed by modifying T cells to express the CAR molecule. The results indicated that the vector was capable of inducing antitumor response in T cells, which in turn were able to identify and kill CD19 positive cells *in vitro*. The adapted HEK293T cells had their kinetic and metabolic profile characterized, and satisfactory results were obtained with and without Cellboost supplementation. Nevertheless, the presence of Cellboost inhibited transient transfection and consequently the production of lentiviral particles. Even in the absence of Cellboost, serum-free suspension lentiviral production showed lower results when compared to monolayer serum-supplemented production. To solve that, an optimization of the transfection protocol was performed using Design of Experiments (DoE) - Box-Behnken. The results indicated that the best condition involved the use of 1 μ g of DNA/ 10^6 cells, 1×10^6 cells/mL and PEI:DNA ratio of 2.5:1. This protocol was further optimized with the addition of 5mM Sodium Butyrate and resulted in an increase in the production, with an average of 1.5×10^5 particles/mL. In the present study, it was possible to optimize the protocol for the production of lentiviral particles in serum-free suspension culture, maintaining the functionality and capacity of inducing anti-tumor response *in vitro*.

Keywords: lentiviral vectors, CAR-T cells, HEK 293T, suspension culture, optimization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de produção das células T-CAR em imunoterapia autóloga.....	22
Figura 2 - Estrutura da partícula lentiviral e genes estruturais principais.....	25
Figura 3 - Ciclo de vida e replicação do lentivírus.....	26
Figura 4 - Representação dos níveis experimentais de um delineamento (a) Composto Central Rotacional (DCCR) e (b) Box-Behnken (DDB).....	33
Figura 5 - Fluxograma ilustrativo das etapas do desenvolvimento do projeto.....	38
Figura 6 - Fragmentos de DNA resultantes da eletroforese em gel de agarose após digestão enzimática dos vetores plasmidiais pHelp1, pHelp2, pHelp3 e CAR IL-18 GFP com enzimas de restrição.....	48
Figura 7 - Produção de partículas lentivirais CAR IL-18 GFP em células HEK293T cultivadas em meio DMEM + 10% SFB em monocamada (frascos T175 cm ²). O sobrenadante foi coletado 24h, 48h e 72h após a transfecção transiente. Análise comparativa entre a expressão de GFP, anti F(ab) e dupla expressão por análise de citometria de fluxo. Média ± desvio padrão, n=3. * P < 0,05 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....	50
Figura 8 - Comparação de produção de partículas lentivirais totais em cada coleta realizada (24, 48 e 72 horas) avaliada por meio da expressão de GFP. Média ± desvio padrão, n=3. * P < 0,05 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....	51
Figura 9 - Citometria de fluxo dos linfócitos T não transduzidos com adição de isotipo para eliminar ligações inespecíficas e posteriormente marcação com anticorpo anti-F(ab) que identifica a região F(ab) do receptor CAR.....	54
Figura 10 - Citometria de fluxo dos linfócitos T transduzidos com o vetor lentiviral CAR anti-CD19 IL-18 GFP. O quadrante superior direito identifica a quantidade de células, em porcentagem (%), positivas para a porção F(ab) do CAR e expressão de GFP....	54
Figura 11 - Citometria de fluxo de células CD19+ marcadas com anticorpo CD19 (à esquerda) para identificação das células Raji vivas e linfócitos T viáveis que não possuem CD19 em sua superfície (à direita).....	56
Figura 12 - Co-cultivo da condição controle Raji com linfócito T não transduzido. (a) Proporção Linfócitos T não transduzidos e células Raji de 1:1, 0 e 24 horas de cocultivo, (b) proporção de células de 5:1, 0 e 24 horas de cocultivo e (c) proporção de células de 10:1, em 0 e 24 horas de cocultivo.....	57
Figura 13 - Co-cultivo da Raji com o linfócito T CAR IL-18 GFP. (a) Proporção Linfócito T CAR IL-18 GFP e célula Raji de 1:1, 0 e 24 horas de cocultivo, (b) proporção de células de 5:1, 0 e 24 horas de cocultivo e (c) proporção de células de 10:1, em 0 e 24 horas de cocultivo.....	58
Figura 14 - Co-cultivo em 0 e 24 horas em três diferentes proporções 1:1, 5:1, 10:1 de linfócito T não transduzido e da célula Raji CD19+. Média ± desvio padrão, n=2. *P < 0,05 **P < 0,001 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....	59

Figura 15 - Co-cultivo em 0 e 24 horas em três diferentes proporções 1:1, 5:1, 10:1 do linfócito T CAR IL-18 GFP e da célula Raji CD19+. Média \pm desvio padrão, n=2. *P < 0,05 **P < 0,001 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....	60
Figura 16 - Cinética de crescimento da célula HEK293 T cultivada em suspensão em meio FreeStyle em frascos Erlenmeyer sob agitação de 150 rpm a 37°C (n=3).....	62
Figura 17 - Perfil da glicose residual e produção de lactato durante 10 dias de cultivo da célula HEK 293T em meio de cultura FreeStyle sem suplementação (n=3).....	63
Figura 18 - Cinética de crescimento da célula HEK293 T cultivada em meio FreeStyle com 10% de Cellboost-5 em frascos Erlenmeyer sob agitação de 150 rpm a 37°C (n=3).....	65
Figura 19 - Perfil da glicose residual e produção de lactato durante 10 dias de cultivo da célula HEK 293T em meio de cultura FreeStyle com 10% de Cellboost (n=3).....	66
Figura 20 - Crescimento celular após transfecção transiente em meio FreeStyle+10% Cellboost (Média \pm desvio padrão, n=3).....	68
Figura 21 - Crescimento celular após transfecção transiente em meio FreeStyle por 120 horas (Média \pm desvio padrão, n=3).....	69
Figura 22 - Produção de partículas lentivirais/mL avaliadas por citometria de fluxo (Média \pm desvio padrão, n=3), * P < 0,05 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....	71
Figura 23 - Crescimento (células/mL) e viabilidade celular durante 72 horas após a transfecção no delineamento Box-Behnken em meio FreeStyle.....	75
Figura 24 - Valores experimentais versus valores preditos para as variáveis respostas (a) eficiência de transfecção 48 horas, (b) título viral 48 horas, (c) eficiência de transfecção 72 horas e (d) título viral 72 horas.....	80
Figura 25 - Superfície de resposta para a resposta TU 48 horas em função da quantidade de DNA em μ g por 10 ⁶ células e concentração celular em células/mL.....	82
Figura 26 - Superfície de resposta para a resposta EF 72 horas em função da quantidade de DNA em μ g por 10 ⁶ células e concentração celular em células/mL.....	83
Figura 27 - Crescimento (células/mL) e viabilidade celular durante 72 horas após a transfecção no planejamento Box-Behnken em meio HyClone SFM4Transfx-293.....	84
Figura 28 - Valores experimentais versus valores preditos em meio SFM4 Transfx para as variáveis respostas (a) eficiência de transfecção 48 horas, (b) título viral 48 horas, (c) eficiência de transfecção 72 horas e (d) título viral 72 horas.....	89
Figura 29 - Superfície de resposta para a resposta EF 48 horas em função da quantidade de DNA em μ g por 10 ⁶ células e concentração celular em células/mL.....	91

Figura 30 - Superfície de resposta para a resposta EF 72 horas em função da quantidade de DNA em μg por 10^6 células e concentração celular em células/mL.....	91
Figura 31 - Superfície de resposta para a resposta TU 72 horas em função da quantidade de DNA em μg por 10^6 células e concentração celular em células/mL.....	92
Figura 32 - Crescimento da cultura (células totais/mL) e viabilidade (%) durante 120 horas após a transfecção transiente em meio FreeStyle do protocolo R5 (Média \pm desvio padrão, n=3).....	93
Figura 33 - Titulação viral para obtenção da quantidade de partículas virais/mL pelo método de citometria de fluxo e expressão de células GFP positivas no cultivo nas coletas de 48 até 120 horas após a transfecção transiente. Média \pm desvio padrão, n=3, * P < 0,05 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....	94
Figura 34 - Efeito do congelamento e descongelamento na quantidade de partículas lentivirais/mL em 48 horas após a transfecção transiente – protocolo R5 (Média \pm desvio padrão, n=3, * P < 0,05 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....	96
Figura 35 - Efeito do congelamento e descongelamento na quantidade de partículas lentivirais/mL em 72 horas após a transfecção transiente – protocolo R5 (Média \pm desvio padrão, n=3, * P < 0,05 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....	97
Figura 36 - Efeito do congelamento e descongelamento na quantidade de partículas lentivirais/mL em 48 horas após a transfecção transiente (Média \pm desvio padrão, n=3, * P < 0,05 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....	98
Figura 37 - Efeito do congelamento e descongelamento na quantidade de partículas lentivirais/mL em 72 horas após a transfecção transiente (Média \pm desvio padrão, n=3, * P < 0,05 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....	98
Figura 38 - Crescimento da cultura (células totais/mL) e viabilidade (%) durante 72 horas após a transfecção transiente em meio FreeStyle do protocolo R5 + 5mM de NaBu (Média \pm desvio padrão, n=5).....	100
Figura 39 - Titulação viral para obtenção da quantidade de partículas virais/mL pelo método de citometria de fluxo e expressão de células GFP positivas no cultivo nas coletas de 48 e 72 horas após a transfecção transiente, protocolo R5 + 5Mm NaBu. Média \pm desvio padrão, n=5, ** P < 0,001 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....	101
Figura 40 - Comparativo dos protocolos 2 - padrão, R5 e R5+5mM de NaBu da produção de partículas lentivirais/mL obtidas da coleta de 48 horas após a transfecção transiente. Média \pm desvio padrão, n=3, ** P < 0,001 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....	102
Figura 41 - Citometria de fluxo dos linfócitos T transduzidos com o vetor lentiviral CAR anti-CD19 IL-18 GFP. O quadrante inferior direito identifica a quantidade de células, em porcentagem (%), positivas para a expressão de GFP.....	103

Figura 42 - Citometria de fluxo de células CD19+ marcadas com anticorpo CD19 (à esquerda) para identificação das células Raji vivas e linfócitos T viáveis que não possuem CD19 em sua superfície (à direita).....104

Figura 43 - Cocultivo em 0 e 24 horas em três diferentes proporções 1:1, 5:1, 10:1 de linfócito T não transduzido e da célula Raji CD19+. +. Porcentagem de células CD19 + (esquerda) e CD19 - (direita). Média \pm desvio padrão, n=2. *P < 0,05 **P < 0,001 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....105

Figura 44 - Cocultivo em 0 e 24 horas em três diferentes proporções 1:1, 5:1, 10:1 de linfócito T-CAR e da célula Raji CD19+. Porcentagem de células CD19 + (esquerda) e CD19 - (direita). Média \pm desvio padrão, n=2. *P < 0,05 **P < 0,001 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).....106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento Box-Behnken (3 fatores/1 bloco/ 15 experimentos) com variação de densidade celular (células/mL), quantidade de DNA total ($\mu\text{g}/10^6$ células) e proporção PEI:DNA em três níveis com valores reais dos respectivos níveis em meio de cultivo FreeStyle 293 expression (Invitrogen) e SFM4Transfx-293 (HyClone).....	43
Tabela 2 - Matriz do planejamento Box-Behnken (3 fatores/1 bloco/ 15 experimentos) em três níveis (-1, 0, +1) em meio de cultivo FreeStyle 293 expression (Invitrogen) ou SFM4Transfx-293 (HyClone).....	43
Tabela 3 - Produção total de partículas lentivirais geradas em cada um dos 3 experimentos.....	52
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos e metabólicos do cultivo da célula HEK 293T, adaptada a suspensão, em meio FreeStyle sem adição de Cellboost-5 sob agitação de 150 rpm à 37°C em frascos Erlenmeyer.....	66
Tabela 5 - Produção de lentivírus em suspensão sem utilização de SFB	72
Tabela 6 - Identificação qualitativa por ELISA da proteína p24 do envelope viral das amostras coletadas no cultivo aderente e em suspensão.....	73
Tabela 7 - Eficiência de transfecção e produção de partículas lentivirais em 48 e 72 horas nos 15 experimentos realizados.....	76
Tabela 8 - Coeficientes de regressão da coleta de 48 horas após a transfecção transiente obtidos através da análise Box-Behnken no delineamento experimental avaliados no software Statistica 7.....	77
Tabela 9 - Coeficientes de regressão da coleta de 72 horas após a transfecção transiente obtidos através da análise Box-Behnken por planejamento experimental avaliados no software Statistica 7.....	78
Tabela 10 - Análise de variância para as variáveis respostas, eficiência de transfecção e título viral nos dois tempos avaliados, 48 horas (a) e 72 horas (b).....	81
Tabela 11 - Eficiência de transfecção e quantidade de partículas lentivirais/mL em 48 e 72 horas dos 15 experimentos.....	85
Tabela 12 - Coeficientes de regressão de 48 horas obtidos através da análise Box-Behnken por planejamento experimental avaliados no software Statistica 7.....	86
Tabela 13 - Coeficientes de regressão de 72 horas obtidos através da análise Box-Behnken por planejamento experimental avaliados no software Statistica 7.....	87
Tabela 14 - Análise de variância para as variáveis respostas, eficiência de transfecção e título viral nos dois tempos avaliados, 48 horas (a) e 72 horas (b).....	90
Tabela 15 - Comparativo de produção lentiviral (partículas/mL) do Protocolo 2 e R5.....	95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ - Velocidade específica de crescimento
 μ_{\max} – Velocidade específica de crescimento máxima
7-AAD - 7-aminoactinomycin
ANOVA – Análise de Variância
CAR - Chimeric Antigen Receptor
CHO – Chinese Hamster Ovary
CO₂ – Dióxido de carbono
DCCR - Composto Central Rotacional
DDB - Box-Behnken
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
EF – Eficiência de transfecção
FDA – Food and Drug Administration
GFP – Green Fluorescent Protein
GL – Graus de Liberdade
HEK 293 - Human Embryonic Kidney 293
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
ICV – Integral de Células Viáveis
IFN- γ – Interferon gamma
IL-18 – Interleucina 18
IL-2 – Interleucina 2
LB – Meio Luria Bertani
LTR - Long Terminal Repeats
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
MOI – Multiplicity of Infection
NaBu – Butirato de Sódio
NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NK – Células Natural Killer
PBMC - Célula Mononuclear do Sangue Periférico
PEI – Polietilenoimina

PI – Iodeto de Propideo

PPT - Polypurine tract

q_{gli} – Taxa específica de consumo de glicose

q_{lac} - Taxa específica de produção de lactato

QM – Quadrado Médio

RNA - Ácido Ribonucleico

scFv - single-chain variable fragment

SFB – Soro Fetal Bovino

SQ – Soma de Quadrados

SV40 - simian vacuolating virus 40 (vírus vacuolante símio 40)

TCA – Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos

TCR – Receptor de células T

t_d – Tempo de duplicação

TU – Partículas lentivirais/mL

VLP – Vírus Like Particle

VSV-G - Glicoproteína do Vírus da Estomatite Vesicular

WHO - World Health Organization

$X_{m\acute{a}x}$ – Máxima concentração de células

$Y_{lac/gli}$ – Fator de Conversão de Glicose em Lactato

SÚMARIO

1. Introdução.....	19
1.1. Terapia gênica.....	19
1.2. Terapia utilizando células T-CAR.....	20
1.3. Lentivírus e ciclo de vida.....	23
1.4. Produção de vetores lentivirais.....	27
1.4.1. <i>Produção em cultura em monocamada contendo soro fetal bovino.....</i>	<i>28</i>
1.4.2. <i>Produção em suspensão em meio livres de soro.....</i>	<i>29</i>
1.5. <i>Otimização da produção de vetores lentivirais.....</i>	<i>29</i>
1.5.1. <i>Variáveis que influenciam a transfecção transiente.....</i>	<i>29</i>
1.5.2. <i>Delineamentos experimentais.....</i>	<i>32</i>
2. Justificativa.....	35
3. Objetivos.....	36
3.1. Objetivo geral.....	36
3.2. Objetivos específicos.....	36
4. Materiais e métodos.....	37
4.1. Linhagens celulares e meios de cultura.....	37
4.2. Condições de cultivo das células.....	38
4.3. Plasmídeos.....	39
4.4. Transformação bacteriana para produção de plasmídeos.....	39
4.5. Produção e purificação de plasmídeos.....	40
4.6. Produção de vetores lentivirais.....	40
4.6.1. <i>Produção em células aderentes – monocamada.....</i>	<i>40</i>
4.6.2. <i>Produção em células em suspensão.....</i>	<i>41</i>
4.7. Delineamento experimental – Box-Behnken.....	41
4.8. Avaliação da funcionalidade das partículas lentivirais produzidas.....	44
4.8.1. <i>Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....</i>	<i>44</i>
4.8.2. <i>Isolamento e ativação de linfócitos T.....</i>	<i>44</i>
4.8.3. <i>Transdução de linfócitos T.....</i>	<i>45</i>
4.8.4. <i>Cultivo de linfócitos T-CAR.....</i>	<i>45</i>
4.8.5. <i>Determinação da porcentagem de células T-CAR positivas.....</i>	<i>45</i>
4.8.6. <i>Ensaio funcional: Co-cultivo Linfócito T-CAR com Raji.....</i>	<i>45</i>

4.9.	Métodos analíticos e análise de resultados.....	46
5.	Resultados e discussão.....	48
5.1.	Avaliação da integridade dos vetores plasmidiais.....	48
5.2.	Produção de partículas lentivirais em monocamada	49
5.3.	Avaliação da funcionalidade das partículas lentivirais produzidas em monocamada.....	53
5.3.1.	<i>Modificação do linfócito T.....</i>	<i>53</i>
5.3.2.	<i>Cocultivo linfócito T-CAR e linhagem CD19+.....</i>	<i>55</i>
5.4.	Caracterização cinética e metabólica das células HEK 293T adaptadas ao crescimento em suspensão em meios livres de SFB.....	61
5.4.1.	<i>Cinética de crescimento celular e metabolismo das células HEK293T em meio FreeStyle sem Cellboost.....</i>	<i>61</i>
5.4.2.	<i>Cinética de crescimento celular e metabolismo das células HEK293T em meio FreeStyle suplementado com 10% de Cellboost.....</i>	<i>64</i>
5.5.	Produção de partículas lentivirais em suspensão sem SFB.....	68
5.5.1.	<i>Meio de cultivo FreeStyle293 + 10% Cellboost-5.....</i>	<i>68</i>
5.5.2.	<i>Meio de cultivo FreeStyle293.....</i>	<i>69</i>
5.6.	Otimização da produção de partículas lentivirais em suspensão por delineamento experimental.....	74
5.6.1.	<i>Meio de cultivo: FreeStyle 293.....</i>	<i>74</i>
5.6.2.	<i>Meio de cultivo: HyClone SFM4Transfx-293.....</i>	<i>84</i>
5.7.	Validação do modelo.....	93
5.8.	Influência dos ciclos de congelamento e descongelamento das partículas lentivirais.....	96
5.9.	Produção de partículas lentivirais em suspensão – Protocolo R5 e Butirato de Sódio.....	100
5.10.	Avaliação da funcionalidade das partículas lentivirais produzidas em suspensão.....	103
5.10.1.	<i>Modificação dos linfócitos T.....</i>	<i>104</i>
5.10.2.	<i>Cocultivo linfócito T-CAR e linhagem CD19+.....</i>	<i>105</i>
6.	Conclusões.....	107
7.	Referências.....	108
	Anexos.....	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. Terapia gênica

Segundo o órgão regulamentador norte americano Food and Drug Administration (FDA), a terapia gênica faz uso de produtos baseados em ácidos nucleicos, vírus ou organismos geneticamente modificados, capazes de mediar seus efeitos em organismos por meio da transcrição ou tradução de determinado material genético inserido e/ou pela integração do mesmo ao genoma da célula hospedeira. Neste tipo de terapia as células-alvo podem ser modificadas *in vivo*, diretamente no organismo do paciente, ou *ex vivo*, modificadas *in vitro* antes da administração no receptor da terapia. Existem duas categorias, terapia gênica de células somáticas e terapia gênica de linha germinativa. Na terapia somática o material genético é inserido nas células-alvo, porém esta modificação não é mantida nas gerações seguintes, enquanto que na linha germinativa a modificação é permanente (WIRTH; PARKER; HERTTUALA, 2013).

O potencial da terapia gênica tem sido reconhecido desde a década de 1970, mesma época em que a tecnologia do DNA recombinante estava sendo estabelecida. Friedmann e Roblin (1972) realizaram um estudo relatando o potencial e os desafios da utilização da terapia gênica no tratamento de doenças monogênicas hereditárias, com o objetivo de substituir um gene homólogo defeituoso. Estudos posteriores permitiram a compreensão de novos princípios genéticos e mecanismo de vias moleculares que demonstraram novos alvos terapêuticos para este tipo de terapia (LEUNG et al., 2010). Atualmente diversos estudos clínicos têm sido realizados utilizando terapia gênica para o tratamento de câncer, doenças cardiovasculares, autoimunes, monogênicas, infecciosas e neurológicas (OLIVEIRA, 2010; DUNBAR et al., 2018). Segundo o banco de dados Clinicaltrials.gov até o fim de 2020 foram aprovados, no mundo, 647 ensaios clínicos envolvendo terapia gênica, dos quais 54% são destinados a algum tipo de câncer (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>, acesso em 21 de dezembro 2020).

Dados obtidos pelo World Health Organization (WHO) indicaram que no ano de 2020 o câncer foi responsável por cerca de 9,9 milhões de óbitos e mais de 19 milhões de novos casos, caracterizando esta patologia como uma das principais causas de mortes no mundo. É comum a manifestação tardia e diagnóstico e tratamentos

inacessíveis ou não totalmente eficazes. Levantamentos da mesma organização indicaram que em países de baixa e média renda 70% das mortes são causadas por esta doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Os tratamentos convencionais mais utilizados no combate ao câncer são baseados em radio e quimioterapia, que promovem aumento de sobrevida e cura de muitos pacientes. No entanto, causam diversos efeitos colaterais, como a resistência a fármacos disponíveis, danos ao sistema imunológico e inespecificidade além de afetar células tumorais e também células saudáveis (ROCHA, 2014). Neste contexto, a imunoterapia tem se mostrado como abordagem terapêutica de maior efetividade e seletividade, permitindo a modulação da resposta imunológica natural, assim como menores efeitos adversos ao paciente. Nesta abordagem pode-se ativar o sistema imune por meio de estímulos externos para o combate específico e dirigido de células tumorais, seja por abordagens antígeno-anticorpo específicas (produção de anticorpos relacionados com linfócitos B) ou por mecanismos envolvidos na imunidade mediada por células (relacionada com linfócitos T) que podem envolver a terapia celular e gênica. Dentre os tipos de imunoterapia disponíveis atualmente estão os inibidores de checkpoint, vacinas e transferência celular adotiva (BATISTA, 2016). O desenvolvimento de células T-CAR (Chimeric Antigen Receptor T Cells) também está dentro do grupo da imunoterapia e chama atenção atualmente pelos resultados expressivos obtidos (MARTHO; DEGASPERI; TARSITANO; 2017).

1.2. Terapias utilizando células T-CAR

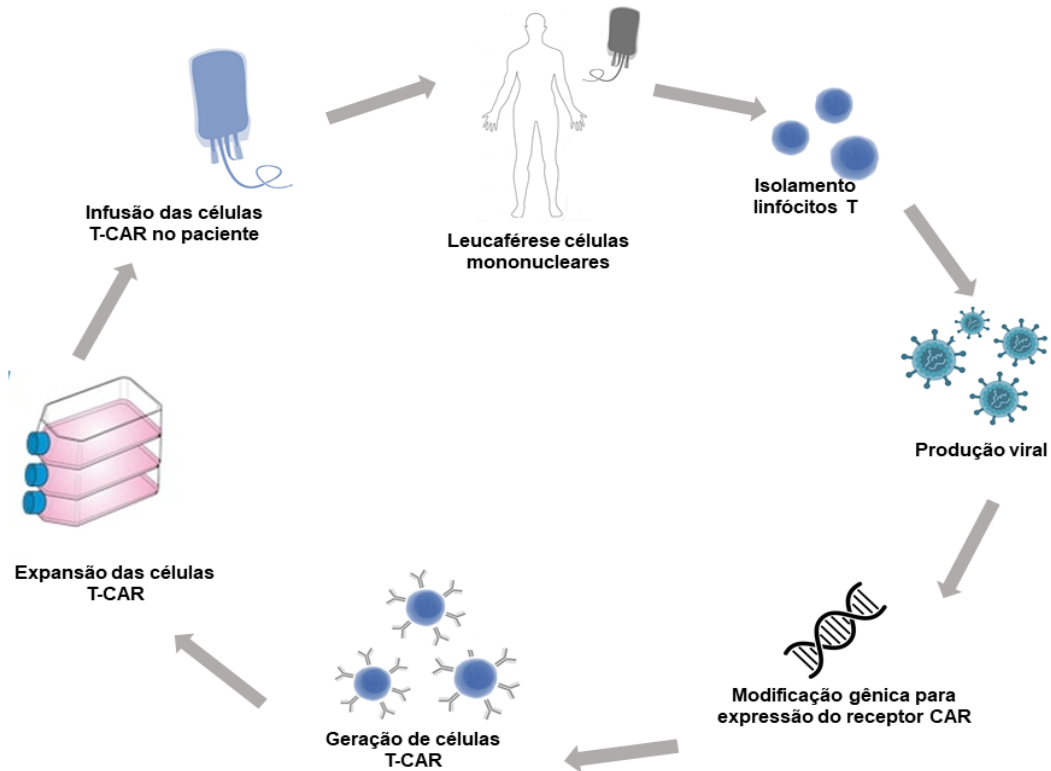
As células T-CAR são linfócitos T modificados para expressar uma proteína sintética (CAR). Esta molécula é composta por um fragmento variável de um anticorpo de cadeia única (scFv) fusionado a um domínio de sinalização do complexo receptor de células T (TCR, cadeia CD3 ζ). O receptor CAR reconhece antígenos na superfície das células tumorais com alta afinidade e ativa os linfócitos T de maneira similar à sinalização TCR (RUELLA; JUNE, 2016). Células tumorais são capazes de evitar o reconhecimento pelas células T devido a um microambiente tumoral imunossupressor e pouca expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (SELIGER; RITZ; FERRONE; 2006). Ao contrário da reação natural do sistema imune, as células T-CAR não dependem da apresentação do fragmento peptídico pela molécula do

MHC para o reconhecimento do antígeno (ESHAR et al., 2001; MURPHY; TRAVERS; WALPORT; 2010) e a presença de mecanismos co-estimulatórios garante menor vulnerabilidade aos efeitos de imunossupressão (DOTTI et al., 2014).

As células T-CAR tem por objetivo conectar a especificidade de um anticorpo (fragmento variável de um anticorpo de cadeia única (scFv)) com o efeito citotóxico e de memória das células T (KALOS et al., 2011). Atualmente, o tipo mais utilizado e melhor estabelecido deste tipo de imunoterapia é o autólogo, ou seja, o paciente tem suas próprias células modificadas e reinfundidas. Nos últimos anos estudos têm sido realizados para estabelecer a terapia T-CAR de forma alogênica, em razão da imediata disponibilidade de células T-CAR criopreservadas, maior padronização do produto e possível redução dos custos envolvidos na produção. Um dos principais desafios do tratamento alogênico é a possibilidade do surgimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (GRAHAM et al., 2018; DEPIL et al., 2020).

Quando a terapia é autóloga (Figura 1), a primeira etapa é o processo de leucaférese de células mononucleares do sangue periférico do paciente para posterior isolamento de células T. A etapa seguinte consiste na ativação destas células utilizando anticorpos anti-CD3 e IL-2 ou beads magnéticas que posteriormente devem ser retiradas do cultivo, simulando uma célula dendrítica artificial. Após ativação é realizada a modificação gênica das células para expressão do CAR mediada por vetores lentivirais, retrovirais ou tranposons e então sua expansão. Antes da infusão das células T-CAR no paciente, é necessário um procedimento de depleção do sistema imune para maior atividade das células T-CAR (MAUS; LEVINE, 2016).

Figura 1: Processo de produção das células T-CAR em imunoterapia autóloga.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os estudos com o objetivo de desenvolver terapias com células T assim como os estudos clínicos utilizando estas células têm aumentado significativamente. Em 2014 havia 89 protocolos de estudos clínicos submetidos ao FDA (U.S. Food and Drug Administration), sendo que em dezembro de 2018 este número aumentou para 278 (COMISEL et al., 2020; GTnetwork, 2019). A maioria dos grupos de pesquisa tem obtido avanços mais expressivos no tratamento de cânceres de origem hematológica, no entanto os tumores sólidos apresentam também perspectivas promissoras; mais de 100 testes clínicos com células T-CAR estão sendo desenvolvidos com foco em tumores sólidos. Estes estudos buscam entender de maneira mais profunda o microambiente tumoral para maior efetividade da aplicação (LI et al., 2018). Em agosto de 2017 foi aprovado pelo FDA o produto comercial, Kymriah™, baseado em células T que expressam o receptor antigênico quimérico (CAR) específico para moléculas CD19 para tratamento de casos refratários de leucemia linfoblástica aguda de células B e linfoma (JUNE et al., 2018; LI et al., 2018). Também já está disponível no mercado

(aprovado pelo FDA em outubro de 2017), o produto da Kite Yescarta™ (Axicabtagene Ciloleucl) para tratamento de Linfoma de células B refratário em pacientes adultos (YESCARTA, 2018). Mais recentemente, em fevereiro de 2021, foi aprovado o produto Breyanzi™ (lisocabtagene maraleucl) também específico para a molécula CD19.

Como toda tecnologia emergente, a imunoterapia com células T-CAR ainda enfrenta alguns desafios, sendo o alto custo um dos principais, variando de US\$ 320.000 - 475.000,00/dose – cada paciente necessita em média de uma dose para o tratamento. Este alto custo é proveniente dos inúmeros testes de qualidade exigidos por órgãos de regulamentação, o tempo que estes demandam, somado aos altos custos de desenvolvimento e produção. O custo referente a produção dos vetores virais (lentivírus ou retrovírus) é um dos fatores que mais impactam o custo final do produto. O avanço nos estudos envolvendo a otimização do processo de produção destas células tem impacto direto no custo do produto final e conseqüentemente no número de pessoas com acesso a este tipo de tratamento. Além disso, custos adicionais envolvendo os procedimentos realizados no paciente, como a preparação do sistema imune, internação, monitoramento e tratamento de possíveis efeitos secundários aumentam de forma expressiva o valor final da terapia (WALKER; JOHNSON; 2016).

1.3. Vetores lentivirais e ciclo de vida

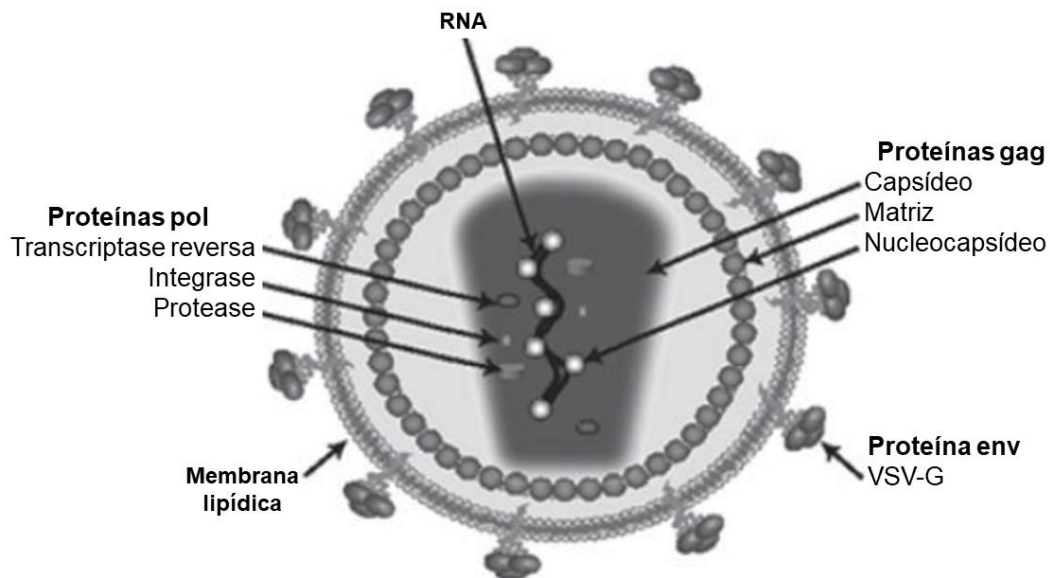
Vetores lentivirais têm sido muito utilizados como vetores de expressão em pesquisas e ensaios clínicos de terapia gênica e para geração de células T-CAR. Isto porque estes vetores oferecem como vantagem a estabilidade ao se integrarem ao genoma das células hospedeiras, garantindo expressão estável e prolongada de genes de interesse terapêutico. Além disso, são capazes de transduzir as células até mesmo quando estas não estão em processo de divisão. Isto ocorre porque os lentivírus possuem um transporte ativo que permite a entrada de seu provírus pelos poros da carioteca (DA SILVA, 2005; NALDINI et al., 1996; VEDOVOLI, 2016).

Os vetores lentivirais são derivados de um gênero pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, nesta classificação existem duas espécies que são patogênicas para humanos: Vírus da Imunodeficiência Humana HIV-1 e HIV-2 (ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses). A partícula lentiviral

madura é esférica e possui de 80 – 120 nm de diâmetro, um envelope com espículas e um trímero glicoproteico; abaixo do envelope encontra-se a matriz viral que envolve o capsídeo de formato cônico, que possui a proteína p24. O material genético encontra-se dentro do capsídeo e é formado por duas fitas de RNA simples (*single-stranded RNA – ssRNA*) (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). Com o material genético estão as proteínas estruturais e enzimáticas do vírus, sendo elas as proteínas do nucleocapsídeo, integrases, proteases e a transcriptase reversa, esta última apresenta-se como a característica marcante da família. A transcriptase reversa permite a retrotranscrição do RNA viral em uma molécula de DNA complementar (cDNA) permitindo a integração ao genoma da célula hospedeira (ESCORS; BRECKPOT; 2010).

Quanto ao genoma do vetor lentiviral, sua organização é composta pelos genes estruturais (*gag, pol e env*), genes regulatórios (*tat e rev*) e genes acessórios (*nef, vif, vpr e vpu ou vpx*) (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). *Env* codifica o envelope glicoproteico, *gag* é responsável por codificar as proteínas estruturais e *pol* codifica as enzimas que acompanham o ssRNA, incluindo a transcriptase reversa, integrases para integração do DNA à célula hospedeira e proteases para maturação do vírion. Além da organização básica destes genes, os vetores lentivirais possuem elementos *cis-acting* e *trans-acting*. As sequências *cis-acting*, como duas sequências 3' e 5' LTR (*Long Terminal Repeats*), são essenciais para a integração e transcrição do vírus e os elementos *trans-acting* são necessários para a codificação de proteínas estruturais e acessórias. Outros componentes presentes são o sinal de empacotamento (*psi* ou Ψ), necessário para a embalagem em vírions recém-formados e a sequência PPT (*Polypurine tract*), local de início da síntese de DNA durante a transcrição reversa (ESCORS; BRECKPOT; 2010).

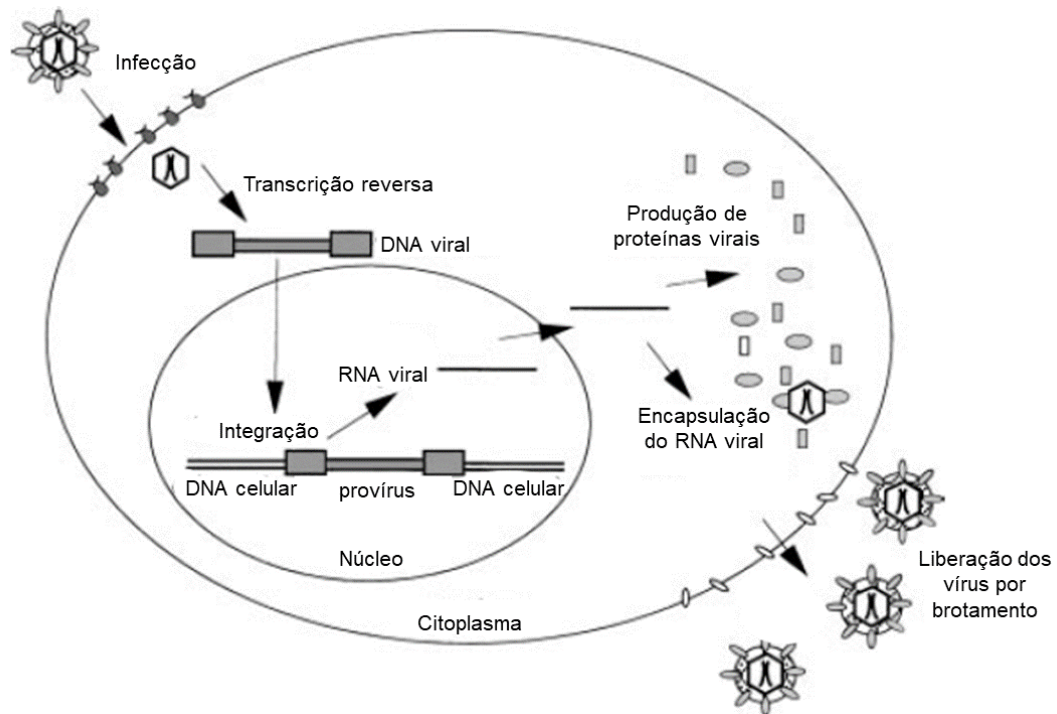
Figura 2: Estrutura da partícula lentiviral e genes estruturais principais.



Fonte: Adaptado de Segura et al., 2013.

O ciclo de vida das partículas lentivirais inicia-se com a infecção da célula hospedeira. As glicoproteínas do envelope viral interagem com os receptores da membrana celular promovendo alterações conformacionais permitindo a exposição do peptídeo viral que promove a fusão com a membrana celular e o vírus é inserido no citoplasma. A partir da interiorização do material genético viral na célula hospedeira ocorre uma reorganização do mesmo formando um complexo de transcrição reversa, onde a enzima transcriptase reversa transcreve o ssRNA viral em uma molécula de cDNA. Este, é transportado para o núcleo celular por um mecanismo ativo que permite este processo até mesmo em células quiescentes. O DNA é integrado ao genoma e utiliza a maquinaria celular para o processo de transcrição; o RNA é encaminhado para o citoplasma onde ocorre a tradução das proteínas virais. No citoplasma, é realizada a montagem e liberação dos vírions para fora da célula por brotamento. Após a liberação, os vírions são maturados por meio de proteases e tornam-se aptos para nova infecção (ESCORS; BRECKPOT; 2010; VEDOVELI, 2016; BUCHSCHACHER; WONG-STAAAL, 2018).

Figura 3: Ciclo de vida e replicação das partículas lentivirais.



Fonte: Adaptado de Buchschacher e Wong-Staal, 2018.

O vetor lentiviral é derivado de um lentivírus, o vírus HIV-1, desta forma é necessário a realização de modificações no genoma viral para que o processo seja eficiente e mais seguro. Algumas das abordagens utilizadas para tornar segura a utilização deste vetor, envolveu a separação dos elementos necessários para síntese de RNA viral (*cis-acting*) dos elementos essenciais para a formação das proteínas e enzimas da partícula viral (*trans-acting*) (PICANÇO-CASTRO et al., 2008). Outra modificação foi a pseudotipagem. Para isto foi realizada uma substituição da glicoproteína do envelope do vírus selvagem HIV-1 pela Glicoproteína do Vírus da Estomatite Vesicular (VSV-G) que possui maior estabilidade, além disso a substituição do envelope viral permite a infecção de maior variedade de tipos celulares, aumentando o tropismo do vírus, uma vez que o HIV possui reconhecimento apenas de receptores de células T-CD4 positivas (BURNS et al., 1993; ANSORGE, 2010). Em razão de diversas modificações na composição dos lentivírus encontram-se disponíveis três gerações de vetores. A 1ª geração possui grande parte do genoma original do HIV-1 e é composto por três plasmídeos. Na 2ª geração os genes

envolvidos na patogenicidade foram eliminados e na 3ª geração houve a remoção de genes do vetor do capsídeo e adição de um promotor que regula a expressão do RNA do vetor, nesta geração são utilizados quatro plasmídeos. Estas alterações tiveram como objetivo aumentar a biossegurança do vetor lentiviral (VEDOVELI, 2016; PIKANÇO-CASTRO et al., 2008; SAKUMA; BARRY; IKEDA, 2012).

1.4. Produção de vetores lentivirais

Dada a ampla aplicabilidade terapêutica dos vetores lentivirais, a otimização do processo de produção destes vetores tem sido atualmente alvo de intensas pesquisas. Quanto a estratégia de produção, é possível utilizar a transfecção transiente com construção dos plasmídeos separados ou a expressão estável. A expressão estável demanda maior tempo de desenvolvimento em comparação com a transfecção transiente, que é mais econômica, rápida e possui maior flexibilidade (BROUSSAU et al., 2008). Protocolos escalonáveis de transfecção transiente têm sido estudados utilizando como mediadores o fosfato de cálcio (CaPO_4^-) ou polietilenoimina (PEI). O CaPO_4^- age por meio de precipitação levando a formação do complexo com o DNA (ANSORGE, 2010; ANSORGE et al., 2009).

O reagente PEI é um polímero catiônico que condensa o DNA em partículas de carga positiva, estas possuem a capacidade de se ligar aos resíduos aniônicos da membrana celular e são conduzidas para o interior das células pelo processo de endocitose. Esse reagente é bastante utilizado por seu custo-benefício e bons resultados em diferentes tipos celulares (FUKUMOTO et al., 2010; YAMANO; DAI; MOURSI, 2010). A liberação dos poliplexos no citoplasma está relacionada com o aumento da carga catiônica desencadeada pela alteração de pH e consequente desestabilização da membrana (HALL et al., 2017). Este agente de transfecção possui diversas vantagens, como a independência das condições de cultura e a versatilidade, uma vez que pode ser utilizado tanto em culturas aderentes quanto em suspensão, mostrando-se como a melhor opção para aplicação em larga escala (KURODA et al., 2009). Para a produção de vetores lentivirais em cultura em monocamada (células aderentes) outros agentes catiônicos podem ser utilizados para aumentar a eficiência da transfecção como lipofectamina, fugGENE e 293fectin (PHAM; KAMEN; DUROCHER; 2006).

Para a aplicação da transfecção transiente em larga escala, a escolha da linhagem celular é um dos aspectos fundamentais. As linhagens celulares de mamíferos têm sido amplamente utilizadas na produção de vetores lentivirais, sendo a HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*), derivada de rim de embrião humano (GRAHAM et al., 1977), a mais utilizada. Dentre os motivos para isto destaca-se sua natureza humana, segurança assim como sua versatilidade, podendo ser cultivada em monocamada ou ser adaptadas para crescimento em suspensão (FARSON et al., 2001; ANSORGE, 2010). Possui diversas variantes, HEK293 - 293T, 293FT, 293SF, 293E6E, 293T/17 – sendo a última a mais utilizada atualmente.

1.4.1. Produção em cultura em monocamada em meio contendo SFB

O cultivo celular em monocamada (células aderidas a uma superfície) utilizando meios de cultura suplementados com soro fetal bovino (SFB) é o principal método de produção de vetores lentivirais em centros de pesquisa e universidades. Apesar da boa capacidade de produção, capaz de atender às pesquisas clínicas em fases iniciais, esse método de produção apresenta limitações relacionadas à escalabilidade, ausência de controle das principais variáveis de cultivo e maior demanda de manipulação (SEGURA et al., 2013). A produção de maiores quantidade de partículas lentivirais em monocamada tem sido realizada também em sistemas de cultivo multicamadas (CellFactories, CellStacks). Este método, no entanto, demanda muito espaço, podendo haver heterogeneidade no ambiente de cultivo em função das trocas gasosas e de nutrientes não uniformes. Além disso, o acompanhamento da morfologia celular e confluência da cultura é difícil em função das inúmeras camadas (MERTEN; HEBBEN; BOVOLENTA; 2016). A escalabilidade da produção em culturas em monocamada, portanto, é bastante limitada, já que envolve o aumento significativo da área superficial para crescimento celular (SEGURA et al., 2013). Alternativas para aumento da escala envolvem a utilização de biorreatores em que as células ficam ancoradas em uma superfície como o biorreator de fibra oca e leito fixo ou a utilização de microcarregadores suspensos no meio de cultivo onde as células ficam ancoradas (MCCARRON et al., 2016).

1.4.2. Produção em suspensão em meios livres de SFB

A utilização de células cultivadas em suspensão é uma alternativa mais viável para o escalonamento do bioprocessamento de produção de vetores lentivirais, pois possibilita a utilização de biorreatores do tipo tanque agitado. A produção neste tipo de biorreator tem diversas vantagens, é escalonável, mais viável economicamente, envolve menor manipulação por operadores, reduzindo o tempo de processo e pode ser automatizada possibilitando maior monitoramento e facilidade no controle do processo. A estratégia mais usada tem sido a adaptação de linhagens celulares originalmente aderentes para cultivo em suspensão, para poderem então ser cultivadas em biorreatores do tipo tanque agitado (MCCARRON et al., 2016). Neste tipo de cultivo têm-se obtido bons níveis de produção de proteínas recombinantes utilizando o método de transfecção transiente com elevadas densidades celulares tanto em frascos agitados em shaker quanto em biorreatores. Diversos trabalhos têm investigado estratégias para produção e escalonamento de vetores lentivirais em culturas em suspensão (MANCEUR et al., 2017; SEGURA et al., 2007; ANSORGE et al., 2009; BROUSSAU et al., 2008; MARCEAU, 2013). Variantes da HEK293 já foram adaptadas para o cultivo em suspensão sem a necessidade do uso de microcarregadores e com meio livre de soro fetal bovino (SFB) (SWIECH et al., 2011; BIAGGIO et al., 2015). O emprego de meios livres de SFB é também desejável, pois a composição do soro é variável e indefinida, o processo de purificação do produto de interesse torna-se mais complexo, a variabilidade lote a lote torna-se maior e há possível presença de contaminantes como proteínas, que podem ser alergênicas/imunogênicas. Estes fatores dificultam o emprego deste tipo de suplementação no setor de bioprodutos e saúde (BIAGGIO et al., 2015). Apesar de mais atrativo do ponto de vista da produção em larga escala, o processo em suspensão apresenta alguns parâmetros críticos que precisam ser devidamente otimizados para garantir alta eficiência de transfecção.

1.5. Otimização da produção de vetores lentivirais

1.5.1. Variáveis que influenciam a transfecção transiente

O processo de transfecção transiente consiste na introdução de DNA exógeno que permanece nas células sem integração ao genoma, ou seja, de forma episomal. Assim, com o tempo, o DNA é degradado ou perdido durante o processo de divisão celular, produzindo, portanto, de maneira transitória o produto de interesse, sejam proteínas ou partículas virais. O processo é bastante utilizado em razão do baixo consumo de tempo quando comparado com a linhagem celular de expressão estável, esta última abordagem envolve meses para seleção do clone. Já a expressão transiente pode ser feita em alguns dias, rendendo altas quantidades de produto. Outra vantagem é a flexibilidade do processo, podendo ser realizado em pequena quantidade em placas com 96 poços ou em grande escala utilizando biorreatores (RAYMOND et al., 2011; GUTIÉRREZ-GRANADOS et al., 2018). Apesar das diversas vantagens da transfecção transiente, algumas limitações são bastante discutidas sendo as principais a necessidade de grande quantidade de DNA ou reagente de transfecção para aplicações em grande escala. Além disso, o protocolo de transfecção deve ser adaptado para cada objetivo/condição, sendo necessário analisar e definir a linhagem celular produtora e as diversas variáveis de processo (GUTIÉRREZ-GRANADOS et al., 2018). Dentre as variáveis mais estudadas temos o meio de cultivo, qualidade do DNA plasmidial, formação do complexo PEI:DNA, densidade celular no momento da transfecção, quantidade de DNA adicionada e utilização de aditivos que aumentam a eficiência de transfecção e produtividade.

O meio de cultivo tem sido um importante influenciador no processo de transfecção transiente; já foi comprovado que a troca completa por meio de cultivo fresco antes da transfecção aumenta a produtividade, assim como a utilização de meio condicionado pode reduzir a quantidade de produto obtida (CERVERA et al., 2013). É necessário também a escolha de um meio de cultivo adequado para um bom crescimento da linhagem celular e também compatível com o processo de transfecção transiente (GUTIÉRREZ-GRANADOS et al., 2018; SEGURA et al., 2007). Outro fator com grande relevância para o sucesso da transfecção transiente é a qualidade do DNA plasmidial, que deve ter um elevado nível de pureza (CHENG et al., 2011).

Vários autores têm estudado a influência do complexo PEI:DNA para a maior eficiência no processo de transfecção. A proporção entre os nitrogênios do PEI e fosfatos de DNA influenciam na eficiência de transfecção e na toxicidade (GODBNEY; WU; MIKOS, 1999). O tempo de incubação, o pH, a força iônica e volume de meio de

cultivo também devem ser avaliados (VANGAAL et al., 2011). O tamanho do complexo, a forma, a carga e grau de condensação de DNA dependem da proporção de DNA e PEI utilizado. O tamanho do complexo PEI:DNA aumenta com o tempo de incubação, assim para obter complexos com a média de 300-400 nm tem sido necessário de 10 a 20 minutos de incubação (GUTIÉRREZ-GRANADOS et al., 2018).

Outra importante variável para o sucesso da transfecção transiente é a concentração do inóculo celular. Geralmente são utilizados inóculos com baixas densidades celulares, cultivados durante 24 a 48 horas para que no dia da transfecção as células estejam na fase exponencial de crescimento (CERVERA et al., 2013; SEGURA et al., 2007; CARPENTIER et al., 2007). Sendo assim, a caracterização cinética da linhagem celular utilizada se torna um procedimento necessário para a obtenção de melhores resultados. A manutenção de alta viabilidade celular acima de 90% e o controle do número de passagens também podem garantir melhor eficiência da transfecção. Quanto maior o número de passagens da cultura, menor a produtividade (BOLLIN; DECHAVANNE; CHEVALET, 2011; DE LOS MILAGROS BASSANI MOLINAS et al., 2014). A concentração celular no momento da transfecção pode variar de $1 - 5 \times 10^6$ células/mL para culturas em batelada (SEGURA et al., 2007; TOM et al., 2008; ANSORGE et al., 2009; GUTIÉRREZ-GRANADOS et al., 2016).

A utilização de aditivos antes ou durante a transfecção transiente têm sido uma estratégia bastante utilizada para aumentar a eficiência de transfecção e a produtividade final. Aditivos como a cloroquina aumentam o pH de endossomos e lisossomos, fato que ajuda a prevenir a degradação do DNA transfectado (PARK et al., 2000). O DMSO é utilizado uma vez que aumenta a porosidade da membrana celular e assim facilita a entrada do complexo de DNA/PEI melhorando a eficiência da transfecção transiente (YE et al., 2009). A cafeína também se mostrou eficiente em aumentar a produção de vetores lentivirais em células HEK293 em suspensão (ELLIS; POTTS; PORTEUS, 2011) e foi definida como condição ótima para aumento de produção de VLP (CERVERA et al., 2015). O Butirato de Sódio tem sido muito empregado, uma vez que este agente atua como um inibidor de desacetilase de histonas (HDAC), impedindo a compactação do DNA e garantindo maior acessibilidade aos promotores, o que melhora a transcrição do RNA e a produção final do vírus (JAALOUK et al., 2006; ANSORGE et al., 2009; MOÇO, 2018). Além dos aditivos citados acima, acetato de lítio (YE et al., 2009; CERVERA et al., 2015) e ácido

valpróico (BACKLIWAL et al., 2008; KISZEL et al., 2019) também têm sido utilizados com o objetivo de otimizar e melhorar o processo de produção de proteínas recombinantes e vetores virais.

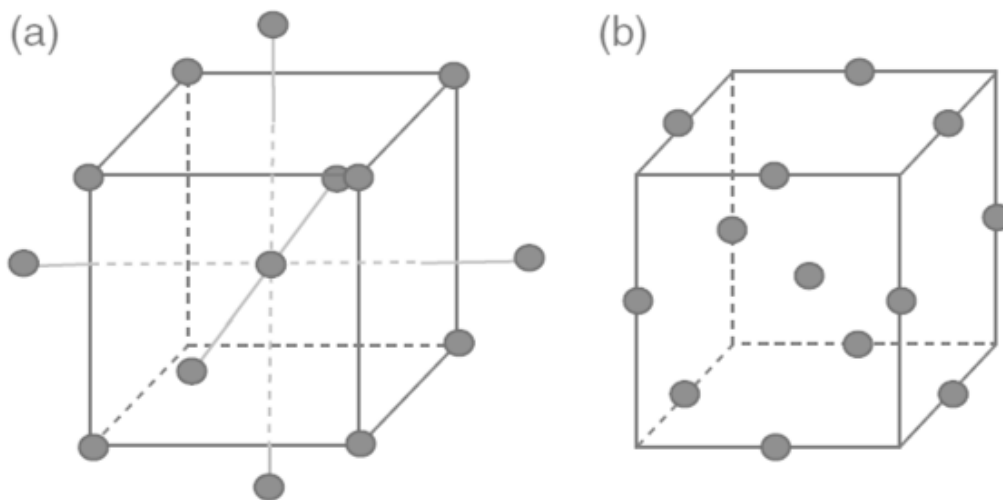
1.5.2. Delineamentos experimentais

Como demonstrado, o processo de transfecção transiente possui inúmeras variáveis. Assim, para a elaboração de um protocolo eficiente e que atenda de maneira satisfatória a adequação de diversas variáveis simultaneamente é necessário a utilização de delineamentos experimentais. Este tipo de análise permite a utilização de um número reduzido de experimentos e gera um modelo matemático que atende simultaneamente mais de uma variável e suas interações. Os delineamentos possuem as variáveis independentes em diferentes níveis para estudar as variáveis resposta, podendo haver dois, três ou cinco níveis para cada fator. A escolha do modelo utilizado é feita baseada no objetivo do estudo, o delineamento Plackett-Burman por exemplo pode ser utilizado para um “screening” inicial para a determinação das variáveis que de fato influenciam em um processo. Este tipo de delineamento utiliza sempre dois níveis (-1, +1) (RITACCO; WU; KHETAN, 2018).

Outros delineamentos são amplamente utilizados na área farmacêutica como Composto Central Rotacional (DCCR) e Box-Behnken (DDB); seus experimentos possuem maior número de fatores e são utilizados quando as variáveis que interferem no processo já são conhecidas e objetiva-se avaliar a melhor combinação de parâmetros dentro de um intervalo especificado. Estes planejamentos encontram-se representados na Figura 4. O DCCR é um design elaborado geralmente considerando cinco níveis, um ponto central e pontos axiais. É bastante eficiente para experimentação sequencial e apresenta-se como um modelo polinomial de segunda ordem, permitindo a determinação da falta de ajuste do modelo baseado nas informações obtidas da análise (PAPANEOPHYTOU, 2019). Os DDB são planejamentos de três níveis (-1, 0, +1) altamente eficientes, composto por planejamentos de blocos incompletos de maneira específica, reduzindo o número de experimentos em relação ao DCCR. Gera um modelo polinomial de segunda ordem e superfície de resposta que permitem a avaliação da falta de ajuste do modelo. O DDB fornece informações satisfatórias para elaboração de um modelo matemático que

forneça ao pesquisador o melhor conjunto de parâmetros para a otimização do processo desejado, porém a previsão de respostas em possíveis pontos axiais fora do cubo são possíveis apenas por meio do modelo DCCR. Um maior número de replicatas do ponto central pode ajudar na precisão do modelo (ROBINSON, 2008).

Figura 4: Representação dos níveis experimentais de um delineamento (a) Composto Central Rotacional (DCCR) e (b) Box-Behnken (DDB).



Fonte: Retirado de Ritacco, Wu e Khentan, 2018

Por meio da utilização de delineamentos experimentais diversos estudos otimizaram processos relacionados a transfeção transiente. O crescimento da HEK293 em suspensão foi otimizado para aumentar a concentração máxima de células em meios sem SFB, inicialmente avaliando aditivos de origem não animal que realmente influenciavam no crescimento celular por meio do design Plackett-Burman. Posteriormente por meio de Box-Behnken as concentrações dos aditivos r-insulina, r-transferina e lipid-mix foram otimizadas para o melhor crescimento da cultura (CERVERA et al., 2011). Já foi possível também avaliar a melhor concentração celular, quantidade de DNA e PEI para produção de proteínas recombinantes utilizando transfeção transiente em diferentes clones de célula CHO por meio de análise de composto central Box-Wilson (THOMPSON et al., 2011). Gutiérrez-Granados e colaboradores (2016) utilizaram o design Box-Behnken para otimização da produção de “virus like particle” (VLP) por meio de transfeção transiente. As

variáveis avaliadas foram densidade celular no momento da transfecção, proporção da quantidade de DNA por célula e proporção de PEI:DNA, identificando a melhor combinação para maior produtividade. Alguns estudos também utilizaram o delineamento Box-Behnken para otimizar a transfecção transiente na produção de VLP, porém testando diferentes aditivos como ácido valpróico, butirato de sódio, cafeína, acetato de lítio, nocodazol e hidroxiuréia. Neste mesmo trabalho, inicialmente foi realizado um “screening” inicial por meio de Plackett-Burman para avaliar os compostos que influenciavam mais no processo de transfecção transiente e o design DCCR também foi utilizado para avaliação da melhor concentração de células e proporção de DNA utilizada (CERVERA et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Este trabalho foi desenvolvido no contexto do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular no Câncer (FAPESP14/50947-7), coordenado pelo Prof. Dr Dimas Tadeu Covas do Hemocentro de Ribeirão Preto – FMRP-USP. O projeto envolve um extenso programa de pesquisas básicas e clínicas para entender, isolar, cultivar e usar terapeuticamente células-tronco somáticas e pluripotentes assim como células imunocompetentes, tanto em modelos animais como em humanos.

A imunoterapia para o tratamento do câncer foi considerada pela revista Science como o grande acontecimento científico de 2013, tendo sido destacados os tratamentos com anticorpos anti-CTLA-4 e anti-PD1, e a imunoterapia com células T-CAR (Chimeric Antigen Receptor T Cells) que foram capazes de induzir potente resposta antitumoral. Uma das propostas do centro é gerar e produzir células T-CAR para o tratamento de neoplasias de células B tanto em modelos animais quanto em humanos. Para a geração de células T-CAR tem sido utilizados os vetores lentivirais. A presente proposta vem ao encontro à necessidade de produzir estes vetores de maneira eficiente, escalonável e com custo efetivo para viabilizar os estudos clínicos que serão conduzidos pelo Hemocentro de Ribeirão Preto. Vale ressaltar que já foi comprovada a eficácia das células T-CAR geradas no contexto do projeto tanto *in vitro* quanto *in vivo* em modelos animais (PICANÇO-CASTRO et al., 2019). Um dos próximos passos do projeto envolve a produção em maiores quantidades dos vetores lentivirais para atender a demanda do estudo clínico.

As terapias utilizando células T-CAR disponíveis comercialmente variam de 373 a 475000 dólares/dose, valores extremamente inacessíveis para a maioria da população mundial. Quando avaliados os índices brasileiros, no ano de 2020, foram registrados pela WHO mais de 20000 casos de leucemias e linfomas, sendo que a taxa de mortalidade foi de metade destes pacientes (WHO, 2020). Desta forma, o desenvolvimento de uma tecnologia brasileira disponível no sistema única de saúde é extremamente relevante. No entanto, os altos custos da terapia com células T-CAR encontram-se nos diversos processos da mesma, assim o estudo de estratégias para redução do custo e aumento de escala de cada etapa torna-se relevante. A produção do vetor viral tem sido considerada como a etapa de custo mais elevado para a

obtenção células T-CAR, sendo ainda maior no contexto das terapias gênicas utilizando células tronco hematopoéticas, que necessitam de vetores com maior grau de pureza. Assim, existe grande interesse na otimização do processo de produção e redução de custo nestas terapias para aumento do potencial comercial destas terapias e atendimento da demanda de pacientes (COMISEL et al., 2020). Além disso, outras terapias celulares, como as com células tronco hematopoiéticas, também necessitam de plataformas de produção de vetores virais mais viáveis. Desta forma, os estudos de otimização da etapa de produção viral têm sido bastante relevantes no cenário atual envolvendo diferentes terapias celulares e gênicas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste estudo foi a produção de vetores lentivirais em células humanas cultivadas em suspensão sob condições escalonáveis e otimizadas para geração de células T-CAR.

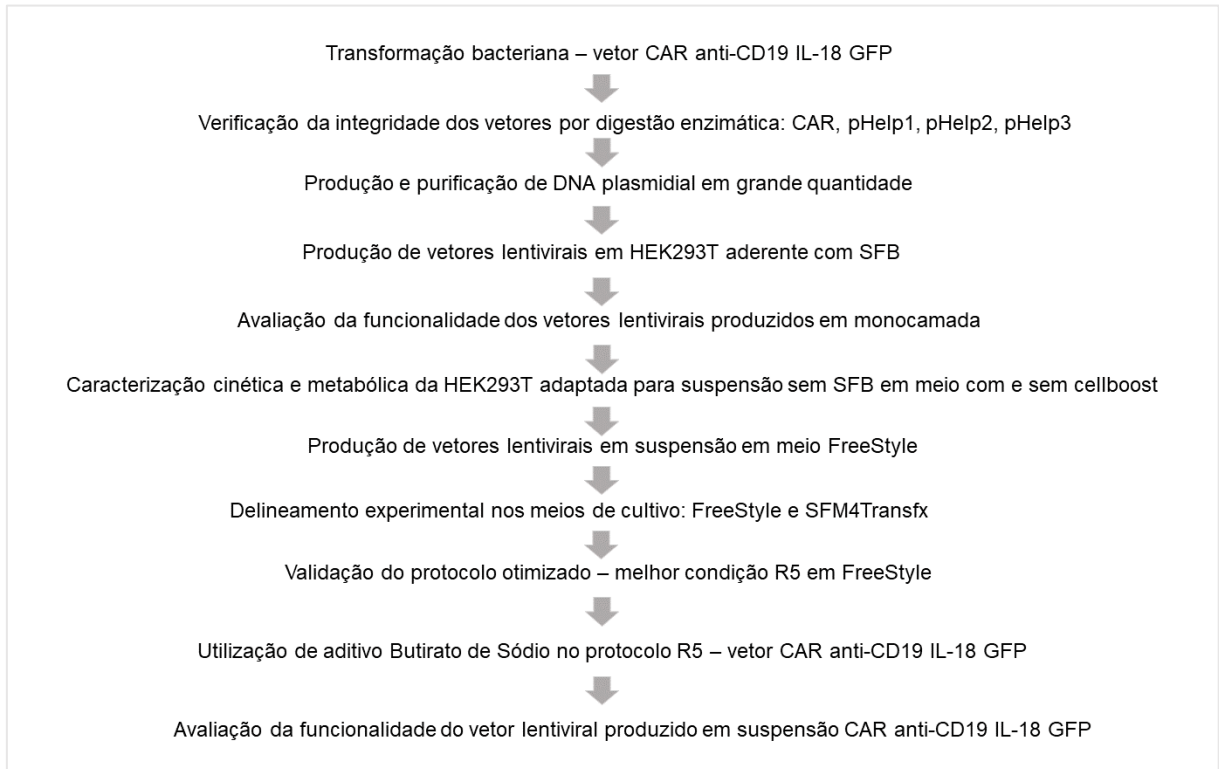
3.2. Objetivos específicos

- Produção de vetores lentivirais em condição de cultivo aderente com SFB utilizando o reagente de transfecção PEI como condição controle;
- Avaliação da funcionalidade dos vetores produzidos em cultura aderente por meio da geração de células T CAR;
- Caracterização cinética e metabólica da linhagem HEK293T adaptada para o cultivo em suspensão em meio de cultura livre de SFB;
- Produção de vetores lentivirais em suspensão com meio livre de SFB sob agitação utilizando o reagente de transfecção PEI;
- Estabelecimento de condições otimizadas para produção em suspensão utilizando meio livre de SFB em pequena escala utilizando frascos *Spin*;
- Avaliação da funcionalidade dos vetores produzidos em suspensão por meio da geração de células T-CAR.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 5 apresenta as etapas de desenvolvimento do presente trabalho em ordem cronológica.

Figura 5: Fluxograma ilustrativo das etapas do desenvolvimento do projeto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1. Linhagens celulares e meios de cultura

A linhagem celular utilizada neste estudo, derivada do rim embrionário humano, foi a HEK293T – *Human Embryonic Kidney 293 T* – (ATCC® CRL-3216™). Um banco de células aderentes livre de micoplasma encontra-se disponível no Laboratório de Cultura Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto. Para o cultivo em suspensão foram utilizadas células HEK293T satisfatoriamente adaptadas para esta finalidade, estabelecidas no projeto de iniciação científica FAPESP processo nº 2017/21737-2 (LOMBA, 2018). Para o cultivo das células HEK293T foram usados dois tipos de meio de cultura comerciais. Para células aderentes utilizou-se DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's medium* – (Sigma-Aldrich D5648) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino – SFB (*Sigma-Aldrich F2442*) e para as células em suspensão o meio livre de

SFB FreeStyle 293 Expression Medium (*Invitrogen*) suplementado ou não com 10% de Cellboost- 5 (CN-F) (*HyClone - GE Healthcare*).

A linhagem celular *Jurkat* (CD4+ derivada de Leucemia Linfóide aguda) foi utilizada para determinação do título viral, sendo cultivada em suspensão estática em meio RPMI-1640 (*Sigma Aldrich*) (sem vermelho de fenol) suplementado com 10% SFB.

A linhagem celular *Raji* (CD19+), derivada de Linfoma de Burkitt (Linfócito B), foi cultivada em suspensão em meio RPMI-1640 (*Sigma Aldrich*) (com vermelho de fenol) suplementado com 10% de SFB, sendo utilizada para realização do co-cultivo com o linfócito T e T CAR.

Os linfócitos T humanos provenientes de PBMC (Células Mononucleares de Sangue Periférico) obtidas após aprovação pelo comitê de ética (CAAE 65063217.4.00005440 – nº 2.183.633 – Hospital das Clínicas - FMRP), foram cultivados em suspensão estática utilizando meio X-VIVOTM 15 (*Lonza*) ou RPMI-1640 (*Sigma Aldrich*) (com vermelho de fenol) suplementado com 10% de SFB.

4.2 Condições de cultivo das células

Cultivo em frasco T: A linhagem celular HEK293T é originalmente uma célula de cultivo aderente, dessa forma na primeira etapa deste trabalho as células foram cultivadas em frascos T de 175 cm² contendo 25 mL de meio de cultura DMEM 10% SFB, e mantidas em incubadora com 5% de CO₂ à 37°C.

Cultivo em suspensão: Na segunda etapa, o cultivo em suspensão foi realizado em Erlenmeyers de 125 e 250 mL contendo 20 mL e 40 mL de volume de trabalho, respectivamente, ou em Corning® mini biorreator 50 mL contendo 5 mL de volume de trabalho, ambos em meio de cultura livre de SFB FreeStyle suplementado ou não com 10% de Cellboost- 5 (CN-F) (*HyClone - GE Healthcare*). Foram submetidos à agitação de 150-180 rpm em plataforma orbital sob condições controladas de 5% de CO₂ à 37°C. A cada 48h-72h foram realizados subcultivos em ambas as condições, utilizando concentração celular inicial de 3x10⁵ células/mL.

4.3 Plasmídeos

O vetor lentiviral utilizado neste trabalho foi de terceira geração composto por quatro DNAs plasmidiais. São eles: pHelp1 (*gag-pol* - 9918 pb) contendo os genes estruturais do vírus responsáveis pela montagem do capsídeo, pHelp2 (VSV-G – 6051 pb) que codifica a glicoproteína do envelope viral, pHelp3 (rev – 4180 pb) contendo genes regulatórios responsáveis pela codificação de proteínas virais e o cassete de expressão para o transgene de interesse CAR anti-CD19 IL-18 GFP – 1054 (vetor de expressão – 12792 pb) contendo o domínio co-estimulatório 4-1BB.

4.4. Transformação bacteriana para produção dos plasmídeos

O DNA CAR CD19 IL-18-1054 - EF1a - GFP (*GenScript*) foi centrifugado à 6000 x g por 1 minuto a 4°C e homogeneizado em 20 µL de água estéril. As bactérias competentes (*Escherichia coli* - *Stbl3*TM) armazenadas a -80°C foram descongeladas em banho de gelo por 15 minutos e distribuídas em tubos previamente resfriados. O DNA foi adicionado no volume de 2µL por tubo e mantido em repouso por 30 minutos em banho de gelo. O procedimento de choque térmico foi realizado mantendo a amostra por 1 minuto a 42°C seguido de banho de gelo por 5 minutos. O procedimento foi finalizado com a adição de 270 µL de meio *SOC* (*Invitrogen*TM) e incubação sob agitação à 230 rpm e 37°C durante 60 minutos. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar contendo ampicilina para expansão dos clones modificados.

Após este procedimento todos os DNAs plasmidiais foram submetidos a digestão com enzimas de restrição para determinação da integridade das sequências nucleotídicas. A digestão enzimática foi realizada à 37°C por 15 minutos e a eletroforese em gel de agarose (1%) foi realizada a 60V por 65 minutos. O marcador de peso molecular utilizado foi o GelPilot® 1kb Plus Ladder (QIAGEN) de 10.000 pares de bases.

4.5. Produção e purificação de plasmídeos

A *Escherichia coli* transformada foi cultivada em meio LB ágar contendo ampicilina durante 16h à 37°C. Uma única colônia foi selecionada para expansão com o objetivo de garantir homogeneidade da cultura, sendo utilizado meio LB contendo antibiótico seletivo adequado (Ampicilina/Estreptomicina) (1mL LB: 1μL ampicilina: 1μL inóculo). O cultivo foi mantido sob condições padronizadas de agitação 230 rpm à 37°C durante 16h. A extração do DNA foi realizada por meio do Kit de purificação de plasmídeo Maxi/Giga prep (Qiagen Cat. No. 12163/12191) seguindo as instruções do fabricante.

4.6. Produção de vetores lentivirais

O reagente de transfecção utilizado foi a polietilenoimina (PEI) linear 25kDa (*PEIPro - Polyplus transfection*). Foram utilizados os seguintes métodos de produção de lentivírus na execução deste estudo.

4.6.1. Produção em células aderentes - monocamada

Foram inoculadas 20000 células/cm² em frascos T175 cm² para obtenção de 60-80% de confluência após 48h. Em um tubo foram adicionados 6 mL de DMEM sem soro e o DNA lentiviral mantendo a proporção 3:1:1:1 (CAR:pHelp1:pHelp2:pHelp3). Após homogeneização, o reagente de transfecção PEI foi adicionado para a formação de um complexo com o DNA (poliplexo) na proporção PEI:DNA de 3:1. A quantidade de DNA total utilizada foi de 60 μg (sendo 30μg :10μg :10μg :10μg) e 180 μg de PEI. A quantidade de PEI foi de 2,28 pg/célula e a quantidade de DNA foi de 0,76 pg/célula (0,76 μg/10⁶ células). Foram necessários 15 minutos para formação do complexo PEI:DNA. Nos frascos T175 contendo as células foram adicionados 19 mL de meio DMEM 10% SFB e 6 mL da mistura contendo os poliplexos. A incubação foi realizada à 37°C por 24h e após este período o meio de cultura foi totalmente substituído por meio fresco. Após 24h, 48h e 72h o sobrenadante contendo as partículas lentivirais produzidas foi coletado, centrifugado a 350 x g por 10 minutos a 4°C e filtrado (0,45 μm). O sobrenadante clarificado foi centrifugado a 3000 x g por 1h 30 minutos à 4°C

em Vivaspin 20 (100 kDa), para concentração das partículas virais, e armazenado a -80°C para posterior determinação do título viral.

4.6.2. Produção em células em suspensão

Protocolo 1: No dia anterior à transfecção (24h), as células HEK293T adaptadas foram inoculadas em Erlenmeyer ou Corning® mini biorreator na densidade celular de 1×10^6 células/mL para que no dia da transfecção a cultura estivesse com uma densidade celular de 2×10^6 células/mL e viabilidade superior a 95%. A quantidade de DNA utilizada foi de $2 \mu\text{g}/10^6$ células, com proporção de plasmídeos de 3:1:1:1 (CAR:pHelp1:pHelp2:pHelp3) e PEI:DNA de 3:1. Os poliplexos foram preparados em volume de 1 mL de meio de cultura fresco e adicionados após incubação de 15 minutos a temperatura ambiente. O crescimento e viabilidade celular foram avaliados em 24, 48, 72 e 96 horas após a transfecção, o sobrenadante foi coletado em 48, 72 e 96 horas e a eficiência de transfecção foi avaliada em 48 horas por citometria de fluxo. A coleta dos sobrenadantes foi realizada por meio de centrifugação de todo o volume do frasco de cultivo a $350 \times g$ por 10 minutos à temperatura de 4°C seguida de filtração ($0,45 \mu\text{m}$). O pellet resultante foi ressuspendido em meio fresco (FreeStyle + 10% Cellboost 5) e retornou a incubadora com agitação orbital.

Protocolo 2: O procedimento realizado foi idêntico ao Protocolo 1, porém o meio de cultivo utilizado foi FreeStyle sem suplementação com Cellboost-5.

4.7. Delineamento experimental - Box-Behnken

Este planejamento foi realizado considerando três variáveis importantes para o sucesso da transfecção transiente: densidade celular (células/mL), quantidade de DNA total ($\mu\text{g}/10^6$ células) e proporção PEI:DNA. O planejamento foi realizado em três níveis (-1; 0; +1) com 15 experimentos, sendo 3 pontos centrais. Dois blocos de experimentos foram realizados utilizando meios de cultivo diferentes para avaliar seu efeito, sendo eles FreeStyle 293 Expression (*Invitrogen*) e SFM4Transfx-293 (*HyClone*). O modelo utilizado pode ser observado nas Tabelas 1 e 2. O software

utilizado para o planejamento experimental e posterior análise dos dados foi o *Statistica 7*.

Tabela 1: Planejamento *Box-Behnken* (3 fatores/1 bloco/ 15 experimentos) com variação de densidade celular (células/mL), quantidade de DNA total ($\mu\text{g}/10^6$ células) e proporção PEI:DNA em três níveis com valores reais dos respectivos níveis em meio de cultivo FreeStyle 293 expression (Invitrogen) e SFM4Transfx-293 (HyClone).

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	1
Densidade celular (células/mL)	1×10^6	3×10^6	5×10^6
Proporção PEI:DNA	2:1	2.5:1	3:1
DNA total ($\mu\text{g}/10^6$ cells)	1	2	3

Tabela 2: Matriz do planejamento *Box-Behnken* (3 fatores/1 bloco/ 15 experimentos) em três níveis (-1, 0, +1) em meio de cultivo FreeStyle 293 expression (Invitrogen) ou SFM4Transfx-293 (HyClone).

Ensaio	Densidade celular	Proporção PEI:DNA	DNA total
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

4.8. Avaliação da funcionalidade das partículas lentivirais produzidas

4.8.1. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

As células mononucleares do sangue periférico aprovadas pelo comitê de ética (CAAE 65063217.4.00005440 – nº 2.183.633 – Hospital das Clínicas - FMRP), foram isoladas através do filtro de leuco-redução de doador de plaquetas saudável. Para separação das células foi utilizado o reagente *Ficoll Paque Plus* (GE).

4.8.2. Isolamento e ativação de linfócitos T

Os linfócitos T (CD3+CD4+ e CD3+CD8+) foram obtidos a partir do PBMC. O isolamento de células T CD3+ foi realizado por seleção magnética utilizando o kit comercial *EasySep Human T cell Enrichment* por seleção negativa seguindo as especificações do fabricante. As células foram lavadas com PBS 1X, centrifugadas por 3 minutos a 1800 rpm e marcadas com anticorpo para determinação da quantidade de células CD3+, CD4+, CD8+ e análise de viabilidade por citometria de fluxo após incubação de 15 minutos a temperatura ambiente na ausência de luz.

A ativação das células foi feita pela adição de beads magnéticas anti-CD3/CD28 (*Dynabeads human T-activator CD3/CD28 – Gibco™*) na proporção de 1:1. O volume desejado foi homogeneizado em tubo de 15 mL, lavado com PBS 1X e agitado por 30 segundos. O tubo foi então introduzido na cuba magnética, o sobrenadante foi descartado e as beads foram ressuspendidas em meio de cultivo X-VIVO 15 (*Lonza*). Os linfócitos T foram plaqueados em placa de 48 poços na concentração de 1×10^6 células/mL. A esta cultura adicionou-se IL-2 (100 IU/mL) e as Dynabeads. A incubação foi realizada por 24h em incubadora 5% CO₂ e 37°C.

4.8.3. Transdução de linfócitos T

Após 24h de incubação, parte dos linfócitos foram modificados utilizando os vetores lentivirais produzidos (CAR IL-18 GFP) para expressão do receptor CAR e parte dos linfócitos T permaneceram sem modificação como condição controle. O MOI (*Multiplicity of infection*) utilizado foi de 5, ou seja, 5 partículas lentivirais para cada célula alvo.

4.8.4. Cultivo de linfócitos T-CAR

Após a transdução, os linfócitos T foram cultivados em placas de cultivo em meio X-VIVO™ 15 Serum-free Hematopoietic Cell Medium sem fenol (*Lonza*) ou RPMI-1640 (*Sigma Aldrich*), ambos suplementados com 10% SFB e 100 UI/mL de IL-2 (*GE Healthcare*). As células foram mantidas na concentração de 1×10^6 células/mL e os subcultivos foram realizados a cada 48h.

4.8.5. Determinação da porcentagem de células T-CAR positivas

Três dias após a transdução, foi determinada a expressão do receptor CAR (anti-CD19) nos linfócitos modificados. Neste procedimento, 1×10^5 células foram coletadas e lavadas com solução de bloqueio 2% *Gamma Goat Globulin* PBS 1X. Posteriormente, as amostras foram marcadas com o anticorpo anti-F(ab') *Alexa Fluor 647* para identificação do antígeno F(ab) nos linfócitos por meio de citometria de fluxo. Reagentes para determinação de células viáveis foram utilizados (7-AAD: 7-aminoactinomicina D ou PI: Iodeto de propídeo).

4.8.6. Ensaio funcional: Co-cultivo Linfócito T-CAR com Raji

Linfócitos T modificados ou não foram plaqueados (placa 24 poços) juntamente com a linhagem Raji em diferentes proporções de Linfócito T: Raji (1:1, 5:1, 10:1) e analisados em 0h e 24h para determinação da ação efetora dos Linfócitos T-CAR gerados. Todo o volume do poço foi coletado, lavado com PBS 1X e centrifugado por

3 minutos a 1800 rpm, sendo o sobrenadante descartado. Posteriormente, o isotipo e o anticorpo APC Mouse Anti-human CD19 (*BD Biosciences*) foram adicionados em seus respectivos tubos e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente na ausência de luz. Foi analisada a expressão de CD19 nas células Raji e a expressão das células CAR+ por citometria de fluxo.

4.9. Métodos analíticos e análise dos resultados

Os métodos analíticos utilizados em todas as etapas deste trabalho estão descritos a seguir.

Análise de concentração celular e viabilidade: A concentração celular e viabilidade foi estimada por meio da contagem das células em câmara de Neubauer utilizando o corante azul de Tripan, o qual cora somente as células com membrana danificada possibilitando determinar as células viáveis.

Análise de substratos e metabólitos: Foram realizadas análises enzimáticas no YSI Biochemical Analyser 2700 (Yellow Springs Instruments, OH) para determinação da concentração do substrato glicose e do metabólito ácido láctico presentes no sobrenadante resultante dos cultivos após centrifugação da amostra a 200 x g por 5 minutos. Todos os resultados foram expressos graficamente utilizando os programas Excel® (Windows) e Origin® (OriginLab Corporation) para elaboração de cálculos e gráficos.

Apresentação dos resultados. A determinação da taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi realizada no software Origin® (OriginLab Corporation) pelo cálculo do coeficiente angular da curva células/mL vs tempo (horas). O tempo de duplicação (t_d) foi avaliado pela equação (1):

$$t_d = \frac{\text{Ln}2}{\mu_{\text{máx}}}(1)$$

O cálculo do fator de conversão de glicose em lactato ($Y_{\text{lac/gli}}$) durante a fase exponencial de crescimento foi determinado pela equação (2):

$$Y_{\text{gli}}^{\text{lac}} = \frac{\Delta \text{lac}}{\Delta \text{gli}} \quad (2)$$

A velocidade específica do consumo de glicose (q_{gli}) e da produção de lactato (q_{lac}) foram calculadas a partir da determinação do coeficiente angular da curva de consumo de glicose/ produção de lactato em função da Integral de células viáveis (ICV) ($\mu\text{g}/10^6$ células/hora).

Os dados obtidos pelo método de citometria de fluxo foram avaliados no software FlowJo™.

Análise da produção de partículas lentivirais: A produção das partículas lentivirais foi analisada por citometria de fluxo (citômetro *FACSFortessa™*). O concentrado viral, em diferentes diluições, foi adicionado a uma cultura de células Jurkat. Estas células foram posteriormente marcadas com o fragmento F(ab)'₂ de IgG de cabra conjugado (*AlexaFluor® 647*) e também foi avaliada a expressão de GFP (*Green Fluorescent Protein*) para determinação do título viral obtido utilizando a equação (3), os valores de expressão de GFP e CD19 foram considerados no intervalo de 3-25%.

$$\text{Título} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mL}} \right) = \frac{\% \text{ CAR} \times n^{\circ} \text{ células} \times \text{fator de diluição}}{\text{Volume de transdução}} (3)$$

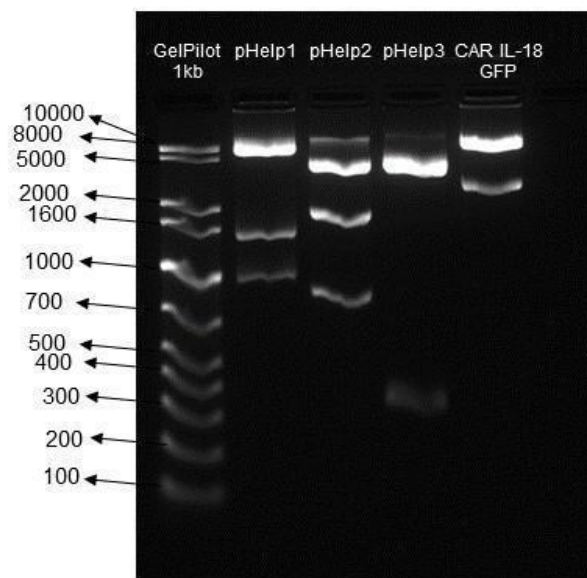
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da integridade dos vetores plasmidiais

A produção de cada um dos 4 vetores plasmidiais foi feita em *E. coli Stb3*TM. Para verificar a integridade parcial das sequências nucleotídicas de cada um dos vetores, foi realizada digestão com enzimas de restrição para comparação do tamanho de cada fragmento obtido na eletroforese em gel de agarose, com o tamanho da sequência informada pelo fornecedor.

O vetor plasmidial pHelp1 (gag-pol) foi digerido com a enzima de restrição Pst I e deve resultar em bandas de tamanhos 927 pb, 1424 pb e 6767 pb. O vetor pHelp2 (VSV-G) foi digerido com Eco RI e como resultado as bandas devem possuir 787 pb, 1668 pb e 3596 pb. O plasmídeo pHelp3 (rev) foi digerido com a enzima Eco RI e deve ter bandas dos tamanhos 300 pb e 3880 pb. O vetor de expressão do receptor CAR que também deve expressar IL-18 e GFP, foi digerido com as enzimas de restrição Sal I e Not I, devendo resultar em bandas dos tamanhos 10192 pb e 2600 pb. Como é possível observar na Figura 6, o tamanho dos fragmentos obtidos foi semelhante ao esperado, confirmando assim a integridade do vetor.

Figura 6: Fragmentos de DNA resultantes da eletroforese em gel de agarose após digestão enzimática dos vetores plasmidiais pHelp1, pHelp2, pHelp3 e CAR IL-18 GFP com enzimas de restrição.



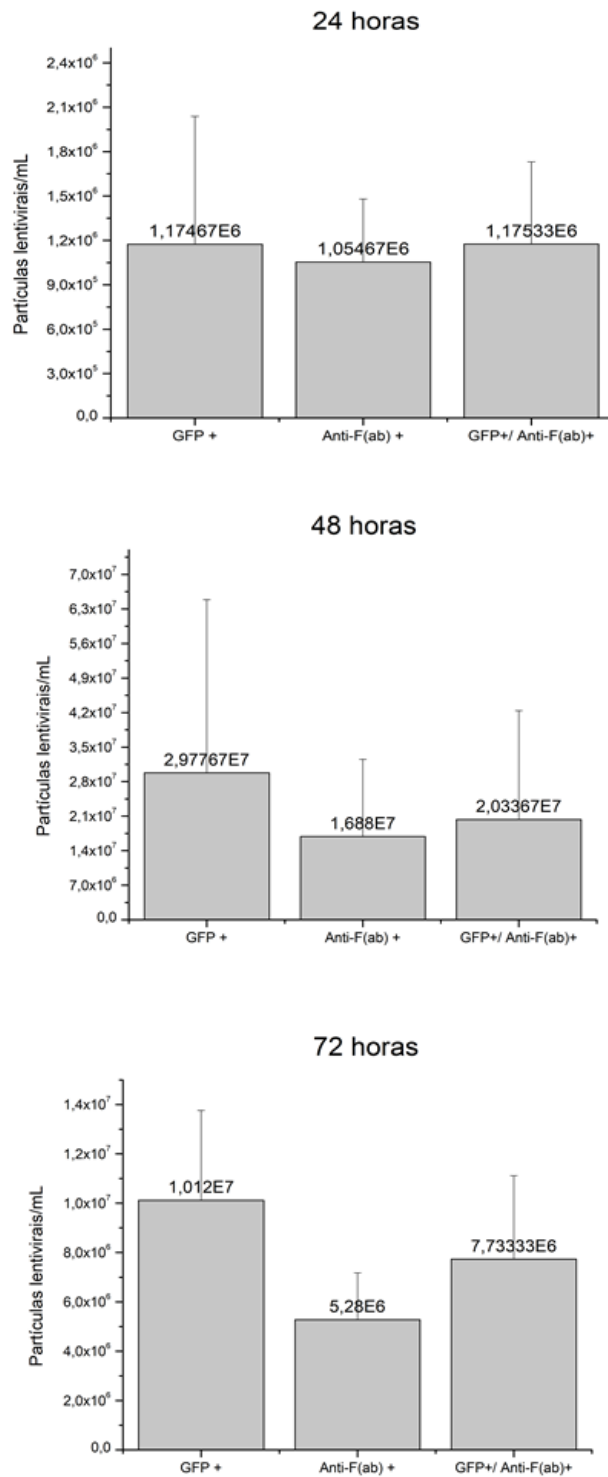
Fonte: Dados do estudo.

5.2. Produção de partículas lentivirais em monocamada com SFB

A produção de partículas lentivirais anti-CD19/IL-18/GFP foi realizada primeiramente em monocamada em células HEK 293T aderentes com meio de cultura suplementado com SFB. As produções tiveram como objetivo testar a funcionalidade do vetor e também para serem utilizadas como um comparativo de produção com a cultura em suspensão em meio livre de SFB. A concentração das partículas lentivirais foi realizada em *Vivaspin 20 100 kDa - GE* no dia da coleta, sendo o fator de concentração em média de 20-25 vezes.

A concentração de partículas produzidas foi determinada por meio de análise da expressão de GFP por citometria de fluxo. A mesma amostra da cultura de célula Jurkat transduzida foi também marcada com o anticorpo anti F(ab) (*AlexaFluor® 647*) para demonstrar o número de células T-CAR positivas e assim comprovar a expressão deste receptor juntamente com a proteína GFP. Cada coleta (24, 48 e 72 horas) foi avaliada separadamente. Como é possível observar na Figura 7, por meio da análise de variância (*ANOVA uma-via*) não foi identificada diferença significativa entre os métodos de quantificação de células CAR positivas ($p > 0,05$), validando assim a análise somente da expressão de GFP.

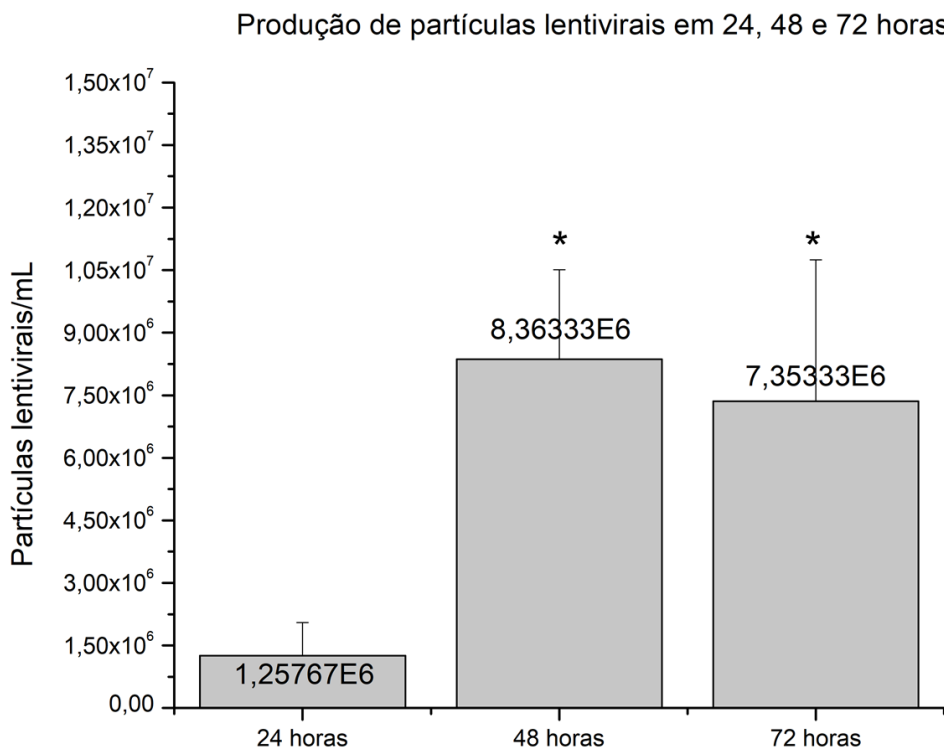
Figura 7: Produção de partículas lentivirais CAR IL-18 GFP em células HEK293T cultivadas em meio DMEM + 10% SFB em monocamada (frascos T175 cm²). O sobrenadante foi coletado 24h, 48h e 72h após a transfeção transiente. Análise comparativa entre a expressão de GFP, anti F(ab) e dupla expressão por análise de citometria de fluxo. Dados representados como Média \pm desvio padrão, n=3. * P < 0,05 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

Após o método quantificação de partículas lentivirais por meio da análise de expressão de GFP ter sido validado, foi possível comparar as médias de cada coleta (24, 48 e 72 horas) avaliando as produções apenas pela expressão de GFP e determinar a influência do tempo na produção de partículas lentivirais (Figura 8). Utilizando a análise de variância (*ANOVA uma-via*) e teste *post-hoc* de Tukey foi possível determinar que a produção em 48 horas ($p=0,044$) e 72 horas ($p=0,023$) foram diferentes quando comparadas com a produção em 24 horas. Estes resultados sugerem que após 48 horas da realização da transfecção transiente a produtividade de lentivírus é maior e, portanto, as coletas podem ser realizadas apenas em 48 e 72 horas.

Figura 8: Comparação da produção de partículas lentivirais em cada coleta realizada (24, 48 e 72 horas) avaliada por meio da expressão de GFP. Dados representados como Média \pm desvio padrão, $n=3$. * $P < 0,05$ (*ANOVA uma-via* seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

A produção total de partículas lentivirais obtida em cada experimento ficou na faixa de $2,1 - 4,7 \times 10^7$ partículas, como está demonstrado na Tabela 3. Assim, sabendo que para transduzir 7×10^5 linfócitos T seriam necessárias 7×10^6 partículas

virais (MOI=10), a produção obtida pode ser utilizada para realizar 13 transduções com 7×10^5 células, ou, modificar um total de aproximadamente $9,1 \times 10^6$ linfócitos T.

Tabela 3: Produção total de partículas lentivirais em cada um dos 3 experimentos.

Experimento	Partículas lentivirais totais (24h+48h+72h)
1	$3,0 \times 10^7$
2	$2,1 \times 10^7$
3	$4,5 \times 10^7$

Fonte: Dados do estudo.

Considerando a concentração de partículas lentivirais, foi possível obter, em média, $1,2 \times 10^6$ partículas/mL em 24 horas, $8,4 \times 10^6$ em 48 horas e $7,3 \times 10^6$ em 72 horas. Toledo, Prieto e Oramas (2009) realizaram produção de lentivírus em células aderentes HEK293FT (linhagem derivada da HEK293T) utilizando PEI e obtiveram em média 1×10^7 partículas/mL. Outros estudos realizando produções lentivirais em HEK293T e PEI também obtiveram títulos virais de $1 - 1,5 \times 10^7$ partículas/mL em meios contendo SFB (KURODA *et al.*, 2009). Nos dois estudos anteriormente citados, foi realizada comparação entre os métodos de transfecção transiente utilizando CaPO_4 e PEI, sendo este último considerado como o mais eficiente e robusto para produção. Moço e colaboradores (2018), utilizando PEI e o aditivo de transfecção Butirato de sódio, obtiveram 7×10^7 TU/mL e sem a presença do aditivo foi produzido em média a metade deste rendimento (MOÇO, 2018). Outros trabalhos relatam produções em monocamada utilizando CaPO_4 em células HEK293T entre $1,2 \times 10^6$ a $1,3 \times 10^8$ TU/mL, o primeiro em Cellfactory e o segundo em placa de 15 cm^2 (KAROLEWSKI, 2003; SENA-ESTEVEES, 2004) ambos utilizando butirato de sódio. Observando estes dados é possível inferir que a produção do presente trabalho se encontra dentro do esperado para cultivos em monocamada com meios suplementados com SFB sem utilização de qualquer tipo de aditivo para aumentar a eficiência da transfecção e/ou produção.

5.3. Avaliação da funcionalidade das partículas lentivirais produzidas em monocamada

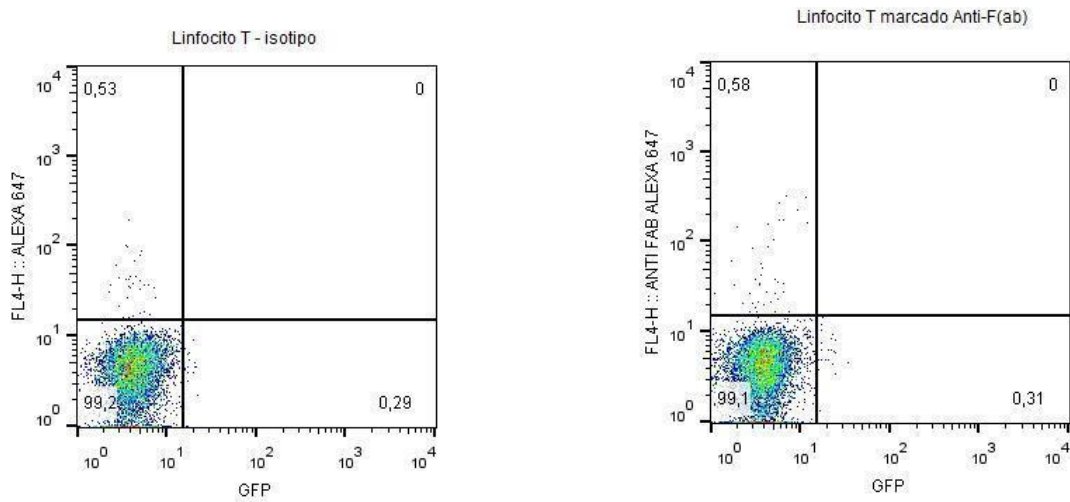
As partículas lentivirais produzidas devem ser capazes de modificar uma célula T para que esta expresse o receptor CAR e então identifique uma célula tumoral que possua CD19 (Células B maduras) em sua superfície desencadeando um efeito citotóxico. Assim, se faz necessário testar a funcionalidade das partículas lentivirais produzidas, tanto por meio da capacidade de modificar os linfócitos T quanto proporcionar uma resposta de defesa antitumoral específica e dirigida.

5.3.1. Modificação do linfócito T

A modificação dos linfócitos T foi realizada por meio de transdução, assim em uma cultura com 7×10^5 linfócitos T foram adicionadas 7×10^6 partículas virais (MOI=10) juntamente com o reagente Polybrene® para neutralizar as cargas e aumentar as ligações proteicas entre o capsídeo viral e a membrana celular, facilitando a entrada das partículas nas células. Neste experimento, uma cultura de linfócitos T não transduzida foi utilizada como condição controle. A transdução foi realizada 1 dia após o descongelamento do PBMC e isolamento dos linfócitos T. O acompanhamento da expressão de linfócitos T-CAR positivos foi realizado à medida que a expansão da cultura foi realizada. Após 14 dias, a cultura alcançou $3,4 \times 10^7$ linfócitos totais (fator de expansão de 48x) e foi realizada a determinação da quantidade de células T-CAR+ para início do co-cultivo.

Na Figura 9, como esperado, é possível observar que na condição controle (linfócitos T não transduzidos) não foi possível identificar nenhuma célula T-CAR+ ou GFP+ (0%), tanto no isotipo quanto na adição do anticorpo anti-F(ab) que identifica a região F(ab) do receptor CAR.

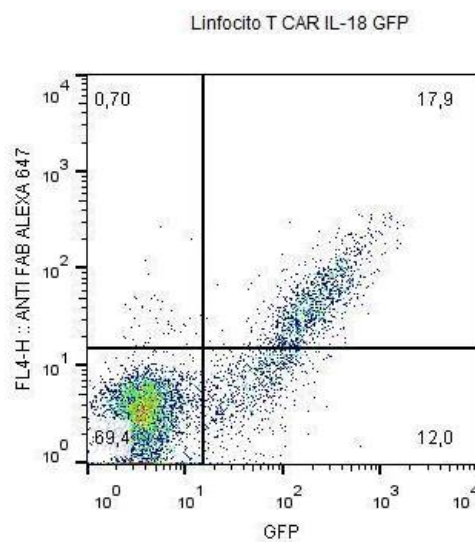
Figura 9: Citometria de fluxo dos linfócitos T não transduzidos com adição de isotipo para eliminar ligações inespecíficas e posteriormente marcação com anticorpo anti-F(ab) que identifica a região F(ab) do receptor CAR.



Fonte: Dados do estudo.

A Figura 10 mostra o resultado da citometria de fluxo dos linfócitos T transduzidos com o vetor lentiviral CAR anti-CD19 IL-18 GFP. É possível observar que a presença de células T-CAR+ e GFP+ foi confirmada com valor de 17,9%.

Figura 10: Citometria de fluxo dos linfócitos T transduzidos com o vetor lentiviral CAR anti-CD19 IL-18 GFP. O quadrante superior direito identifica a quantidade de células, em porcentagem (%), positivas para a porção F(ab) do CAR e expressão de GFP.



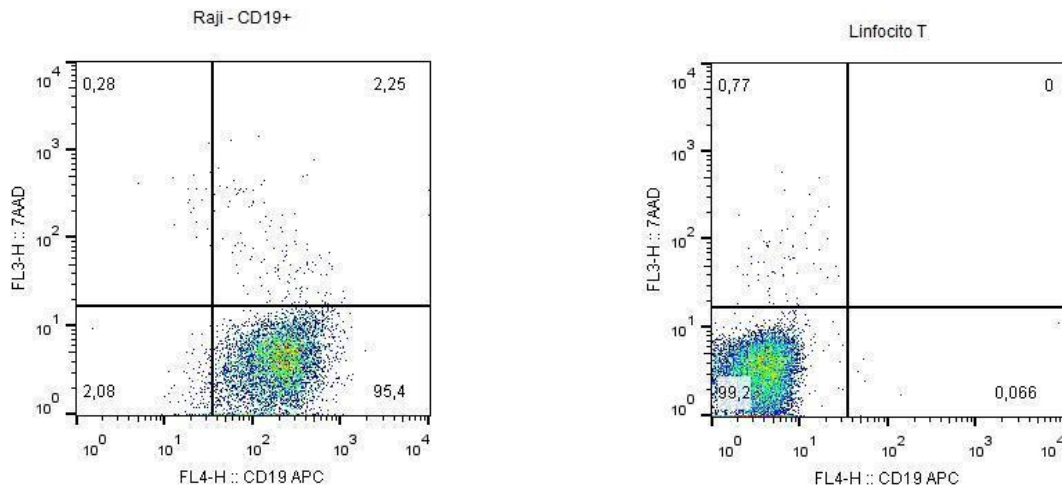
Fonte: Dados do estudo.

Estes resultados demonstraram que as partículas lentivirais produzidas foram capazes de modificar um linfócito T humano gerando um linfócito T-CAR. Assim, a próxima etapa envolveu a avaliação da funcionalidade biológica destes linfócitos modificados.

5.3.2. Cocultivo linfócito T-CAR e linhagem CD19+

Para avaliação da atividade antitumoral e especificidade pelo antígeno CD19, linfócitos T modificados ou não foram cocultivados com uma linhagem celular CD19+ (Raji), esta foi escolhida para mimetizar uma célula B tumoral madura que expressa o antígeno CD19 em sua superfície. A análise foi realizada em 0 horas e 24 horas após o plaqueamento das células. A quantidade de linfócitos T e células Raji adicionados, respectivamente na cultura seguiu três diferentes proporções, 1:1, 5:1 e 10:1. Para determinação da quantidade de linfócitos T-CAR que deveriam ser adicionados utilizou-se a porcentagem de células CAR+ determinada no experimento anterior. A quantidade de células Raji utilizada foi de $0,5 \times 10^5$ células por cultivo. A análise do cocultivo foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o marcador de viabilidade 7-AAD e anticorpo para identificação de células CD19 positivas. Os experimentos de cocultivo foram realizados em duplicata. A Figura 11 apresenta a análise das duas populações de células, Raji e Linfócito T, separadamente. As células CD19 positivas permanecem à esquerda da imagem.

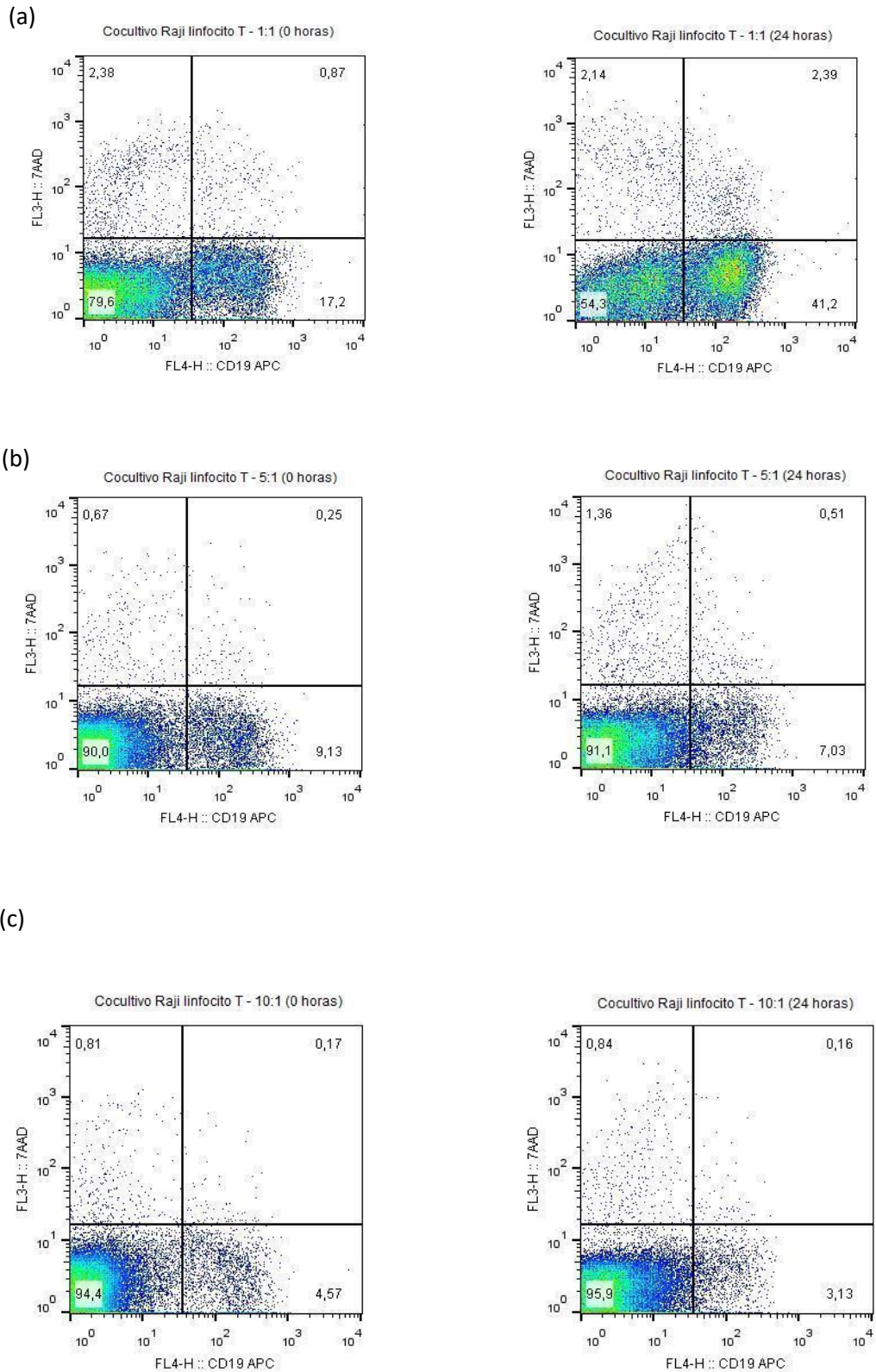
Figura 11: Citometria de fluxo de células CD19+ marcadas com anticorpo CD19 (à esquerda) para identificação das células Raji vivas e linfócitos T viáveis que não possuem CD19 em sua superfície (à direita).



Fonte: Dados do estudo.

A Figura 12 mostra os resultados do co-cultivo de um linfócito T não modificado. É possível observar o comportamento de cada uma das populações celulares (CD19+ e CD19-) no início e após 24 horas de co-cultivo, que indica que o linfócito T não provocou a morte da maioria das células Raji. Na Figura 13, foi demonstrado que no cocultivo com os linfócitos T-CAR, após 24 horas, a população de células Raji foi bastante reduzida, sugerindo um efeito citotóxico das células T-CAR.

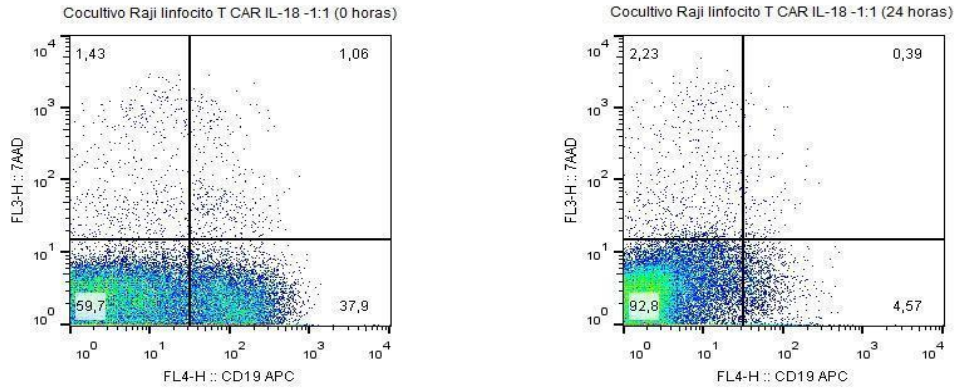
Figura 12: Co-cultivo da condição controle Raji com linfócito T não transduzido. (a) Proporção Linfócitos T não transduzidos e células Raji de 1:1, 0 e 24 horas de cocultivo, (b) proporção de células de 5:1, 0 e 24 horas de cocultivo e (c) proporção de células de 10:1, em 0 e 24 horas de cocultivo.



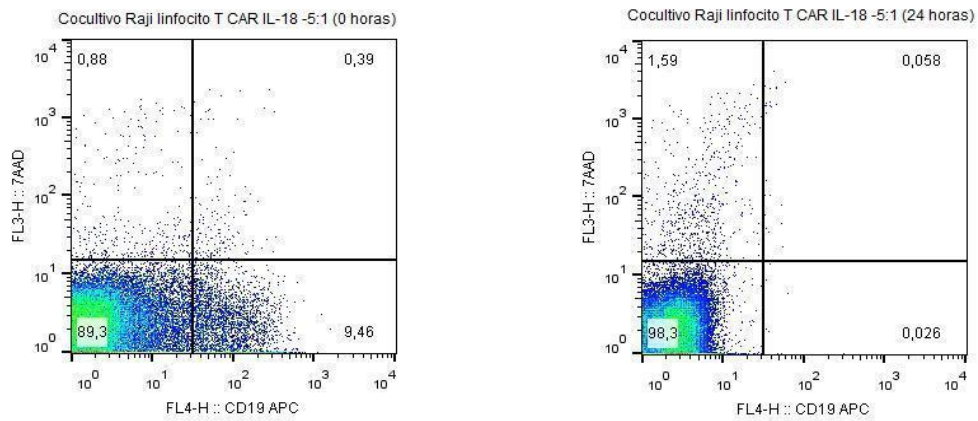
Fonte: Dados do estudo.

Figura 13: Co-cultivo da Raji com o linfócito T CAR IL-18 GFP. (a) Proporção Linfócito T CAR IL-18 GFP e célula Raji de 1:1, 0 e 24 horas de cocultivo, (b) proporção de células de 5:1, 0 e 24 horas de cocultivo e (c) proporção de células de 10:1, em 0 e 24 horas de cocultivo.

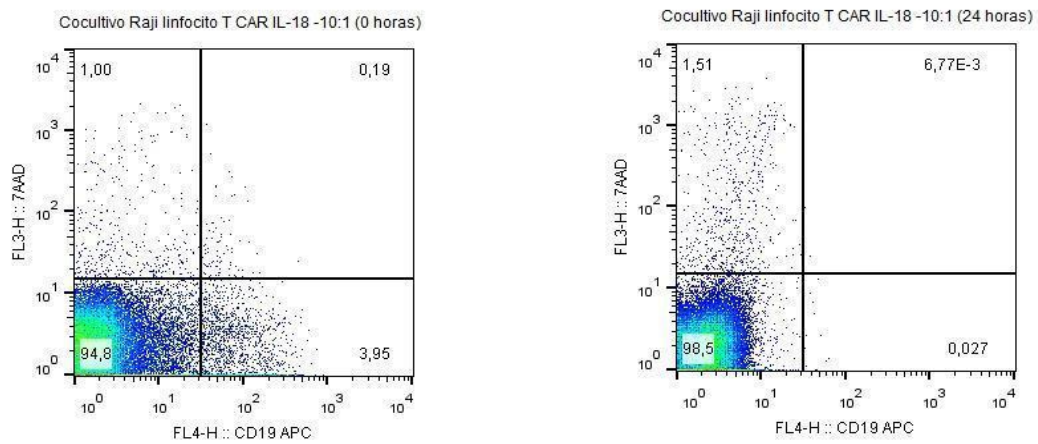
(a)



(b)



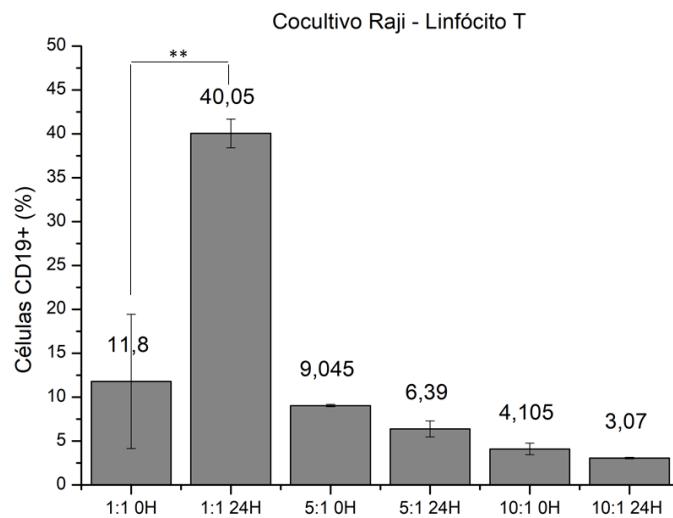
(c)



Fonte: Dados do estudo.

Os resultados obtidos anteriormente foram analisados estatisticamente pelo teste de variância ANOVA de uma-avia seguido de teste de Tukey, comparando cada uma das proporções entre si em 0 e 24 horas. Na Figura 14, é possível observar que nas proporções 5:1 e 10:1 não houve diferença entre o número de células Raji no cultivo em 0 e 24 horas. A proporção de 1:1 apresentou diferença entre os dois tempos analisados. Estes dados indicam que não houve morte significativa da população CD19+ provocada pelo linfócito T não transduzido.

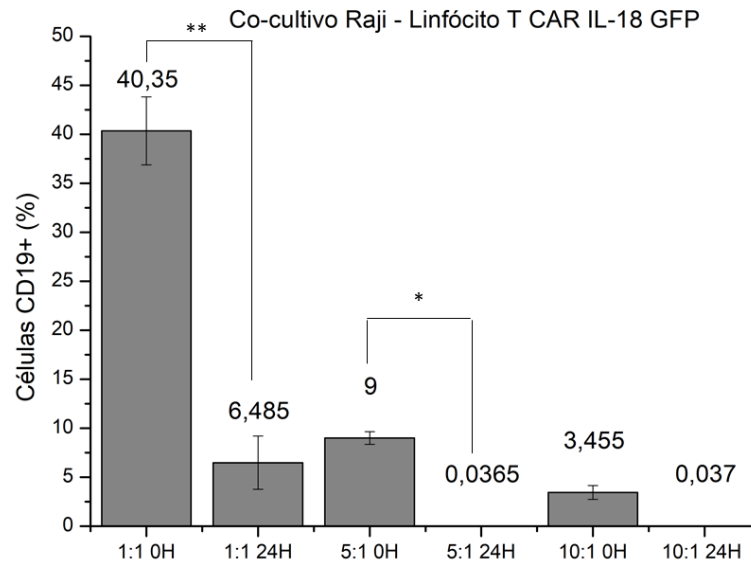
Figura 14: Co-cultivo em 0 e 24 horas em três diferentes proporções 1:1, 5:1, 10:1 de linfócito T não transduzido e da célula Raji CD19+. Média \pm desvio padrão, n=2. *P < 0,05 **P < 0,001 (ANOVA uma-avia seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

Na Figura 15, por sua vez, é possível identificar uma redução significativa da população de células Raji entre 0 e 24 horas de cultivo nas proporções de 1:1 e 5:1. A proporção 10:1 não apresentou diferença, apesar de ser possível perceber uma pequena redução.

Figura 15: Co-cultivo em 0 e 24 horas em três diferentes proporções 1:1, 5:1, 10:1 do linfócito T CAR IL-18 GFP e da célula Raji CD19+. Média \pm desvio padrão, n=2. *P < 0,05 **P < 0,001 (ANOVA uma-
via seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

Este experimento apontou que as partículas lentivirais CAR IL-18 GFP produzidas, foram capazes de modificar os linfócitos T e também proporcionar atividade antitumoral específica para eliminar células CD19+. Zhu e colaboradores (2017) identificaram que a atividade citotóxica nas células CD19+ tem maior correlação com a presença de células T CAR CD8+ do que com células CD4+, da mesma forma, no presente estudo, por meio da marcação do receptor de superfície foi possível identificar que na cultura de células T-CAR IL-18 GFP 34% das células eram CD4+ e 66% eram CD8+. Estudos de citotoxicidade *in vitro* demonstraram a presença de duas vias citotóxicas dependentes de contato ativadas pelas células T CD8, a primeira foi a exocitose, na qual há liberação de grânulos contendo toxinas, perforina e granzimas promovendo a lise das células alvo, a segunda via estimula a produção de compostos da família do TNF induzindo a apoptose da célula alvo (ZARITSKAYA et al., 2010). Além disso, há indícios de que a atividade antitumoral das células T-CAR depende da quantidade de expressão de CD19 da célula alvo e a viabilidade das células efetoras não parece ser afetada durante cocultivo com a célula Raji (ZHANG et al.,2018).

A citocina interleucina-18 (IL-18) está presente no vetor lentiviral utilizado neste estudo. Esta citocina induz a secreção de IFN- γ , melhora a resposta Th1 e está envolvida na ativação de células NK e linfócitos T citotóxicos. Assim, a expressão de IL-18 pelas células T-CAR pode melhorar a persistência e atividade antitumoral destas células e ativar células do sistema imunológico endógeno. Estudos anteriores já realizaram testes com secreção de IL-18 e obtiveram resultados relevantes, como o aumento da persistência dos linfócitos T-CAR, indução de aplasia de células B a longo prazo e melhora na sobrevivência dos animais (AVANZI et al., 2016).

5.4. Caracterização cinética e metabólica das células HEK 293T adaptadas ao crescimento em suspensão em meios livres de SFB

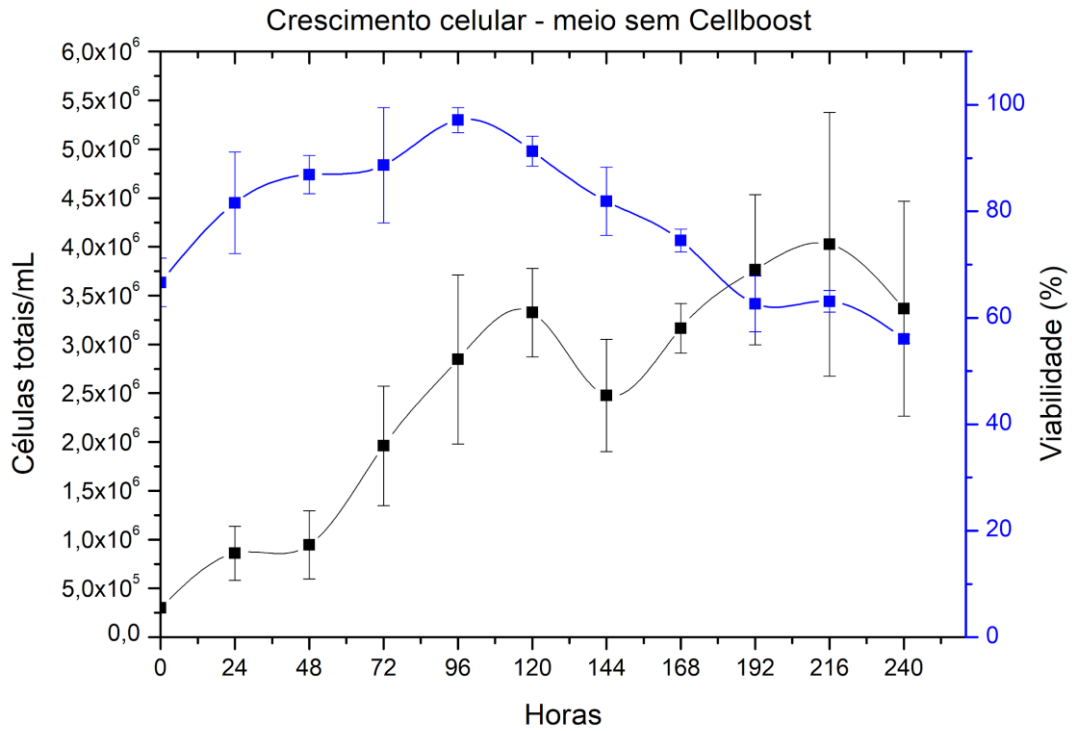
Antes de dar início à produção das partículas lentivirais em células HEK293T adaptadas ao cultivo em suspensão em meios livres de SFB, foi realizada uma caracterização cinética e metabólica das células. No processo de adaptação das células, realizado no projeto de Iniciação Científica FAPESP nº 2017/21737-2, as células HEK 293T foram adaptadas ao meio de cultura FreeStyle com suplementação de 10% de Cellboost- 5 (CN-F) (*HyClone*). A análise cinética e metabólica das células foi realizada neste trabalho na ausência e na presença deste suplemento. Nos cultivos sem suplementação, as células permaneceram 5 passagens nesta condição antes da realização do experimento. Esta análise objetivou avaliar a possibilidade de cultivo das células sem esta suplementação para reduzir os custos.

5.4.1. Cinética de crescimento celular e metabolismo das células HEK293T em meio FreeStyle sem Cellboost

A cultura atingiu a concentração máxima de células ($X_{m\acute{a}x}$) de 3×10^6 células viáveis/mL no dia 5 após o início do cultivo (120 horas) (Figura 16). A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), calculada na fase exponencial (48-96 horas) foi de $0,022 \text{ h}^{-1}$ e o tempo de duplicação foi de 31,06 horas. Outros estudos utilizando células HEK 293 cultivadas em suspensão em meios isentos de SFB obtiveram

valores de μ_{\max} na faixa de 0,018 - 0,037 (PETIOT et al., 2011; NADEAU et al., 2001; SIEGWART et al., 1999).

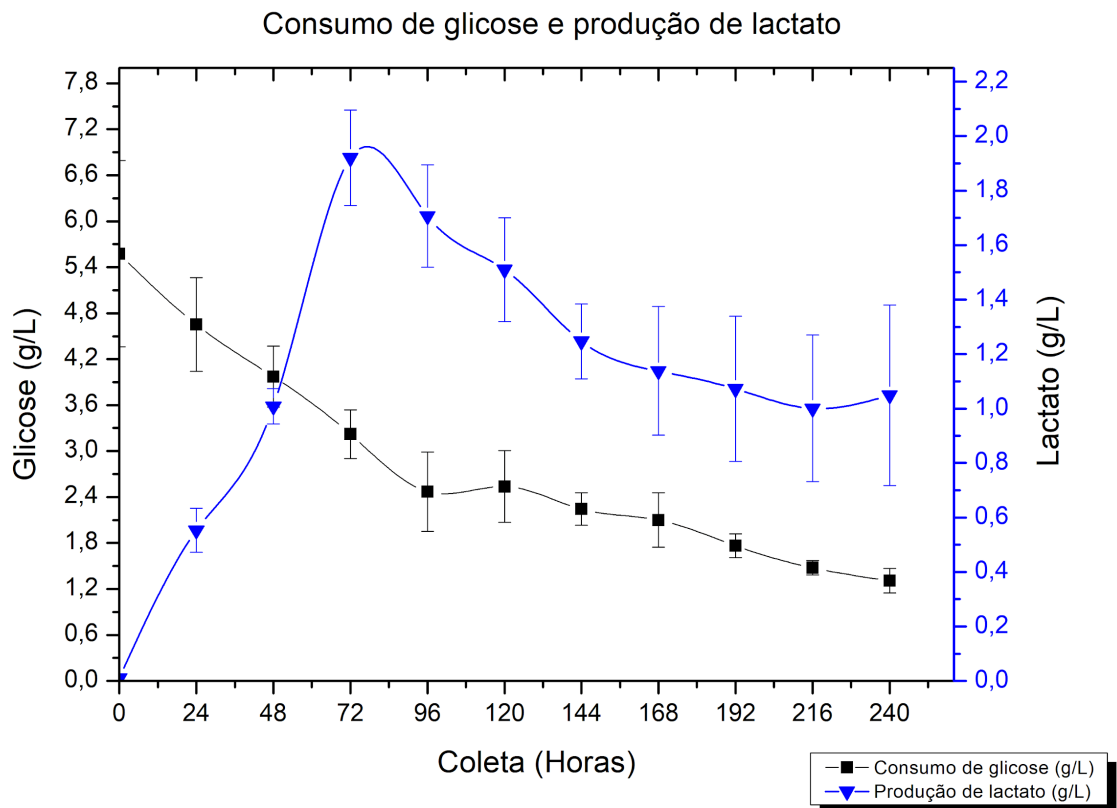
Figura 16: Cinética de crescimento da célula HEK293 T cultivada em suspensão em meio FreeStyle em frascos Erlenmeyer sob agitação de 150 rpm a 37°C (n=3).



Fonte: Dados do estudo.

O cultivo foi realizado em batelada portanto, com o passar do tempo de cultivo os substratos disponíveis para o crescimento e manutenção celular como glicose, foram consumidos e os metabólitos potencialmente tóxicos como lactato, foram produzidos (concentração aumentada), conforme observado na Figura 17.

Figura 17: Perfil de consumo de glicose e produção de lactato durante 10 dias de cultivo da célula HEK 293T em meio de cultura FreeStyle sem suplementação (n=3).



Fonte: Dados do estudo.

A glicose, após ser direcionada para o interior do citosol por difusão facilitada, é fosforilada e pode ser metabolizada por meio da glicólise e ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) ou pela via das pentoses-fosfato (COSTA, 2013). Enquanto a via das pentoses-fosfato está mais relacionada a obtenção de nucleotídeos, a glicólise e TCA estão envolvidos na geração de intermediários metabólicos e energia para crescimento e manutenção das células (ZHANG, 2009). As células em cultura geralmente possuem altas taxas de glicólise, excedendo muitas vezes o necessário, este fato aumenta também a produção de lactato, que em altas concentrações pode reduzir o pH do sistema exercendo efeitos inibitórios (COSTA, 2013; CRUZ et al., 2000). Após o fim da glicólise há formação de piruvato, neste processo pode ocorrer a regeneração do NAD⁺ resultando em lactato, ou este piruvato é direcionado para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, que possui a função de gerar diferentes compostos importantes para o anabolismo celular e geração de energia (ZHANG, 2009). A

disponibilidade de glicose no meio de cultivo pode influenciar nas taxas de direcionamento da glicose para o TCA (CRUZ et al., 2000). O fator de conversão de glicose em lactato ($Y_{lac/gli}$) ou rendimento, estabelece uma relação entre a quantidade de lactato que está sendo gerada a partir da glicose disponível no início da glicólise.

Com base na Figura 17 é possível observar que não houve exaustão total de glicose ao longo do cultivo. O fator de conversão glicose em lactato ($Y_{lac/gli}$) foi de 0,93 mol de lactato/mol de glicose, a taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) foi de 0,768 $\mu\text{g}/10^6$ células/h e a velocidade específica de produção de lactato (q_{lac}) foi de 1,87 $\mu\text{g}/10^6$ células/h. A literatura apresenta resultados do fator de conversão em células HEK293 adaptadas à suspensão sem SFB na faixa de 0,50-0,79 mol de lactato/mol de glicose (PETIOT et al., 2011; SIEGWART et al., 1999).

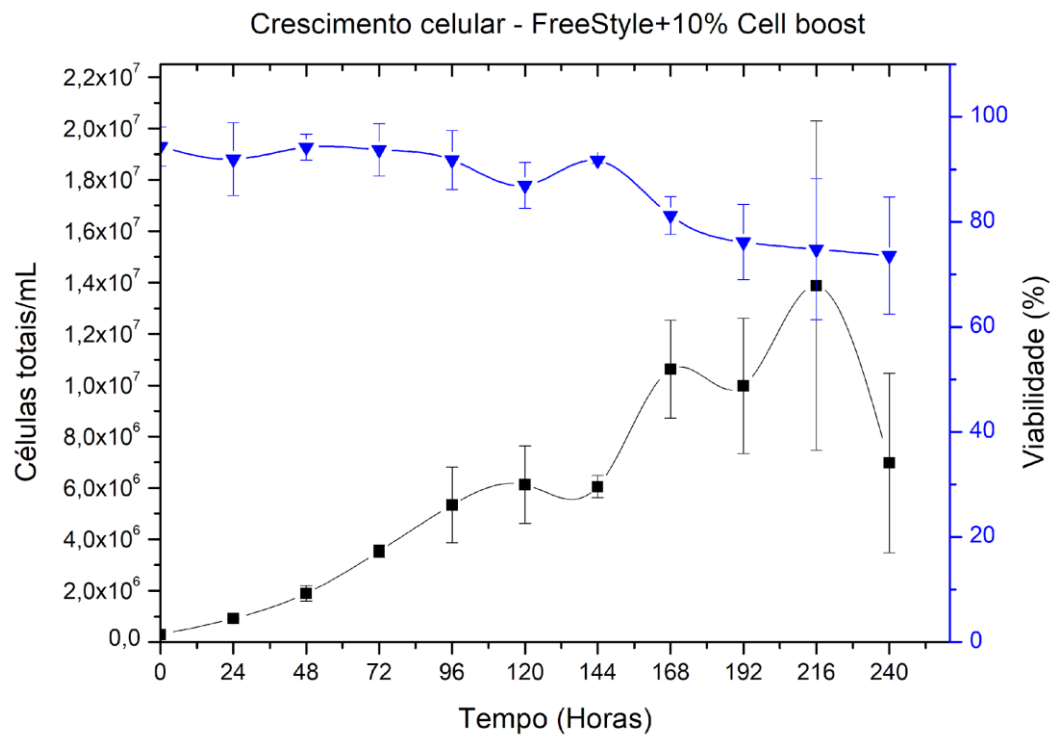
O acúmulo de lactato e o estresse físico da cultura geram necrose celular, e este fato é mais evidente em culturas em batelada (MERCILLE; MASSIE, 1994). Conforme observado na Figura 16, a viabilidade da cultura em 240 horas foi de aproximadamente 60%, condição também observada por Petiot e colaboradores (2011) no cultivo da célula HEK293SF após 8 dias em batelada (192 h). A partir de 120 horas de cultivo foi possível observar redução na viabilidade das células, quando observado o perfil da quantidade de glicose e lactato neste mesmo tempo (120h) percebe-se que houve consumo simultâneo de glicose e lactato. Este perfil de consumo dos dois componentes juntos foi relatado em outros trabalhos, também nos dias finais do cultivo (ALTAMIRO et al., 2004; KUWAE et al., 2005; LE et al., 2012; LISTE-CALLEJA et al., 2015). Em 72 horas de cultivo a concentração de lactato foi de 2 g/L, esta concentração é considerada inibitória e prejudicial ao crescimento das células e este fato pode explicar a perda de viabilidade. Considera-se uma concentração não inibitória de lactato 20mM (1,78 g/L) (CRUZ et al., 2000; PETIOT et al., 2011; BIAGGIO et al., 2015).

5.4.2. Cinética de crescimento celular e metabolismo das células HEK293T em meio FreeStyle suplementado com 10% de Cellboost

O cultivo com o meio suplementado atingiu a concentração máxima de células ($X_{m\acute{a}x}$) de $9,86 \times 10^6$ células viáveis/mL no dia 9 após o início do cultivo (216 horas)

(Figura 18), valor muito superior ao alcançado no cultivo sem a adição de Cellboost (3×10^6 células viáveis/mL). A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), calculada na fase exponencial (48-96 horas) foi de $0,0231 \text{ h}^{-1}$ e o tempo de duplicação foi de 29,28 horas, valores muito semelhantes ao experimento sem Cellboost.

Figura 18: Cinética de crescimento da célula HEK293 T cultivada em meio FreeStyle com 10% de Cellboost-5 em frascos Erlenmeyer sob agitação de 150 rpm a 37°C ($n=3$).

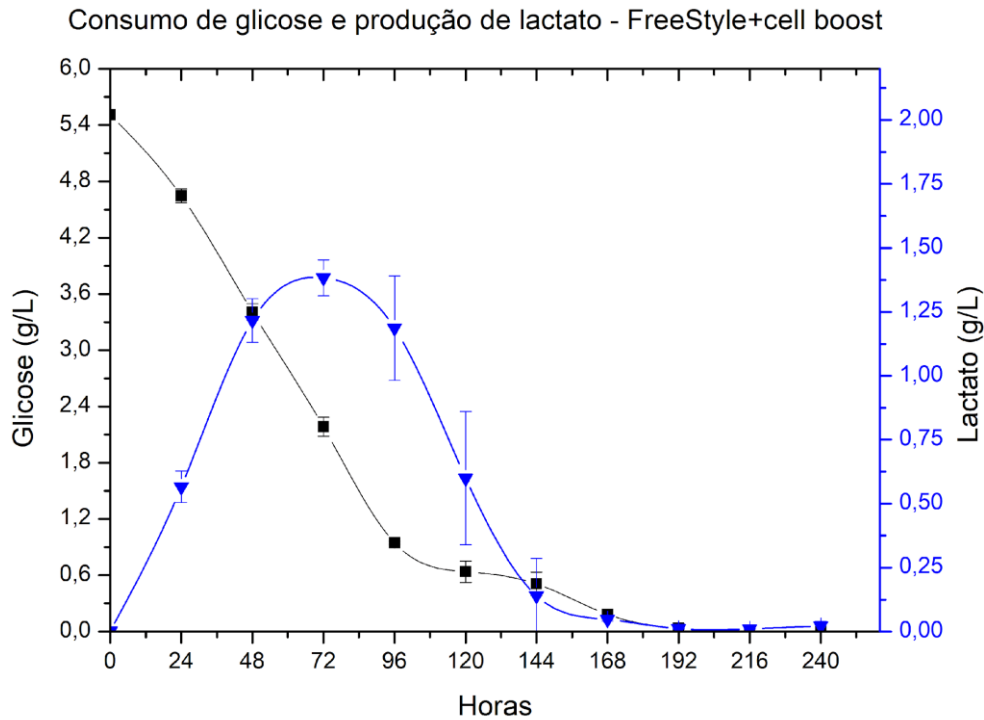


Fonte: Dados do estudo.

A Figura 19 mostra o perfil de consumo de glicose e produção de lactato no cultivo da célula HEK 293T com meio suplementado. Este perfil metabólico foi diferente do cultivo sem suplementação. O fator de conversão glicose em lactato ($Y_{\text{lac/gli}}$) foi de $0,022 \text{ mol de lactato/mol de glicose}$, a taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}) foi de $1,12 \mu\text{g}/10^6 \text{ células/h}$ e a velocidade específica de produção de lactato (q_{lac}) foi de $0,19 \mu\text{g}/10^6 \text{ células/h}$. O fator de conversão no cultivo sem Cellboost foi um pouco maior, assim como a taxa específica de consumo de glicose, porém a taxa de produção de lactato foi menor. Além disso, no cultivo com Cellboost houve exaustão de glicose atingindo valores muito próximos de zero e intenso consumo de

lactato, enquanto que no cultivo sem suplementação não foi possível observar o mesmo comportamento.

Figura 19: Perfil de consumo de glicose e produção de lactato durante 10 dias de cultivo da célula HEK 293T em meio de cultura FreeStyle com 10% de Cellboost (n=3).



Fonte: Dados do estudo.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos e metabólicos do cultivo da célula HEK 293T, adaptada a suspensão, em meio FreeStyle com e sem adição de Cellboost-5 sob agitação de 150 rpm à 37°C em frascos Erlenmeyer.

Cultivo	μ_{\max} (h ⁻¹)	X_{\max} (cel/mL)	t_d (horas)	$Y_{lac/gli}$	q_{gli} ($\mu\text{g}/10^6$ células/h)	q_{lac} ($\mu\text{g}/10^6$ células/h)
FreeStyle 293	0,022	$3,00 \times 10^6$	31,06	0,93	0,768	1,87
FreeStyle 293 + 10% Cellboost	0,023	$9,86 \times 10^6$	29,28	0,022	1,12	0,19

Fonte: Dados do estudo.

Em ambos os cultivos os valores do fator de conversão $Y_{lac/gli}$ foram inferiores a 2, que é o valor máximo para a conversão estequiométrica de glicose em lactato (COSTA,2013). A taxa específica de consumo de glicose (q_{gli}), por sua vez, representa a velocidade de consumo da glicose disponível no meio, desta forma foi possível observar que o cultivo com adição de Cellboost-5 as células consumiram a glicose mais rapidamente, o que pode ser explicado pelas altas concentrações celulares atingidas. A velocidade de produção de lactato (q_{lac}) não apresentou valores mais altos apesar do consumo de glicose mais rápido, como seria esperado (PASTERNAK et al.,1991; CRUZ et al.,2000), mostrando valor de q_{lac} maior na ausência do suplemento. Em razão da pequena quantidade de glicose disponível, o lactato foi utilizado como fonte de carbono pelas células e por isso foi consumido após o término da fase exponencial (ALTAMIRO et al., 2004; GAGNON et al., 2011; VALEÉ et al., 2014). O comportamento do lactato durante o cultivo apresentou um perfil também observado por outros autores em células CHO, onde existe maior produção de lactato durante a fase exponencial e na fase estacionária o lactato é consumido (ZAGARI et al., 2013). Este perfil de produção e consumo de lactato foi observado nos cultivos sem e com Cellboost, no entanto foi mais evidente neste último em razão das altas concentrações celulares.

Quando comparados os resultados do cultivo com e sem suplementação, nota-se velocidades específicas de crescimento (μ_{max}) muito semelhantes, porém, a adição de Cellboost-5 permitiu ao cultivo atingir densidades muito maiores e com melhor viabilidade celular, como é possível observar comparando as Figuras 17 e 19. Cabe ressaltar, no entanto, que o cultivo sem suplementação também apresentou um crescimento satisfatório, podendo o suplemento Cellboost-5 ser retirado do meio para então reduzir custos.

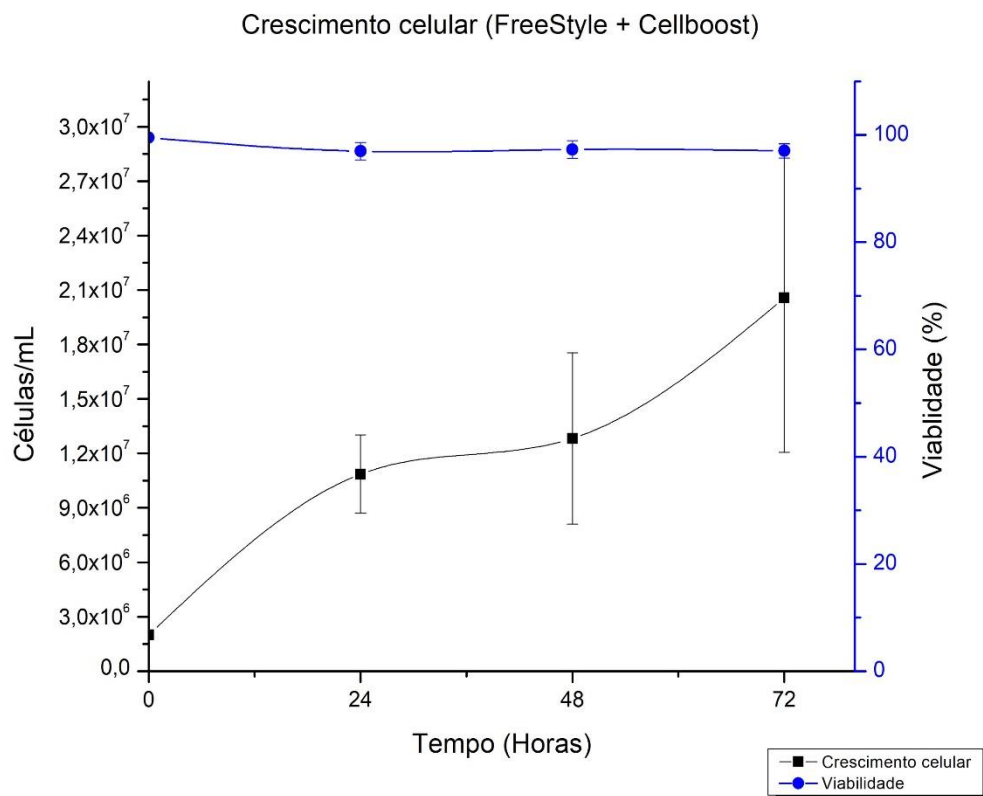
A célula possui dois principais mecanismos de obtenção de energia, o metabolismo da glicose e glutamina. Neste estudo o meio utilizado, *FreeStyle 293 expression (Gibco)*, possui em sua composição *Glutamax (Gibco)*, composto que minimiza o acúmulo de amônia tóxica, pois não se decompõe espontaneamente, clivando a ligação do dipeptídeo para liberar L-glutamina conforme necessário. Assim, o menor acúmulo de amônia melhora o crescimento celular, uma vez que altas concentrações de amônia e lactato estão relacionadas com a inibição do crescimento (CRUZ et al., 2000) e além disso, o composto é mais estável à temperatura ambiente.

5.5. Produção de partículas lentivirais em suspensão sem SFB

5.5.1. Meio de cultivo FreeStyle293 + 10% Cellboost-5

Durante a produção lentiviral com meio FreeStyle suplementado com 10% de Cellboost-5, a cultura atingiu a concentração máxima de 2×10^7 células/mL e manteve viabilidade próxima a 100%, o crescimento foi satisfatório e atingiu o esperado quando comparado com os estudos cinéticos (Figura 20). No entanto, a eficiência de transfecção avaliada após 48 horas não foi satisfatória, havendo expressão nula de GFP. Na análise de identificação da proteína p24 obteve-se uma média de 0,2 tanto em 48 quanto em 72 horas. Estes resultados sugerem que não houve produção de partículas lentivirais.

Figura 20: Crescimento celular após transfecção transiente em meio FreeStyle+10% Cellboost (Média \pm desvio padrão, n=3).

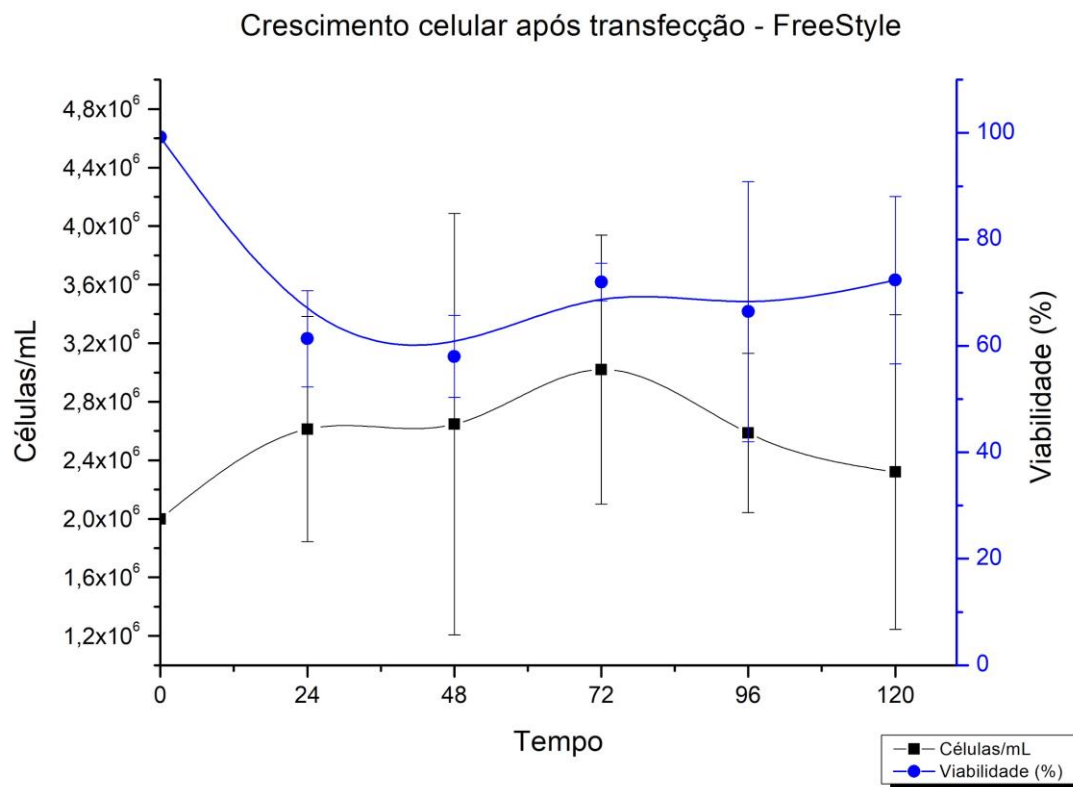


Fonte: Dados do estudo.

5.5.2. Meio de cultivo FreeStyle293

Para continuidade dos experimentos, estudos foram realizados para identificar o fator determinante que impediu a produção de partículas lentivirais. O mesmo protocolo de transfecção transiente foi utilizado, porém em meio FreeStyle sem qualquer tipo de suplementação. Como esperado, a concentração máxima de células foi inferior quando comparado ao cultivo com a presença de Cellboost. O cultivo foi avaliado por 120 horas após a transfecção, atingindo a concentração máxima, em 72 horas, de 3×10^6 células/mL (Figura 21), porém a viabilidade sofreu considerável redução durante a produção chegando a 70% com presença de debris celulares.

Figura 21: Crescimento celular após transfecção transiente em meio FreeStyle por 120 horas (Média \pm desvio padrão, n=3).



Fonte: Dados do estudo.

A redução da viabilidade e presença de debris celulares pode ter relação com a presença do reagente de transfecção polietilenoimina (PEI), o qual é essencial para a formação do complexo PEI-DNA conferindo carga positiva ao DNA que então entra na célula via endocitose e para a permeabilização da membrana endossomal promovendo a eficiência de transfecção. No entanto, este composto em forma livre no

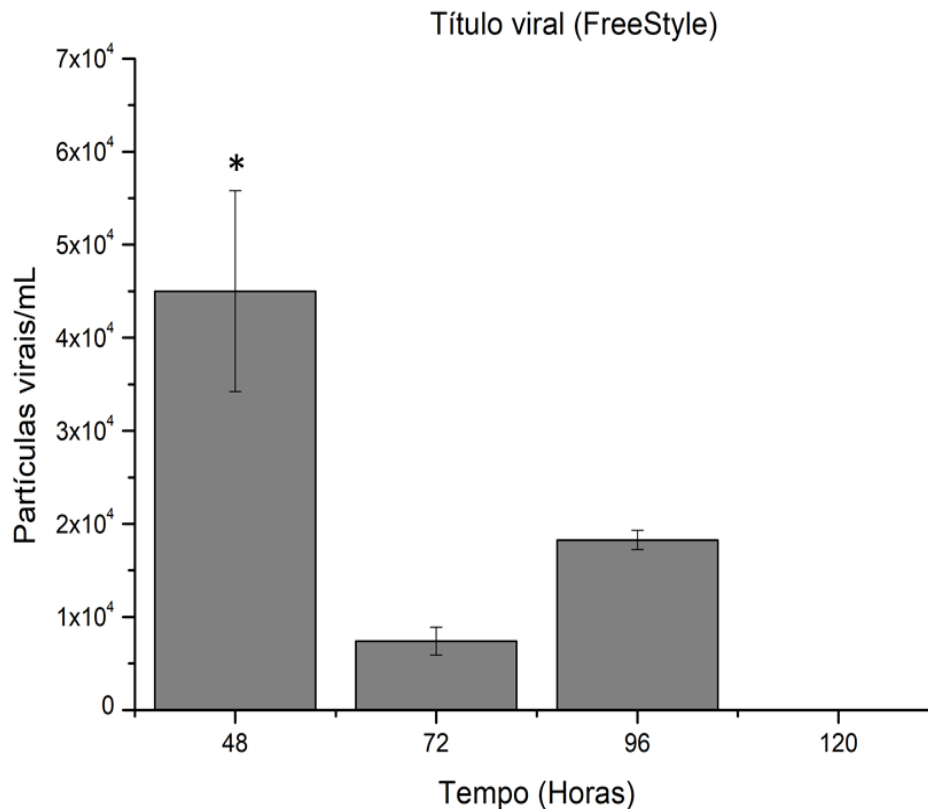
cultivo é citotóxico (CLAMME, AZOULAY E MÉLY, 2003). Essa toxicidade pode ser imediata, relacionada com a quantidade em sua forma livre, ou tardia, ligada a presença de PEI no núcleo celular, porém estes processos podem variar dependendo do tipo celular, grau de ramificação do reagente, concentração e tempo de incubação (GODBEY, WU E MIKOS, 1999; OKON, et al., 2014).

Outros fatores podem também ter influenciado na viabilidade da cultura, como por exemplo o próprio processo de produção das partículas lentivirais. A utilização dos mecanismos da célula hospedeira para produção da partícula viral pode causar inibição da síntese de RNA, DNA ou proteínas do próprio hospedeiro, podendo também modificar a morfologia, causando curvatura, inchaço ou murchamento, indução de apoptose e citotoxicidade do envelope viral (PARK et al., 2018). Ainda, o processo de brotamento realizado pelo gênero *Lentivirus* pode resultar na destruição da célula, portanto se houver uma alta produção de partículas virais, isto pode resultar em morte celular (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

Após 48 horas da transfecção transiente foi avaliada, por citometria de fluxo, a quantidade de células GFP positivas. A média de células que expressaram o gene repórter foi de $27,9 \pm 0,7\%$ após 48 horas. Dessa forma, concluiu-se que as células foram transfectadas e que o suplemento Cellboost-5 estava inibindo o processo de transfecção transiente.

O processo de titulação viral foi realizado utilizando as coletas de 48 a 120 horas. Em 120 horas não foi possível identificar células GFP positivas, logo só houve produção até 96 horas após a transfecção transiente. Utilizando a análise de variância (*ANOVA uma-via*) e teste *post-hoc* de Tukey constatou-se que a produção em 48 horas foi consideravelmente superior à produção de 72 horas e 96 horas, sendo que não houve diferença entre 72 e 96 horas (Figura 22).

Figura 22: Produção de partículas lentivirais/mL avaliadas por citometria de fluxo (Média \pm desvio padrão, n=3), * P < 0,05 (ANOVA uma-va seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

Diversos estudos reportam uma elevada produção de partículas lentivirais em culturas em suspensão em meios livres de SFB, conforme apresentado na Tabela 5. No estudo de Ansorge (2009), que utilizou células HEK293SF-3F6, reagente de transfecção PEI e adição de butirato de sódio (5 mM) foi obtido 1×10^8 TU/mL em um volume de 3L de cultivo. Manceur e colaboradores (2017) reportam a produção de 8×10^{10} TU/L ou 1×10^7 TU/mL em biorreator de 3L (MANCEUR et al., 2017). A produção de partículas virais nos estudos citados (TU/mL) mostrou-se superiores quando comparados com os resultados obtidos neste estudo. No entanto, estes estudos utilizam protocolos otimizados e muitas vezes produção em biorreatores, sob condições de cultivo mais controladas. Além disso, a maioria dos estudos apresentados na Tabela 5 foram realizados com vetores lentivirais que expressam somente o gene reporter GFP, que possuem geralmente tamanhos menores e são

utilizados para desenvolvimento de plataformas de produção, muitas vezes sem funcionalidade clínica. Outro fator que pode interferir no resultado final é a escolha do método de titulação viral. Porém, estes resultados demonstram que, com a correta adequação do protocolo, é possível obter elevados títulos. Ainda, é importante ressaltar que o vetor CAR anti-CD19 IL-18 GFP, utilizado no presente trabalho, apresentou funcionalidade na modificação de linfócitos T humanos e devido ao seu tamanho relativamente grande (12792 pb) é esperado que resulte em menores títulos.

Tabela 5: Produção de lentivírus em condições de cultivo em suspensão em meios livres de SFB.

Linhagem celular	Plataforma de produção	Título viral/mL	Referência
HEK293-6E	Biorreator de tanque agitado	$1,2 \times 10^6$	Suh et al., 2003
HEK293SF-3F6	Biorreator tanque agitado	8×10^7	Han et al., 2009
HEK293SF-3F6	Biorreator tanque agitado	1×10^8	Ansorge et al., 2009
HEK293T/17 adaptada	Erlenmeyer	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	Gélinas et al., 2017
HEK293SF	Erlenmeyer	$1,5 \times 10^7$	Lu et al., 2020
SJHEK293TS (estável por 4 meses)	Placas 10 cm	$8,2 \times 10^7 - 1 \times 10^8$	Bauler et al., 2020

Fonte: Elaborado pelo autor baseado em referências bibliográficas.

O processo de titulação viral por meio da transdução das células Jurkat avaliam a quantidade de partículas lentivirais funcionais, ou seja, capazes de modificar uma célula para que a mesma expresse o gene de interesse, no caso CAR anti-CD19 com GFP. Em paralelo, foi realizada a identificação da proteína viral p24 por ELISA, que está presente no envelope viral e, portanto, identifica a presença de partículas tanto funcionais, quanto não funcionais. Apesar deste método ter um caráter mais qualitativo, é possível realizar um comparativo entre as diferentes produções realizadas. Foi observado através da titulação viral que houve diferença na quantidade de partículas funcionais/mL nos diferentes tempos de coleta, onde 48 horas obteve melhor produção. Quando avaliada a presença de p24 nas amostras (Tabela 6), não houve diferença entre os tempos de coleta tanto na produção em cultivo aderente

quanto em suspensão, sugerindo que as partículas podem ter perdido funcionalidade ao longo do tempo.

Tabela 6: Identificação qualitativa por ELISA da proteína p24 do envelope viral das amostras coletadas no cultivo em monocamada com SFB e em suspensão na ausência de SFB.

Forma de cultivo	Coleta LV (horas)	Média p24 (S/CO)
Aderente	24	1172,50
	48	1876,58
	72	1875,57
Suspensão com Cellboost	24	0,16
	48	0,265
	72	0,18
Suspensão sem Cellboost	48	609,21
	72	553,13
	96	525,51

Fonte: Dados do estudo.

Como foi possível observar na Tabela 6, não houve quantidade relevante de proteína na produção em suspensão com Cellboost, conforme verificado anteriormente. Ainda, a presença de p24 nas amostras produzidas em cultivo em monocamada foi 3 vezes superior quando comparada com as amostras da produção do cultivo em suspensão. Já a concentração de partículas lentivirais produzidas em cultivo em monocamada foi de 600 - 2000 vezes maior quando comparada com a concentração em suspensão.

Como demonstrado pelos resultados apresentados, a produção de lentivírus em suspensão foi inferior à produção em monocamada. Durante a transfecção alguns fatores são considerados relevantes tanto para a eficiência de transfecção quanto para a produção de partículas lentivirais. Alguns estudos reportam que a eficiência de transfecção pode variar de acordo com a linhagem celular utilizada assim como com o sistema e condições de cultivo e transfecção (GUTIÉRREZ-GRANDOS et al., 2016;

THOMPSON et al., 2012). Assim, a próxima etapa do trabalho envolveu a otimização da produção de partículas lentivirais em suspensão por meio de um delineamento experimental considerando as variáveis mais citadas na literatura como influenciadoras no processo.

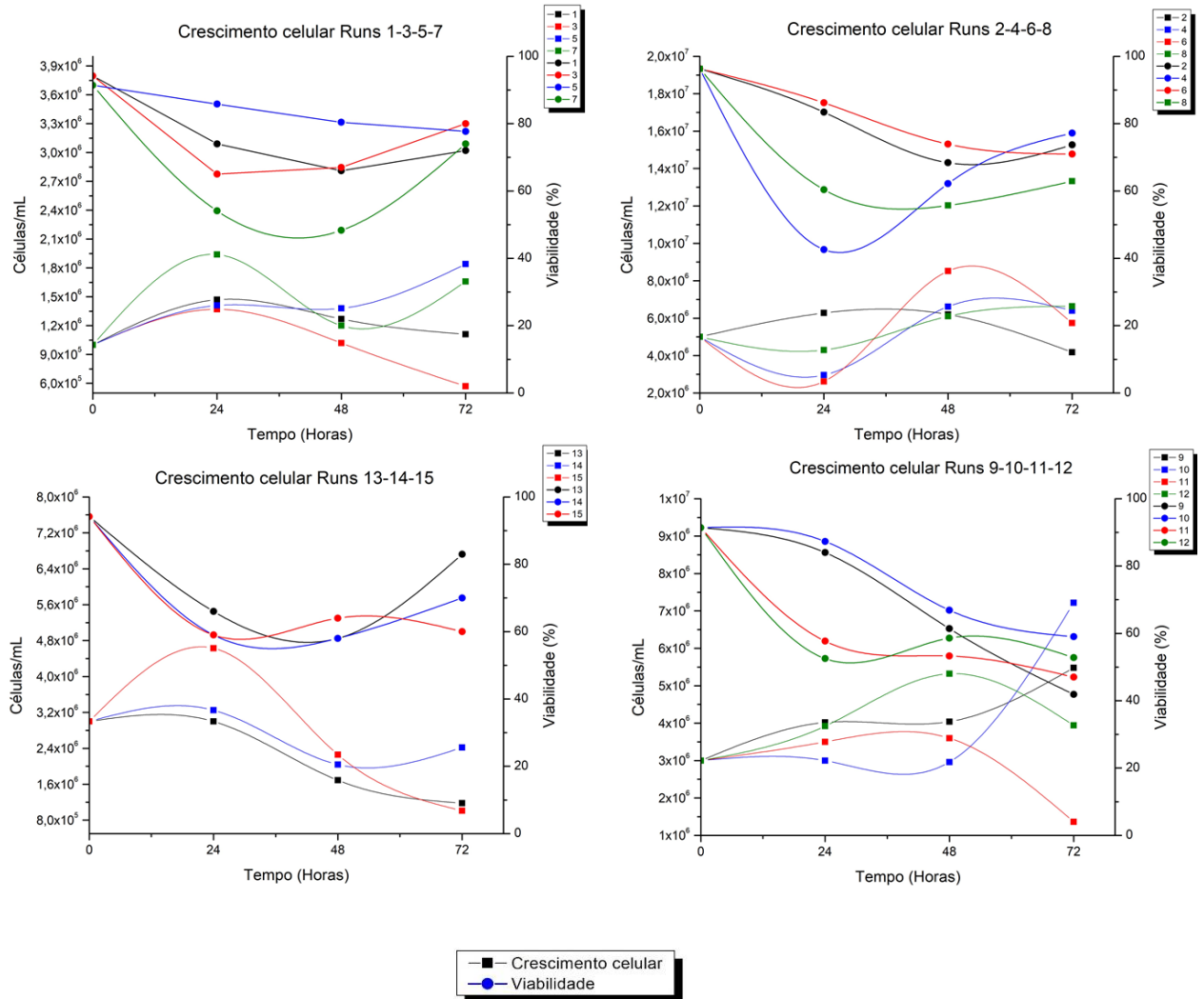
5.6. Otimização da produção de partículas lentivirais em suspensão por delineamento experimental

Para a otimização do protocolo de transfecção transiente em suspensão por meio de um delineamento experimental, foram consideradas as variáveis concentração celular no dia da transfecção, proporção PEI:DNA e quantidade de DNA por 10^6 células (BOLLIN; DECHAVANNE; CHEVALET, 2011) em dois diferentes meios de cultivo, FreeStyle 293 Expression e HyClone SFM4Transfx-293, ambos compatíveis com o procedimento de transfecção transiente e com o cultivo da linhagem HEK293.

5.6.1. Meio de cultivo: FreeStyle 293

Um total de 15 corridas foram realizadas no delineamento experimental por Box-Behnken para avaliar a melhor de combinação de variáveis e conseqüentemente o protocolo de transfecção transiente mais eficiente. O crescimento celular e viabilidade foram avaliados até 72 horas após a transfecção (Figura 23). De maneira semelhante ao observado anteriormente, nestes experimentos não houve crescimento celular significativo e a viabilidade da cultura também sofreu redução após a transfecção em suspensão em meio FreeStyle.

Figura 23: Crescimento e viabilidade celular durante 72 horas após a transfecção no delineamento Box-Behnken em meio FreeStyle.



Fonte: Dados do estudo.

Duas variáveis resposta foram consideradas no delineamento experimental, eficiência de transfecção e produção de partículas lentivirais (título viral; partículas/mL), sendo analisados em 48 e 72 horas pós transfecção (Tabela 7). Para o delineamento Box-Behnken (3/1/15), três níveis foram considerados para cada um dos parâmetros, mínimo (-1), médio (0) e máximo (+1); os resultados obtidos estão expressos nas Tabela 8 e 9. O intervalo de cada parâmetro (concentração celular, PEI:DNA e quantidade de DNA) foi determinado baseado em resultados positivos para produção de partículas lentivirais descritos na literatura (GUTIÉRREZ-GRANDOS et

al., 2016; THOMPSON et al., 2012; CERVERA et al., 2015; SEGURA et al., 2007; ANSORGE et al., 2009; TOM et al., 2008).

Tabela 7: Eficiência de transfecção e produção de partículas lentivirais em 48 e 72 horas nos 15 experimentos realizados.

Ensaio	Eficiência transfecção (% GFP)		Partículas lentivirais/mL	
	48 horas	72 horas	48 horas	72 horas
1	40,3	53,2	7,00E+03	3,20E+03
2	34	41,5	5,34E+04	2,94E+04
3	15,5	30,8	0,00E+00	0,00E+00
4	22,3	36,8	3,48E+04	2,34E+04
5	55,6	65,1	1,01E+05	2,34E+04
6	34,7	31,7	4,08E+04	1,62E+04
7	29,2	49,3	5,40E+04	1,86E+04
8	19,3	30,4	3,66E+04	2,94E+04
9	27,6	29,5	5,46E+04	3,60E+04
10	36,9	37,9	5,22E+04	3,30E+04
11	21,8	29,3	2,52E+04	1,86E+04
12	17,6	27,2	9,00E+03	1,12E+04
13	25,9	39,2	3,00E+04	6,60E+03
14	25,7	35,2	8,00E+03	4,80E+03
15	21,9	32,2	1,36E+04	8,80E+03

Fonte: Dados do estudo.

As análises foram realizadas através do modelo do erro puro considerando as interações lineares e $\alpha=0,10$, ou seja, nível de significância de 10% devido à variação inerente a processos biológicos utilizando células procarióticas e eucarióticas (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Desse modo foram considerados significativos os valores de p menores que 0,10. Os coeficientes de regressão gerados pelo software

Statística 7 para cada variável resposta estão apresentados nas Tabelas 8 para o tempo de 48 horas e Tabela 9 para o tempo de 72 horas.

Tabela 8: Coeficientes de regressão da coleta de 48 horas após a transfecção transiente obtidos através da análise Box-Behnken no delineamento experimental avaliados no software Statística 7. *Variável significativa.

Grupo	Variável	Coeficiente	Erro padrão	t (2)	Valor de p	Estimativas por intervalo (90%)	
						Limite inferior	Limite superior
Eficiência de transfecção (EF)	*Média	24,5	1,30	18,82	0,002	20,70	28,29
	*C	-3,78	0,79	-4,75	0,04	-6,11	-1,46
	*PEI	-3,92	0,79	-4,92	0,03	-6,25	-1,59
	*DNA	-8,36	0,79	-10,49	0,008	-10,68	-6,03
	*C ²	6,12	1,17	5,22	0,03	2,70	9,55
	PEI ²	-2,60	1,17	-2,21	0,15	-6,02	0,82
	*DNA ²	4,07	1,17	3,47	0,07	0,65	7,50
	C x PEI	3,27	1,12	2,90	0,10	-0,01	6,56
	C x DNA	2,75	1,12	2,44	0,13	-0,54	6,04
	*PEI x DNA	-3,37	1,12	-2,99	0,09	-6,66	-0,08
Partículas lentivirais/ml (TU)	Média	17200	6601,01	2,60	0,12	-2074,9	36474,85
	C	450	4042,27	0,11	0,92	-11353,4	12253,39
	PEI	-5525	4042,27	-1,36	0,30	-17328,4	6278,39
	*DNA	-15475	4042,27	-3,82	0,06	-27278,4	-3671,61
	C ²	14725	5950,07	2,47	0,13	-2649,1	32099,12
	PEI ²	-8125	5950,07	-1,36	0,30	-25499,1	9249,12
	*DNA ²	26175	5950,07	4,39	0,04	8800,9	43549,12
	C x PEI	-2900	5716,64	-0,50	0,66	-19592,5	13792,51
	C x DNA	10700	5716,64	1,87	0,20	-5992,5	27392,51
	PEI x DNA	-3450	5716,64	-0,60	0,60	-20142,5	13242,51

Considerando: EF (Eficiência de transfecção, % GFP), TU (partículas lentivirais/mL), C (concentração celular, células/mL), PEI (proporção PEI:DNA) e DNA (quantidade de DNA total, µg/ 10⁶ células).

Fonte: Dados do estudo.

Tabela 9: Coeficientes de regressão da coleta de 72 horas após a transfecção transiente obtidos através da análise Box-Behnken por planejamento experimental avaliados no software Statistica 7.
*Variável significativa.

Grupo	Variável	Coeficiente	Erro padrão	t (2)	Valor de p	Estimativas por intervalo (90%)	
						Limite inferior	Limite superior
Eficiência de transfecção (EF)	*Média	35,53	2,02	17,52	0,003	29,61	41,45
	*C	-7,25	1,24	-5,83	0,02	-10,87	-3,62
	PEI	-2,60	1,24	-2,09	0,17	-6,22	1,02
	DNA	-3,50	1,24	-2,81	0,10	-7,12	0,12
	*C ²	9,09	1,82	4,97	0,03	3,75	14,43
	PEI ²	-4,05	1,82	-2,21	0,15	-9,39	1,28
	DNA ²	-0,50	1,82	-0,27	0,80	-5,84	4,83
	C x PEI	4,42	1,75	2,52	0,12	-0,70	9,55
	C x DNA	3,62	1,75	2,06	0,17	-1,50	8,75
PEI x DNA	-2,62	1,75	-1,49	0,27	-7,75	2,50	
Partículas lentivirais/ml (TU)	*Média	6733,33	1156,62	5,82	0,02	3356,01	10110,66
	*C	6650	708,28	9,38	0,01	4581,82	8718,18
	*PEI	-2450	708,28	-3,45	0,07	-4518,18	-381,82
	*DNA	-3850	708,28	-5,43	0,03	-5918,18	-1781,82
	C ²	2233	1042,56	2,14	0,16	-810,95	5277,61
	*PEI ²	5033,33	1042,56	4,82	0,04	1989,05	8077,61
	*DNA ²	12933	1042,56	12,40	0,006	9889,05	15977,51
	C x PEI	-700	1001,66	-0,69	0,55	-3624,85	2224,85
	*C x DNA	4500	1001,66	4,49	0,04	1575,15	7424,85
	PEI x DNA	-1100	1001,66	-1,09	0,38	-4024,85	1824,85

Considerando: EF (Eficiência de transfecção, % GFP), TU (partículas lentivirais/mL), C (concentração celular, células/mL), PEI (proporção PEI:DNA) e DNA (quantidade de DNA total, µg/ 10⁶ células).

Fonte: Dados do estudo.

A eficiência de transfecção e a produção de partículas lentivirais/mL em 48 e 72 horas, mensuradas por fluorescência (GFP), foram expressas por meio de equações polinomiais de segundo grau (Eq. 4, 5, 6 e 7) considerando as variáveis significativas ($p < 0,10$):

$$EF (48H) = 24,5 - 3,78.C + 6,12.C^2 - 3,92.PEI - 8,36.DNA + 4,07.DNA^2 - 3,37.PEI.DNA \quad (\text{Eq. 4})$$

$$R^2 = 0,74$$

$$TU (48H) = -15475.DNA + 26175.DNA^2 \quad (\text{Eq. 5})$$

$$R^2 = 0,64$$

$$EF (72H) = 35,53 - 7,25.C + 9,09.C^2 \quad (\text{Eq. 6})$$

$$R^2 = 0,71$$

$$TU (72H) = 6733,33 + 6650.C - 2450.PEI + 5033,33.PEI^2 - 3850.DNA + 12933,33.DNA^2 + 4500.C.DNA \quad (\text{Eq. 7})$$

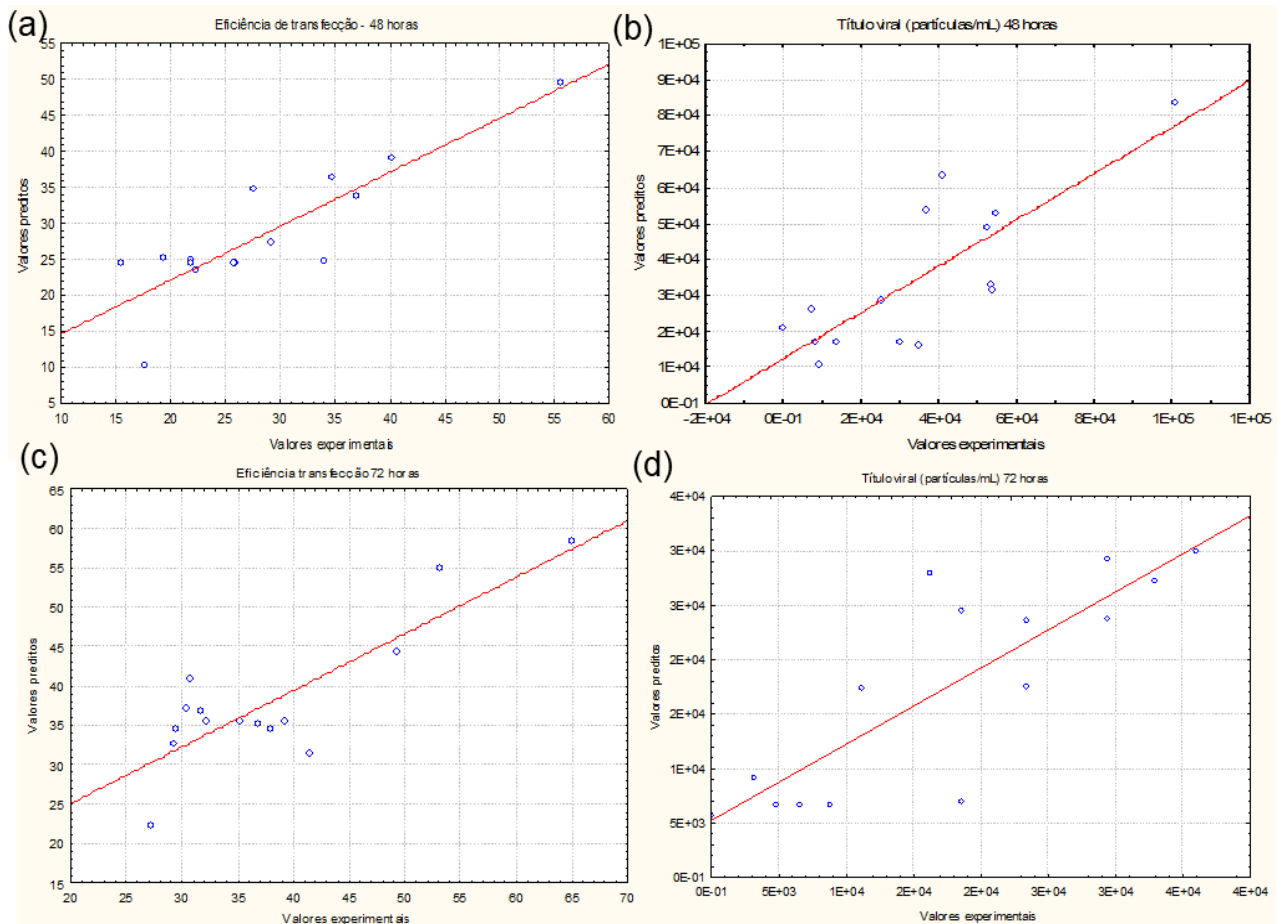
$$R^2 = 0,69$$

Em sistemas biológicos os erros experimentais são inerentes ao processo e considerados relativamente altos, pois dependem de vários fatores como a metodologia utilizada, manipulação das células, variação de nutrientes, tipo de sistema de cultivo, dentre outros. A porcentagem do erro relacionado com a concentração de células e viabilidade pode variar de 10 – 30%, já as medidas de concentração de substrato como glicose, lactato, aminoácidos pode variar de 2 – 5%. Além disso, o erro experimental em processos em batelada, são geralmente maiores quando comparados aos processos contínuos em razão da variação das condições da cultura em todo o processo (AUGUSTO; BARRAL; PICCOLI, 2008). Desta forma, os coeficientes de determinação (R^2) obtidos neste estudo podem ser considerados relativamente bons considerando a alta variação intrínseca aos bioprocessos em batelada.

Por meio da geração do gráfico de valores experimentais *versus* valores preditos obtido pelo software, é possível realizar uma análise referente ao quão

próximo estão os valores experimentais (pontos) dos preditos (reta) e desta forma avaliar uma maior ou menor capacidade de predição do modelo. Quanto mais próximos os pontos estão da reta, maior a predição (Figura 24).

Figura 24: Valores experimentais versus valores preditos para as variáveis respostas (a) eficiência de transfecção 48 horas, (b) partículas lentivirais 48 horas, (c) eficiência de transfecção 72 horas e (d) partículas lentivirais 72 horas.



Fonte: Dados do estudo.

Os valores experimentais das duas variáveis resposta (EF e TU), nos dois tempos de coleta realizados (48 e 72 horas), apesar de apresentarem variação, se aproximaram de forma razoável aos valores preditos demonstrando que o modelo ajustado foi satisfatório para avaliar as variáveis estudadas. Para comparação das médias e avaliação da significância e predição do modelo ajustado foi realizada análise de variância (ANOVA) conforme a Tabela 10 (a) e (b).

Tabela 10: Análise de variância para as variáveis respostas, eficiência de transfecção e partículas lentivirais nos dois tempos avaliados, 48 horas (a) e 72 horas (b).

(a) 48 horas

Fontes de variação	SQ		GL		QM		F _{calc}		F _{tab}	
	EF	TU	EF	TU	EF	TU	EF	TU	EF	TU
Regressão	1071,14	4,38E+09	6	1	178,52	4,39E+09	3,12	10,62	2,67	3,14
Resíduos	456,95	5,37E+09	8	13	57,11	4,13E+08				
Falta de ajuste	446,79	5,11E+09	6	11	74,46	4,65E+08	14,65	3,55	9,33	9,40
Erro puro	10,16	2,61E+08	2	2	5,08	1,31E+08				
Total	1528,09	9,76E+09	14	14	109,14	6,97E+08				

(b) 72 horas

Fontes de variação	SQ		GL		QM		F _{calc}		F _{tab}	
	EF	TU	EF	TU	EF	TU	EF	TU	EF	TU
Regressão	751,89	1,27E+09	2	6	375,94	2,13E+08	5,55	3,03	2,81	2,67
Resíduos	811,70	5,62E+08	12	8	67,64	7,02E+07				
Falta de ajuste	787,04	5,54E+08	10	6	78,70	9,23E+07	6,38	23,02	9,39	9,33
Erro puro	24,66	8,02E+06	2	2	12,33	4,01E+06				
Total	1563,59	1,84E+09	14	14	111,68	1,31E+08				

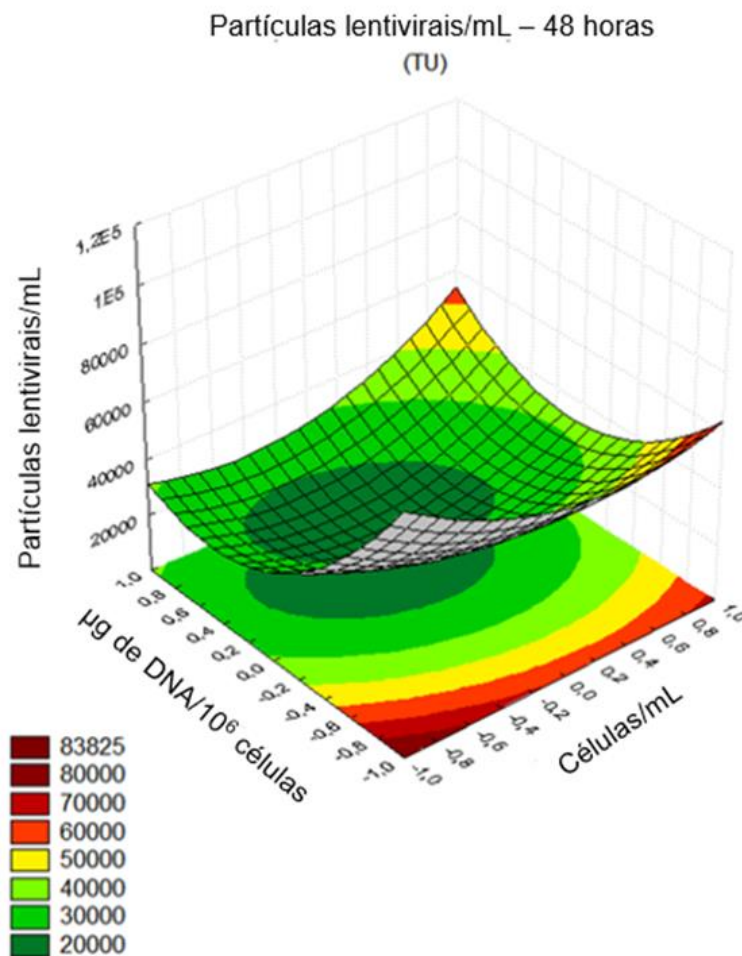
SQ= Soma dos Quadrados; GL=Graus de Liberdade; QM =Quadrado Médio, F_{calc}= F calculado; F_{tab}= F tabelado.

Fonte: Dados do estudo.

A comparação entre o valor de F calculado e F tabelado obtido através da Distribuição F de Snedecor (10%) demonstra a significância e predição do modelo ajustado. O modelo matemático para cada resposta é avaliado como significativo quando o $F_{calc} > F_{tab}$ para regressão e considerado preditivo quando $F_{calc} < F_{tab}$ para falta de ajuste. Assim, EF 48 horas foi significativo e não preditivo, TU 48 horas foi significativo e preditivo, EF 72 horas foi significativo e preditivo e TU 72 horas foi significativo e não preditivo. As respostas que obtiveram característica preditiva são capazes de gerar uma superfície de resposta gráfica, de modo que se possa predizer de maneira confiável a melhor combinação entre os parâmetros significativos do modelo. Dada a variabilidade intrínseca dos processos biológicos, não foi possível obter um padrão de predição, uma vez que houve modelo preditivo tanto para

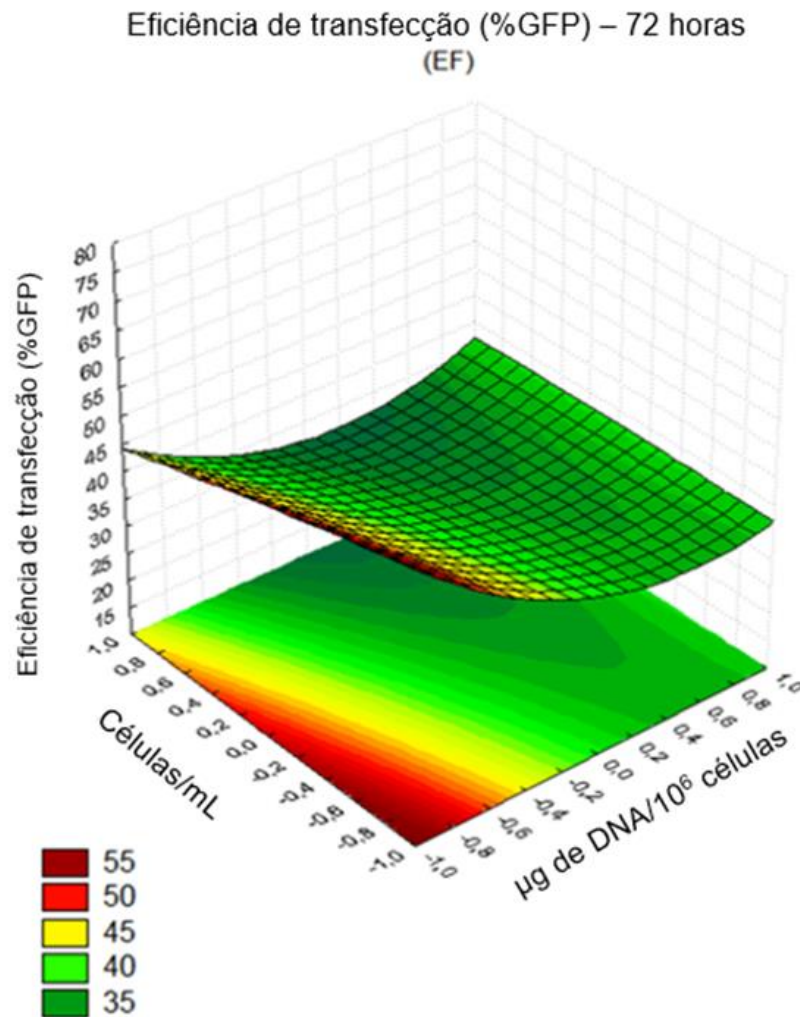
eficiência de transfecção quanto para produção de partículas lentivirais/mL. Entretanto, observando os resultados é possível inferir que a concentração de células parece influenciar mais na eficiência de transfecção, enquanto que a quantidade de DNA utilizado parece refletir mais na produção de partículas virais. Apenas os modelos determinados preditivos pelo modelo matemático podem gerar uma superfície de resposta precisa. As superfícies de resposta dos grupos TU 48 horas e EF 72 horas estão demonstradas nas Figuras 25 e 26 respectivamente.

Figura 25: Superfície de resposta para a resposta TU 48 horas em função da quantidade de DNA em μg por 10^6 células e concentração celular em células/mL.



Fonte: Dados do estudo.

Figura 26: Superfície de resposta para a resposta EF 72 horas em função da quantidade de DNA em μg por 10^6 células e concentração celular em células/mL.



Fonte: Dados do estudo.

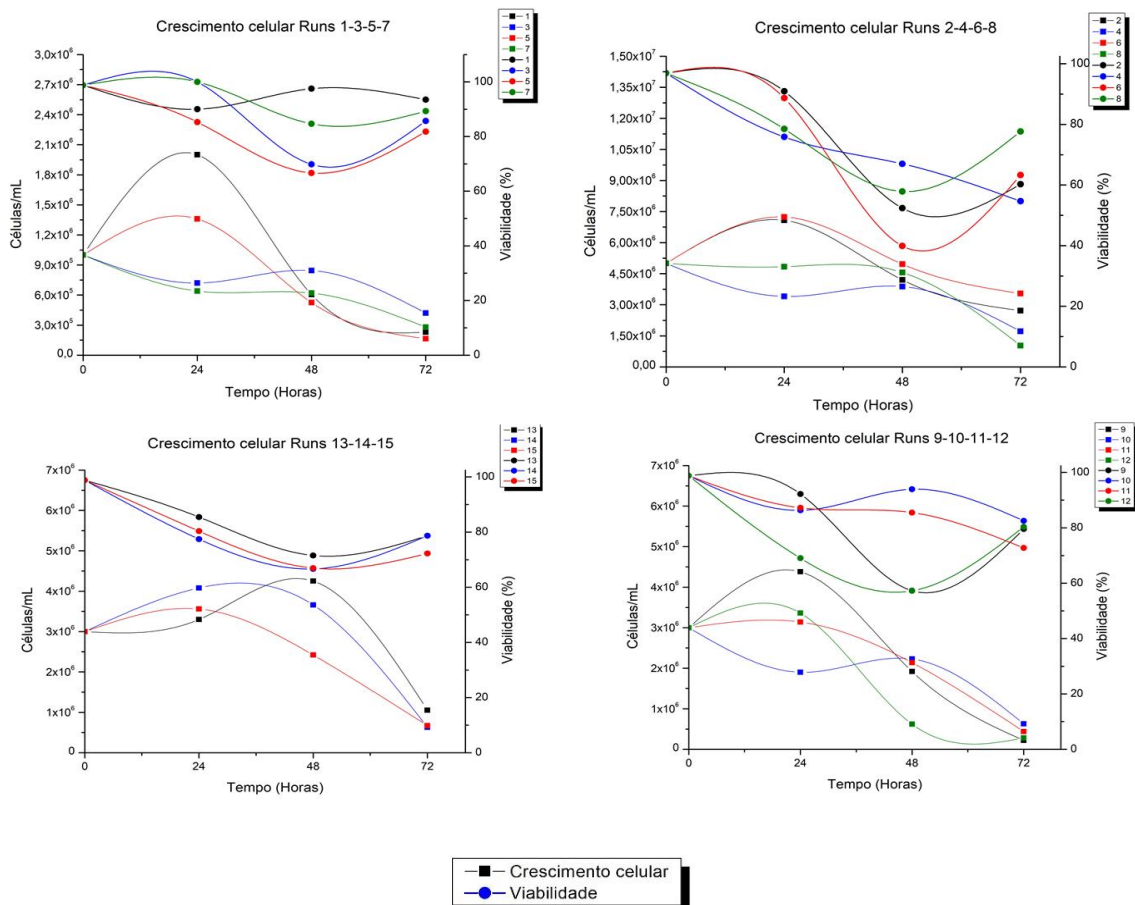
A superfície de resposta da Figura 25 mostra que somente a quantidade de DNA/ 10^6 células foi um fator determinante na obtenção de melhor título viral (partículas/mL). Foi possível observar que independente da concentração celular utilizada seria possível, de acordo com o modelo matemático, obter um título viral semelhante. De acordo com a superfície de resposta e as análises estatísticas a melhor quantidade de DNA considerada foi no nível -1, ou seja, 1 μg de DNA/ 10^6 células. Já na Figura 26, o fator com maior influência na obtenção de melhor eficiência de transfecção (% células GFP positivas) foi a concentração celular, mostrando que uma menor concentração celular (nível -1) proporcionou maior quantidade de células que expressaram GFP. Somando estes resultados obteve-se que a melhor

combinação de parâmetros seria $1 \mu\text{g}$ de DNA/ 10^6 células e 1×10^6 células/mL. Como a proporção de PEI:DNA no intervalo utilizado não teve influência, observando a Tabela 8 e combinando os dois parâmetros otimizados com melhores resultados obteve-se que o ensaio 5 (R5) foi considerado a melhor combinação, na qual a proporção PEI:DNA foi de 2,5:1.

5.6.2. Meio de cultivo: HyClone SFM4Transfx-293

A célula HEK293T adaptada ao cultivo em suspensão sem soro foi cultivada durante 3 passagens em meio SFM4Transfx-293 para posterior realização dos experimentos. O crescimento celular e viabilidade foram avaliados até 72 horas após a transfecção (Figura 27). Como esperado, a viabilidade das culturas também sofreu redução durante o processo, porém com este meio de cultivo, diferente do FreeStyle, foi possível observar presença de debris, aglomerações celulares e formação de halos nos fracos de cultivo.

Figura 27: Crescimento (células/mL) e viabilidade celular durante 72 horas após a transfecção no planejamento Box-Behnken em meio HyClone SFM4Transfx-293.



Fonte: Dados do estudo.

A Tabela 11 mostra as respostas obtidas em cada corrida para eficiência de transfecção e quantidade de partículas lentivirais/mL em 48 e 72 horas.

Tabela 11: Eficiência de transfecção e quantidade de partículas lentivirais/mL em 48 e 72 horas nos 15 experimentos.

Ensaio	Eficiência transfecção (% GFP)		Partículas/mL	
	48 horas	72 horas	48 horas	72 horas
1	6,5	26,5	6,60E+03	2,60E+03
2	1,5	4,7	6,40E+03	4,00E+02
3	8,2	28,9	8,20E+03	3,40E+03
4	3,1	6,9	1,18E+04	6,00E+02
5	2,0	4,1	8,00E+02	1,00E+03
6	0,9	2,0	2,80E+03	2,00E+02
7	1,7	27,5	6,00E+03	3,80E+03
8	0,7	4,7	7,80E+03	8,00E+02
9	20,7	27,3	5,34E+04	1,48E+04
10	14,2	25,0	4,44E+04	1,18E+04
11	8,8	18,6	3,82E+04	9,60E+03
12	3,9	9,4	3,40E+03	6,00E+02
13	6,6	15,7	5,82E+04	8,40E+03
14	10,4	23,7	2,74E+04	6,40E+03
15	11,0	17,5	3,62E+04	5,60E+03

Fonte: Dados do estudo.

As Tabelas 12 e 13 mostram os coeficientes de regressão obtidos através do software Statistica 7 em cada corrida para eficiência de transfecção e quantidade de partículas lentivirais/mL em 48 e 72 horas.

Tabela 12: Coeficientes de regressão de 48 horas obtidos através da análise Box-Behnken por planejamento experimental avaliados no software Statistica 7. *Variável significativa.

Grupo	Variável	Coeficiente	Erro padrão	t (2)	Valor de p	Estimativas por intervalo (90%)	
						Limite inferior	Limite superior
Eficiência de transfecção	*Média	9,33	1,37	6,77	0,02	5,31	13,35
	*C	-2,65	0,84	-3,14	0,08	-5,11	-0,18
	PEI	-1,01	0,84	-1,20	0,35	-3,47	1,45
	DNA	-1,71	0,84	-2,02	0,17	-4,17	0,75
	*C ²	-6,41	1,24	-5,16	0,03	-10,04	-2,79
	PEI ²	1,90	1,24	1,53	0,26	-1,71	5,53
	DNA ²	0,65	1,24	0,53	0,64	-2,96	4,28
	C x PEI	-0,02	1,19	-0,02	0,98	-3,50	3,45
	C x DNA	-2,22	1,19	-1,86	0,20	-5,70	1,25
	PEI x DNA	0,40	1,19	0,33	0,76	-3,08	3,88
Partículas lentivirais	*Média	40600	9159,33	4,43	0,04	13854,9	67345,11
	C	900	5608,92	0,16	0,88	-15478	17277,97
	PEI	-4600	5608,92	-0,82	0,49	-20978	11777,97
	DNA	-5750	5608,92	-1,02	0,41	-22128	10627,97
	*C ²	-31425	8256,10	-3,80	0,06	-55532,7	-7317,28
	PEI ²	-925	8256,10	-0,11	0,92	-25032,7	23182,72
	DNA ²	-4825	8256,10	-0,58	0,61	-28932,7	19282,72
	C x PEI	950	7932,21	0,11	0,91	-22211,9	24111,95
	C x DNA	-50	7932,21	-0,006	0,99	-23211,9	23111,95
	PEI x DNA	-6450	7932,21	-0,81	0,50	-29611,9	16711,95

Fonte: Dados do estudo.

Tabela 13: Coeficientes de regressão de 72 horas obtidos através da análise Box-Behnken por planejamento experimental avaliados no software Statistica 7. *Variável significativa.

Grupo	Variável	Coeficiente	Erro padrão	t (2)	Valor de p	Estimativas por intervalo (90%)	
						Limite inferior	Limite superior
Eficiência de transfecção	*Média	18,96	2,42	7,82	0,01	11,89	26,04
	*C	-8,58	1,48	-5,78	0,02	-12,92	-4,25
	PEI	-0,86	1,48	-0,58	0,61	-5,19	3,47
	DNA	0,22	1,48	0,15	0,89	-4,10	4,55
	C ²	-6,35	2,18	-2,91	0,10	-12,73	0,01
	PEI ²	4,14	2,18	1,89	0,19	-2,23	10,51
	DNA ²	-3,03	2,18	-1,38	0,29	-9,41	3,34
	C x PEI	-0,05	2,09	-0,02	0,98	-6,17	6,07
	C x DNA	-5,17	2,09	-2,46	0,13	-11,30	0,95
	PEI x DNA	-1,72	2,09	-0,82	0,49	-7,85	4,40
Partículas lentivirais	*Média	6800	832,66	8,16	0,01	4368,63	9231,37
	C	-1100	509,90	-2,15	0,16	-2588,91	388,91
	PEI	-1375	509,90	-2,69	0,11	-2863,91	113,91
	*DNA	-1625	509,90	-3,18	0,08	-3113,91	-136,09
	*C ²	-6400	750,55	-8,52	0,01	-8591,61	-4208,39
	PEI ²	1350	750,55	1,79	0,21	-841,61	3541,61
	DNA ²	1050	750,55	1,39	0,29	-1141,61	3241,61
	C x PEI	-150	721,11	-0,20	0,85	-2255,63	1955,63
	C x DNA	-550	721,11	-0,76	0,52	-2655,63	1555,63
	PEI x DNA	-1500	721,11	-2,08	0,17	-3605,63	605,63

Fonte: Dados do estudo.

A eficiência de transfecção e produção das partículas virais/mL, em 48 e 72 horas, foram mensuradas por fluorescência (GFP) e expressas por equações polinomiais de segundo grau (Eq. 8, 9, 10 e 11) considerando as variáveis significativas ($p < 0,10$):

$$EF(48H) = 9,33 - 2,65.C - 6,41.C^2 \quad (\text{Eq. 8})$$

$$R^2 = 0,64$$

$$TU (48H) = 40600 - 31425.C^2 \quad (\text{Eq. 9})$$

$$R^2 = 0,75$$

$$EF (72H) = 18,96 - 8,58.C \quad (\text{Eq. 10})$$

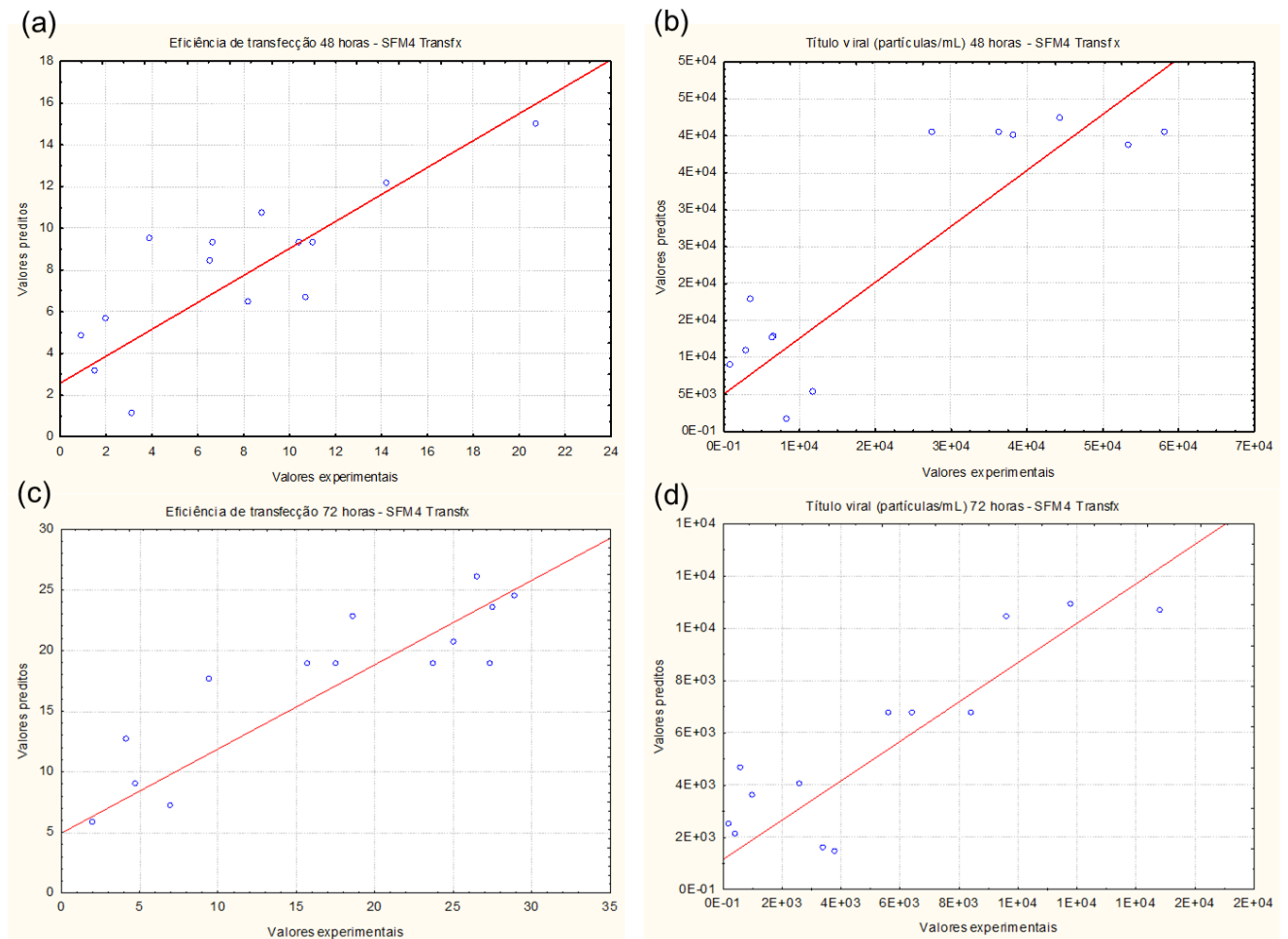
$$R^2 = 0,69$$

$$TU (72H) = 6800 - 1625.DNA - 6400.C^2 \quad (\text{Eq. 11})$$

$$R^2 = 0,75$$

A Figura 28 apresenta o gráfico de valores experimentais *versus* valores preditos obtido pelo software, para com isto avaliar uma maior ou menor capacidade de predição do modelo. Quanto mais próximos os pontos estão da reta, maior a predição.

Figura 28: Valores experimentais versus valores preditos em meio SFM4 Transfx para as variáveis respostas (a) eficiência de transfecção 48 horas, (b) produção lentiviral 48 horas, (c) eficiência de transfecção 72 horas e (d) produção lentiviral 72 horas.



Fonte: Dados do estudo.

A Figura 28 expressa que os valores experimentais estão um pouco mais afastados dos valores preditos quando comparados com os experimentos utilizando o meio FreeStyle; esta diferença também foi expressa pelo R^2 , mostrando resultados um pouco menos satisfatórios. Para comparação das médias e avaliação da significância e predição do modelo ajustado foi realizada análise de variância (ANOVA) conforme apresentado na Tabela 14 (a) e (b).

Tabela 14: Análise de variância para as variáveis respostas, eficiência de transfecção e produção lentiviral nos dois tempos avaliados, 48 horas (a) e 72 horas (b).

(a) 48 horas

Fontes de variação	EF				
	SQ	GL	QM	F _{calc}	F _{tab}
Regressão	218,81	2	109,40	5,89	2,81
Resíduos	222,85	12	18,57		
Falta de ajuste	211,47	10	21,14	3,71	9,39
Erro puro	11,38	2	5,69		
Total	441,66	14	31,54		

(b) 72 horas

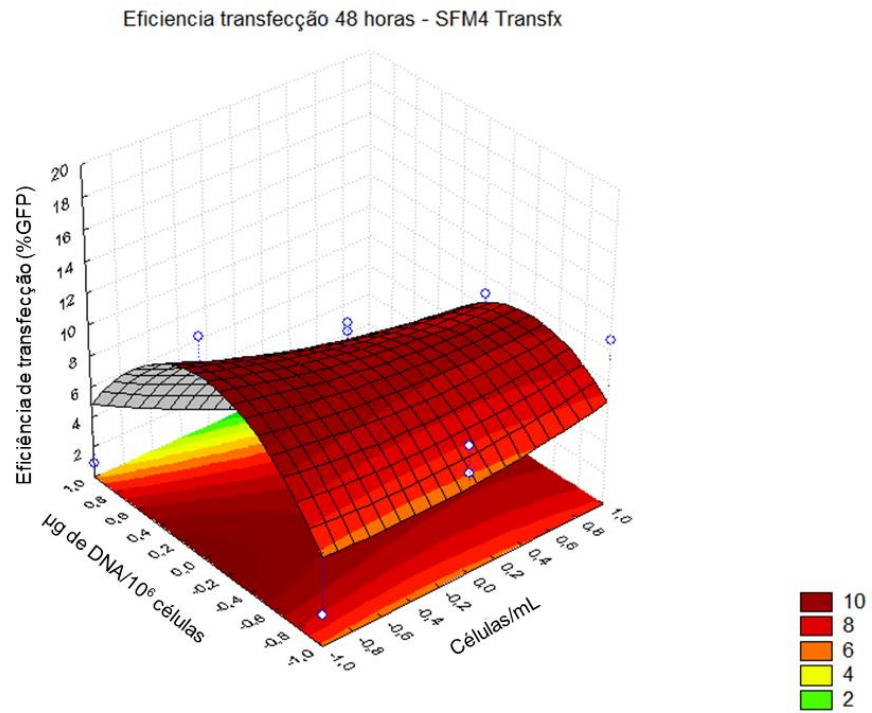
Fontes de variação	SQ		GL		QM		F _{calc}		F _{tab}	
	EF	TU	EF	TU	EF	TU	EF	TU	EF	TU
Regressão	744,68	1,71E+08	1	2	744,68	8,54E+07	14,66	7,87	3,14	2,81
Resíduos	660,25	1,30E+08	13	12	50,78	1,08E+07				
Falta de ajuste	625,03	1,26E+08	11	10	56,82	1,26E+07	3,22	6,05	9,40	9,39
Erro puro	35,22	4,16E+06	2	2	17,61	2,08E+06				
Total	1404,93	3,01E+08	14	14	100,35	2,15E+07				

SQ= Soma dos Quadrados; GL=Graus de Liberdade; QM =Quadrado Médio, F_{calc}= F calculado; F_{tab}= F tabelado.

Fonte: Dados do estudo.

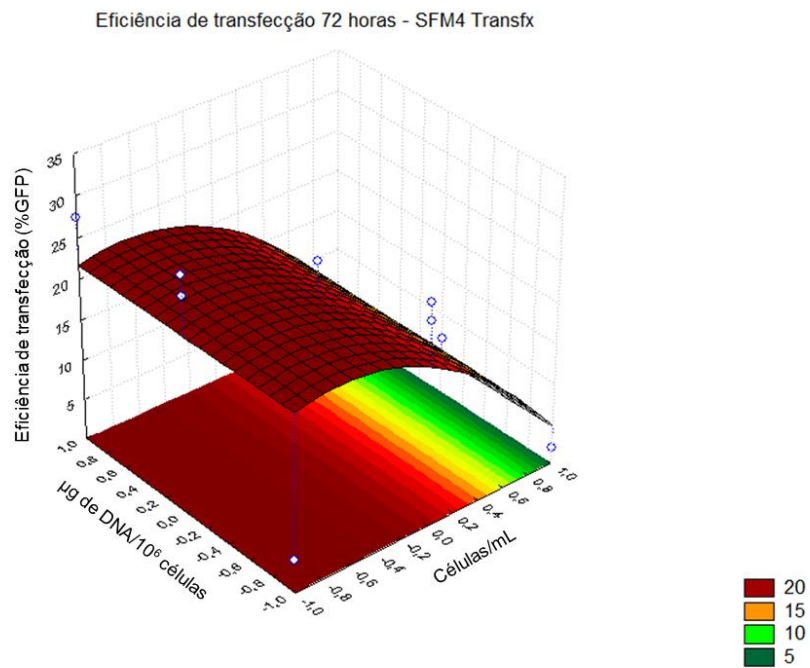
A partir da realização das mesmas análises anteriores com os valores de F calculados e tabelados obteve-se na Tabela 15 (a) que o modelo matemático somente foi capaz de identificar diferenças na eficiência de transfecção; o título viral, por sua vez, não sofreu variação com a alteração do protocolo. O mesmo não aconteceu na coleta de 72 horas (Tabela 15 (b)) mostrando que este modelo foi menos estável quando comparado com o anterior utilizando meio FreeStyle. Para o meio SFM4 Transfx-293 obteve-se modelo significativo e preditivo para EF 48 horas, assim como para EF 72 horas e TU 72 horas. As Figuras 29, 30 e 31 apresentam as superfícies de resposta obtidas nos modelos preditivos.

Figura 29: Superfície de resposta para a resposta EF 48 horas em função da quantidade de DNA em μg por 10^6 células e concentração celular em células/mL.



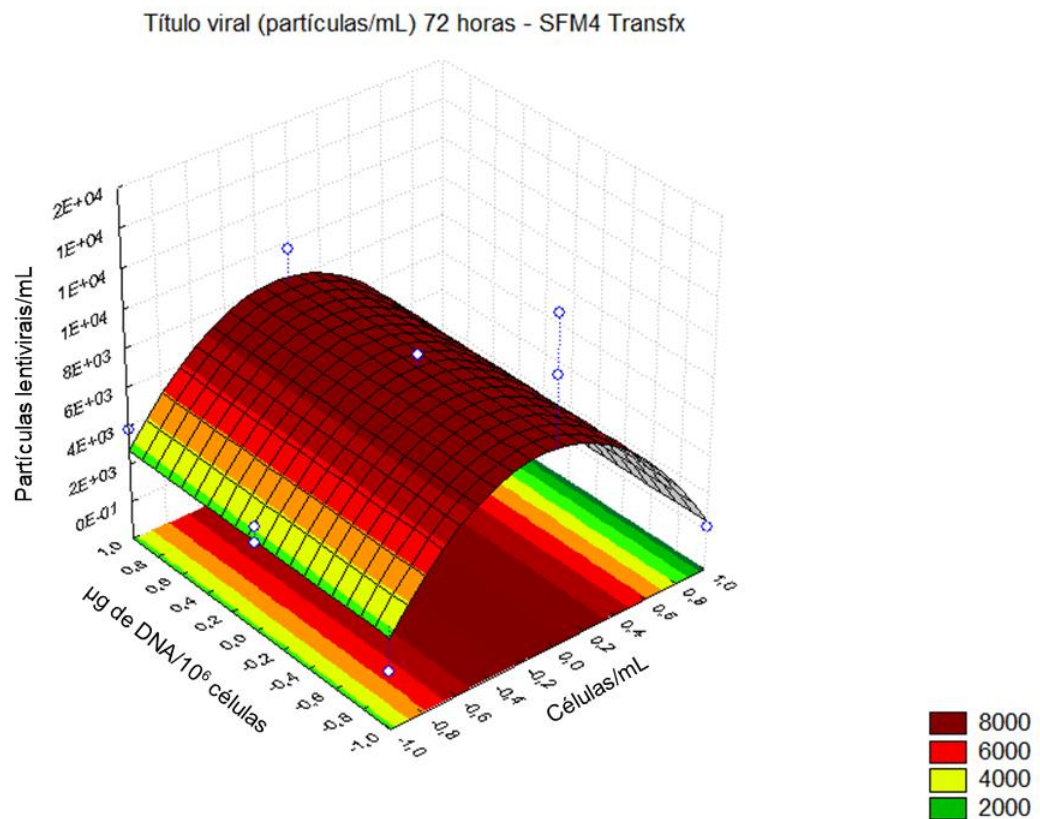
Fonte: Dados do estudo.

Figura 30: Superfície de resposta para a resposta EF 72 horas em função da quantidade de DNA em μg por 10^6 células e concentração celular em células/mL.



Fonte: Dados do estudo.

Figura 31: Superfície de resposta para a resposta TU 72 horas em função da quantidade de DNA em μg por 10^6 células e concentração celular em células/mL.



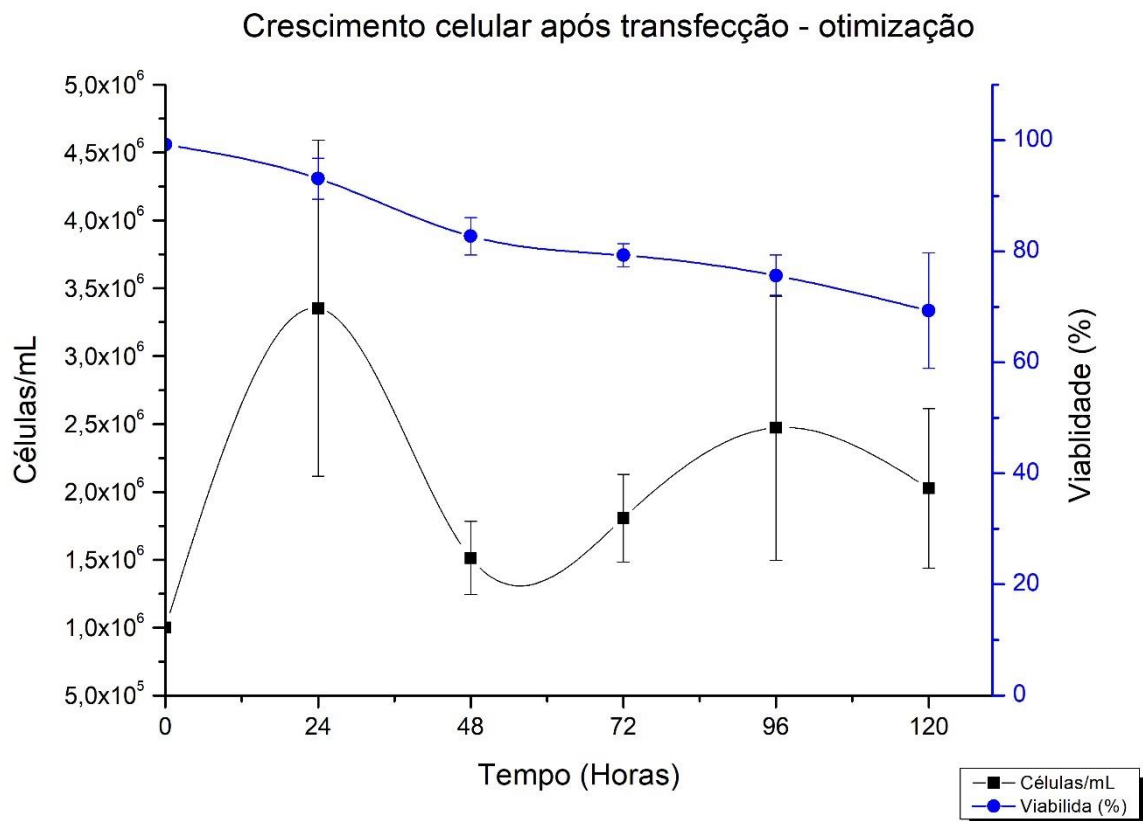
Fonte: Dados do estudo.

Apesar da significância e predição do modelo em meio SFM4Transfx-293, os valores (EF e TU) observados na Tabela 15 e nas superfícies de resposta foram inferiores quando comparados aos obtidos em meio FreeStyle. Além disso o único fator de influência do SFM4Transfx-293 foi a concentração celular em todas as respostas analisadas. Assim, o modelo em meio FreeStyle demonstrou maior confiabilidade dos resultados, ajustou dois dos três parâmetros avaliados e alcançou melhores resultados utilizando menor quantidade de DNA e células, sendo por estes motivos o meio escolhido para a continuidade do estudo.

5.7. Validação do modelo

A partir das análises realizadas pelo delineamento Box-Behnken, a combinação de parâmetros mais eficiente foi obtida no ensaio 5 (R5) em meio FreeStyle-293, utilizando concentração de 1×10^6 células/mL no dia da transfecção, $1 \mu\text{g}$ de DNA por 10^6 células e proporção PEI:DNA de 2,5:1. Para validação dos resultados foram realizados novos cultivos nesta mesma condição ($n=3$). Como nos experimentos anteriores, foi acompanhado o crescimento e viabilidade celular durante a produção lentiviral (Figura 32).

Figura 32: Crescimento da cultura (células totais/mL) e viabilidade (%) durante 120 horas após a transfecção transiente em meio FreeStyle do protocolo R5 (Média \pm desvio padrão, $n=3$).

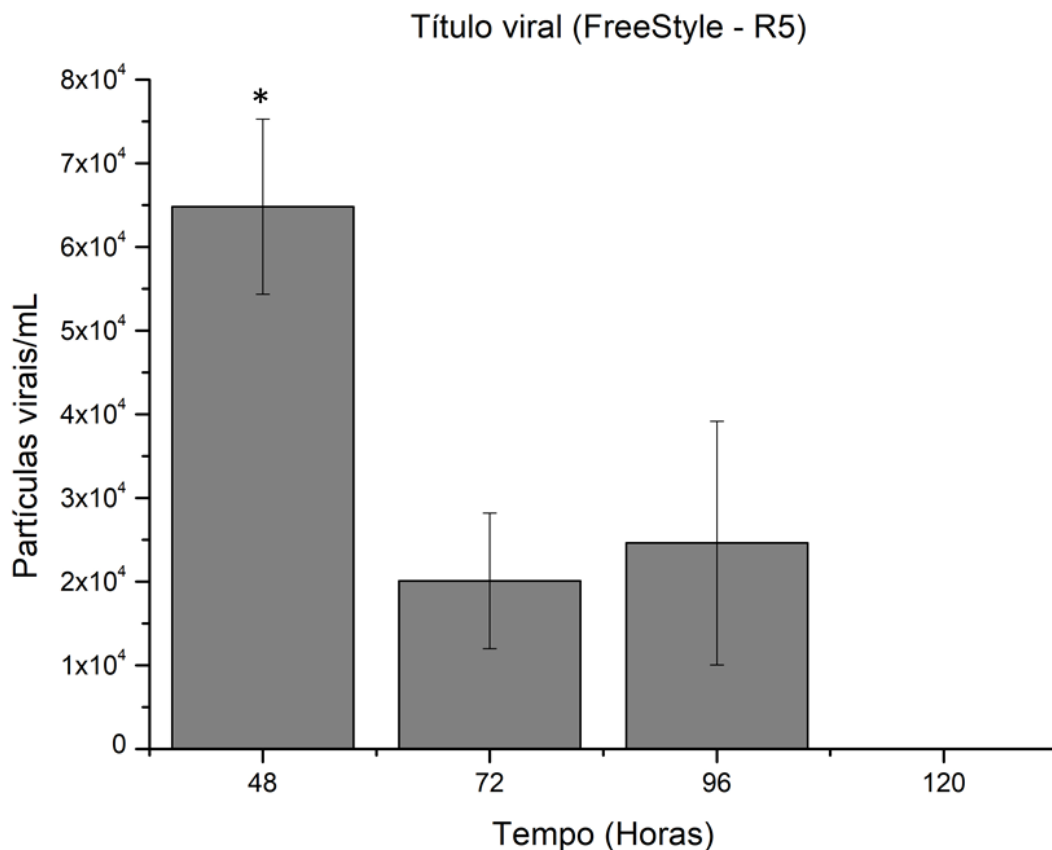


Fonte: Dados do estudo.

Como esperado, com base no perfil da linhagem HEK293T adaptada para suspensão no presente estudo, durante a produção lentiviral houve redução gradual da viabilidade da cultura, chegando a 75% no último dia. O crescimento foi considerado satisfatório, atingindo aproximadamente 3×10^6 células/mL após 24 horas e mantendo-se na faixa de $1,5$ - $2,0 \times 10^6$ células/mL até 120 horas de cultivo. A

eficiência de transfecção, ou seja, porcentagem de células GFP positivas, foi avaliada após 48 horas da realização da transfecção transiente. Em 48 horas após a transfecção a porcentagem de células GFP positivas no cultivo chegou a $62,1 \pm 1,8\%$, sendo compatível com o resultado obtido no delineamento Box-Behnken, que foi de 55,6% após 48 horas. Posteriormente foi realizado o procedimento de titulação viral (Figura 33).

Figura 33: Titulação viral para obtenção da quantidade de partículas virais/mL pelo método de citometria de fluxo e expressão de células GFP positivas no cultivo nas coletas de 48 até 120 horas após a transfecção transiente. Dados representados como média \pm desvio padrão, $n=3$, * $P < 0,05$ (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

Como apresentado na Figura 33, não houve produção lentiviral após 120 horas da realização da transfecção, o que demonstra que a produção transiente deste vetor ocorre somente até 96 horas. A produção após 48 horas seguiu o perfil de todas as produções do presente estudo e foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) quando comparada as produções de 72 e 96 horas. Em relação à produção obtida no delineamento Box-Behnken, o valor obtido em 72 horas foi compatível, sendo 2,94 x

10⁴ partículas/mL anteriormente e nos experimentos de validação a média de produção foi de 2x10⁴ partículas/mL. Na coleta de 48 horas, no entanto, os valores foram menos próximos, obtendo 1x10⁵ anteriormente e nos experimentos de validação a média de 6,5 x 10⁴ partículas/mL. Quando comparado com o a produção lentiviral de 48 horas do Protocolo 2 (não otimizado), na qual a média obtida foi de 4,5 x 10⁴ partículas/mL, a concentração obtida em R5 foi 1,5 vezes superior. A produção total obtida, considerando n=3 e três coletas (48, 72 e 96 horas) em cada experimento, foi de 9,54 x 10⁶ partículas lentivirais no Protocolo 2 e de 1,47 x 10⁷ partículas lentivirais no Protocolo R5. Os valores comparativos entre a produção viral com o Protocolo 2 e R5 estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Comparativo de produção lentiviral (partículas/mL) do Protocolo 2 não otimizado e R5.

Protocolo	Média ± Desvio padrão (partículas/mL)		
	48 horas	72 horas	96 horas
Protocolo 2	4,5x10 ⁴ ± 1,08x10 ⁴	7,4x10 ³ ± 1,5x10 ³	1,8x10 ⁴ ± 1x10 ³
Protocolo R5	6,48x10 ⁴ ± 1x10 ⁴	2x10 ⁴ ± 8,1x10 ³	2,46x10 ⁴ ± 1,4x10 ⁴

Fonte: Dados do estudo.

A produção de vetores virais para terapias *ex vivo* como as células T-CAR possuem capacidade escalonabilidade limitada e altos custos (COMISEL; KARA; FIESSER; FARID, 2020). Dentre as variáveis que influenciam nestes custos está a necessidade de produção de grandes quantidades de DNA plasmidial. Vale ressaltar que a maioria dos protocolos de produção do DNA plasmidial não está otimizado e adequado a maiores escalas (MERTEN et al., 2016; SCHWEIZER; MERTEN, 2010; MCCARRON et al., 2016; SEGURA et al., 2013). Por estes motivos, a adequação de um protocolo que utilize menores quantidades de DNA, menos células e não altere a quantidade de lentivírus produzida é bastante desejável. Dessa forma, o Protocolo R5, apesar de não apresentar título viral consideravelmente superior quando comparado ao protocolo padrão, apresenta-se como satisfatório, pois reduz a quantidade de DNA utilizado na transfecção transiente, de 2 para 1 µg DNA/10⁶ células. Conseqüentemente a utilização do reagente de transfecção PEI também foi reduzida, o que é positivo, uma vez que este composto é citotóxico como já mencionado.

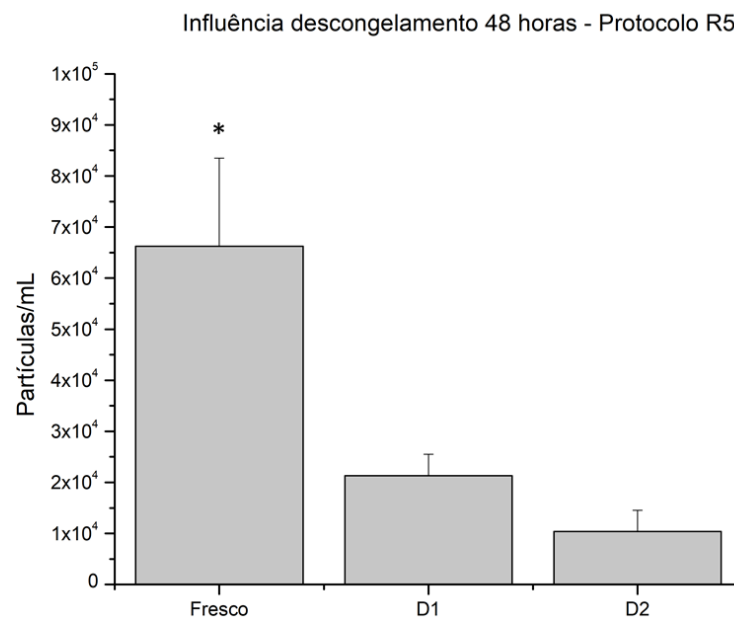
No presente estudo também foi observada que a cada repetição da titulação, onde era necessário o descongelamento do concentrado viral, havia uma diferença

no resultado que parecia ter seu valor reduzido a cada descongelamento. Assim, foi avaliado este efeito titulando o lentivírus recentemente produzido (fresco) e após 1 e 2 descongelamentos.

5.8. Influência dos ciclos de congelamento e descongelamento das partículas lentivirais

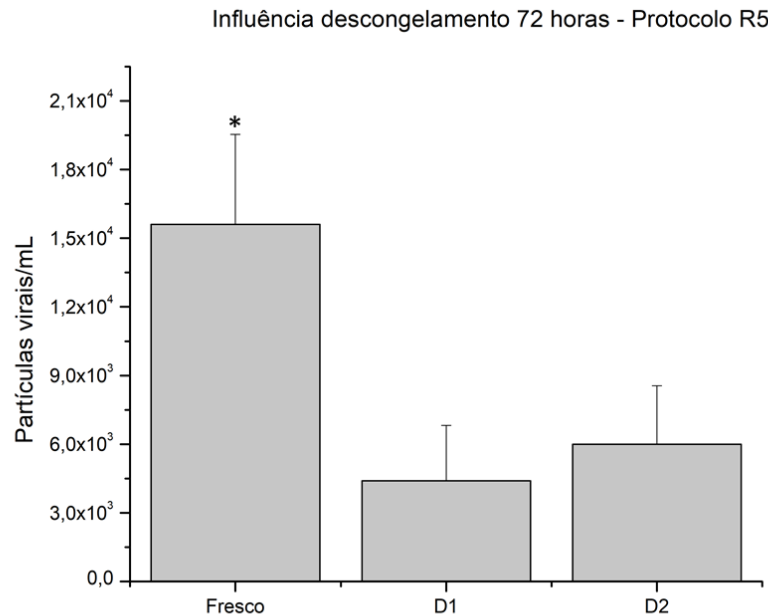
Para avaliação do efeito de congelamento e descongelamento do concentrado lentiviral foi realizada transfecção transiente com o Protocolo R5. As coletas foram realizadas em 48 e 72 horas e no mesmo dia da coleta o lentivírus fresco foi titulado. O concentrado viral congelado a -80°C , foi descongelado 1 vez, titulado, congelado novamente e descongelado uma segunda vez para avaliar a diferença de título viral e consequentemente a possível perda de partículas funcionais. As Figura 34 e 35 mostram a diferença entre as concentrações de partículas/mL obtidas em cada descongelamento.

Figura 34: Efeito do congelamento e descongelamento na quantidade de partículas lentivirais/mL em 48 horas após a transfecção transiente – protocolo R5 (Média \pm desvio padrão, $n=3$, * $P < 0,05$ (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

Figura 35: Efeito do congelamento e descongelamento na quantidade de partículas lentivirais/mL em 72 horas após a transfecção transiente – protocolo R5 (Média \pm desvio padrão, n=3, * P < 0,05 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).

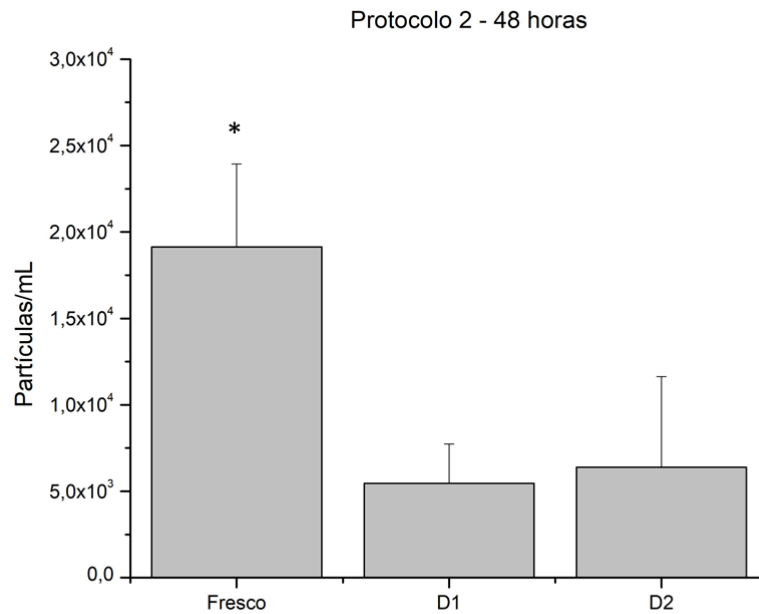


Fonte: Dados do estudo.

Foi possível observar que o processo de congelamento e descongelamento tem influência significativa ($p < 0,05$) na viabilidade das partículas lentivirais funcionais, tanto em 48 quanto em 72 horas. Em 48 horas houve perda, em média, de 68,2% e em 72 horas, 71,8% das partículas/mL quando comparado o título fresco com apenas um ciclo de congelamento a -80°C e descongelamento.

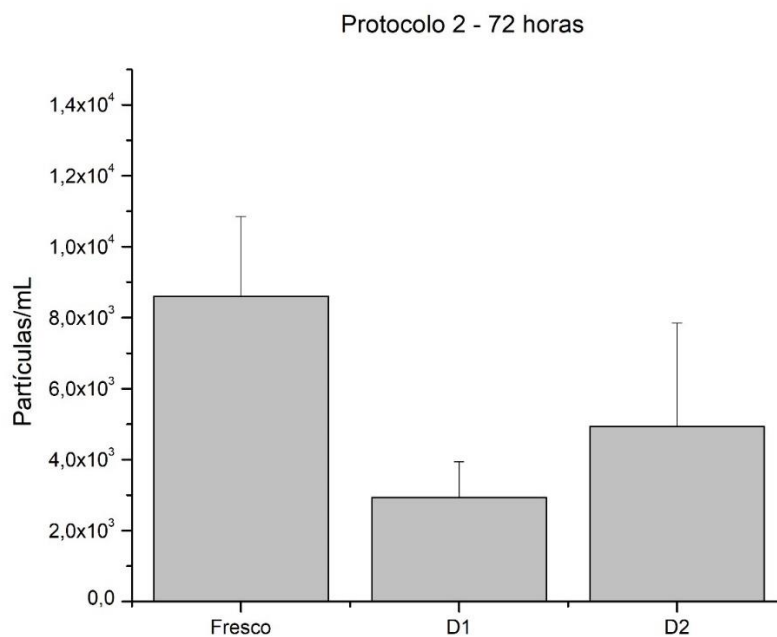
O Protocolo 2 (padrão) foi posteriormente testado para avaliar se o comportamento de perda de título viral se manteria após 1 e 2 ciclos de congelamento e descongelamento. Como é possível observar na Figura 36, quando o concentrado viral passa pelo processo de congelamento e descongelamento apenas uma vez ocorre diferença significativa ($p < 0,05$) na quantidade de partículas funcionais, esta diferença não foi identificada ($p > 0,05$) na coleta de 72 horas (Figura 37). Avaliando os dois tempos de coleta, a melhor produtividade obtida em partículas/mL foi em 48 horas após a transfecção e nesta houve uma perda de, em média, 72% das partículas após um descongelamento.

Figura 36: Efeito do congelamento e descongelamento na quantidade de partículas lentivirais/mL em 48 horas após a transfecção transiente (Média \pm desvio padrão, $n=3$, * $P < 0,05$ (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

Figura 37: Efeito do congelamento e descongelamento na quantidade de partículas lentivirais/mL em 72 horas após a transfecção transiente (Média \pm desvio padrão, $n=3$, * $P < 0,05$ (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

Assim, concluiu-se que a melhor alternativa seria minimizar os ciclos de congelamento e descongelamento para realização da modificação da célula de interesse para reduzir as perdas das partículas viáveis. Nos experimentos do delineamento experimental, realizados anteriormente neste trabalho, a titulação viral foi realizada após um ciclo de congelamento e descongelamento, fato que pode explicar parte da redução da quantidade de partículas/mL. Além disso, à 4°C o tempo de meia vida do lentivirus pode chegar a 200 horas (HIGASHIKAWA; CHANG, 2001) em razão da perda da atividade da transcriptase reversa nessa temperatura (CARMO et al., 2008), dessa forma a estratégia foi de utilizar o concentrado viral fresco e conservado à 4°C por no máximo 48 horas para que não haja maiores perdas. A influência dos ciclos de congelamento e descongelamento demonstrou-se relevante também em estudos anteriores, nos quais foi observado perda de 50% das partículas lentivirais após uma média de 3,8 descongelamentos (HIGASHIKAWA; CHANG, 2001) e redução de até 33% na eficiência de infecção do lentivírus em somente um processo de congelamento e descongelamento (JIANG et al., 2015).

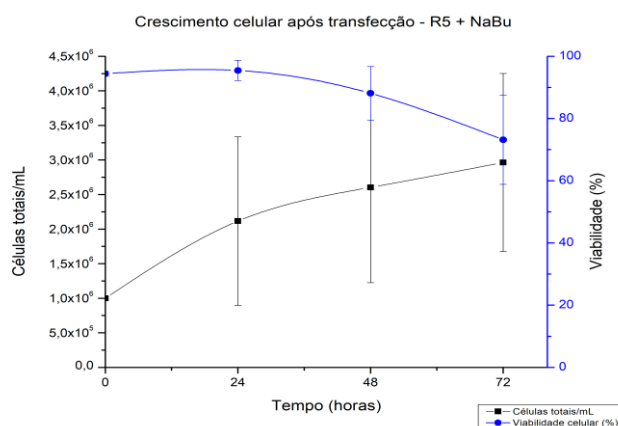
Durante o processo de liberação das partículas virais é esperado que nem todas sejam infecciosas. Em um estudo utilizando vetores lentivirais, em amostra não concentrada, obteve-se que a cada 346 partículas geradas apenas 1 era infecciosa (HIGASHIKAWA; CHANG, 2001). De acordo com a literatura alguns fatores podem interferir na perda de funcionalidade ou redução da produção de partículas lentivirais funcionais como por exemplo o tempo de meia vida. Este tempo, no caso do lentivírus, é dependente do tipo de envelope utilizado; o VSV-G mostrou-se um dos tipos de envelopes mais estáveis e que proporciona uma média de 34,7 horas de meia vida às partículas à 37°C, um dos melhores resultados obtidos. O mesmo estudo ainda demonstrou que a perda pode variar dependendo da técnica de titulação utilizada e que a maioria dos procedimentos podem subestimar a quantidade de lentivírus (DAUTZENBERG; RABELINK; HOEBEN, 2020). Outros fatores identificados foram a interferência do pH e da temperatura no tempo de meia vida. Através de estudo com vetores lentivirais foi demonstrado que em temperatura ambiente o tempo de meia vida foi de 1 a 2 dias, à medida que a temperatura aumenta chegando a 37°C este tempo foi reduzido para 10 horas, obtendo melhores resultados na temperatura de 4°C atingindo tempo de 200 horas. Temperaturas muito altas como 45 e 50°C mantiveram a meia vida em média de 35 minutos. No mesmo estudo, a alteração do

pH também se mostrou determinante no tempo de meia vida, sendo mais estável em 7, com rápida desestabilização a qualquer variação, caindo para menos de 10 minutos quando atingiu pH 6 ou 8. Além disso o processo de congelamento e descongelamento também foi classificado como um fator importante de interferência na viabilidade das partículas lentivirais (HIGASHIKAWA; CHANG, 2001), conforme também verificado neste estudo.

5.9. Produção de partículas lentivirais em suspensão – Protocolo R5 e Butirato de Sódio

Com o objetivo de otimizar ainda mais o protocolo para obtenção de maior produtividade em partículas lentivirais/mL, foi adicionado ao protocolo R5 5mM de Butirato de sódio (NaBu). Este composto é um inibidor de histonas que impede a compactação do DNA, fato que garante maior acessibilidade aos promotores, melhorando a transcrição do RNA. O NaBu é bastante utilizado na produção partículas virais e geralmente a concentração utilizada varia de 1 a 20 mM, obtendo melhores resultados em diversos estudos quando utilizado a 5mM (ELLIS et al., 2011; MOÇO, 2018; ANSORGE et al., 2009). Desta forma foi adicionado, no momento da transfecção, 5mM de NaBu ao protocolo R5. Na Figura 38 é possível obter um perfil do crescimento e viabilidade celular durante as 72 horas de cultivo. O crescimento seguiu os padrões anteriores, no entanto foi possível observar uma menor formação de debris celulares quando comparado com as outras produções sem NaBu.

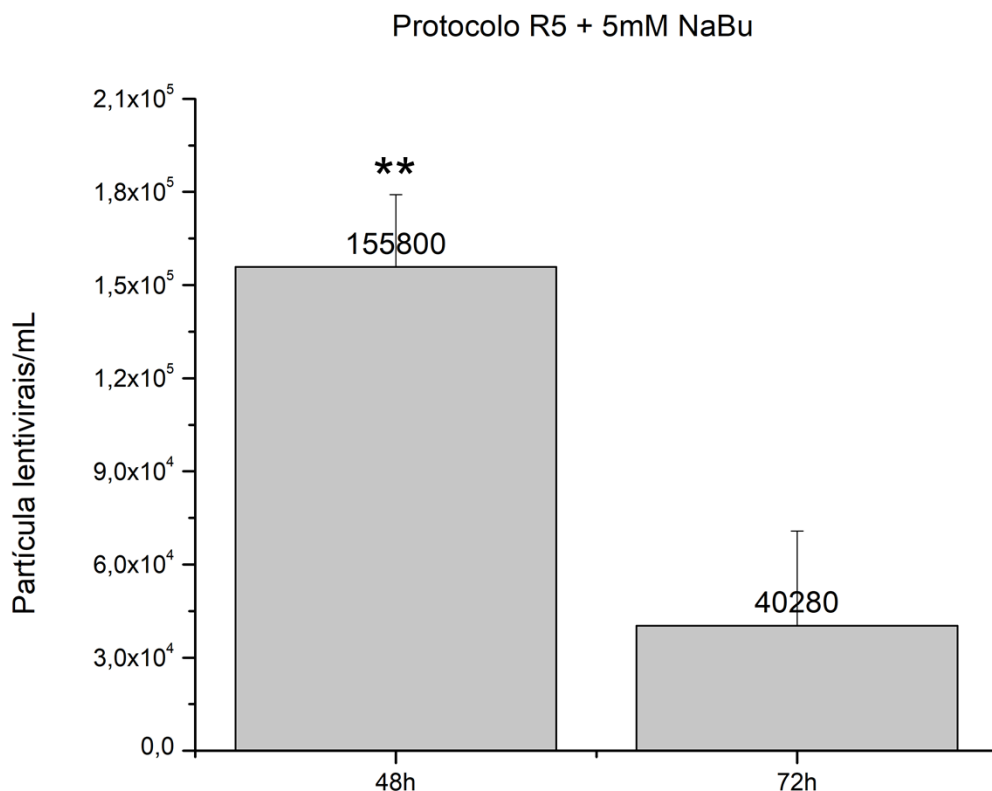
Figura 38: Crescimento da cultura (células totais/mL) e viabilidade (%) durante 72 horas após a transfecção transiente em meio FreeStyle do protocolo R5 + 5mM de NaBu (Média \pm desvio padrão, n=5).



Fontes: Dados do estudo.

Após 48 horas da realização da transfecção transiente obteve-se $36,58 \pm 1,17\%$ de células GFP positivas, demonstrando que a eficiência de transfecção foi um pouco menor quando comparada com os dados anteriores, no entanto este fator não afetou a quantidade de partículas lentivirais produzidas. Os resultados obtidos por meio da titulação viral estão apresentados na Figura 39.

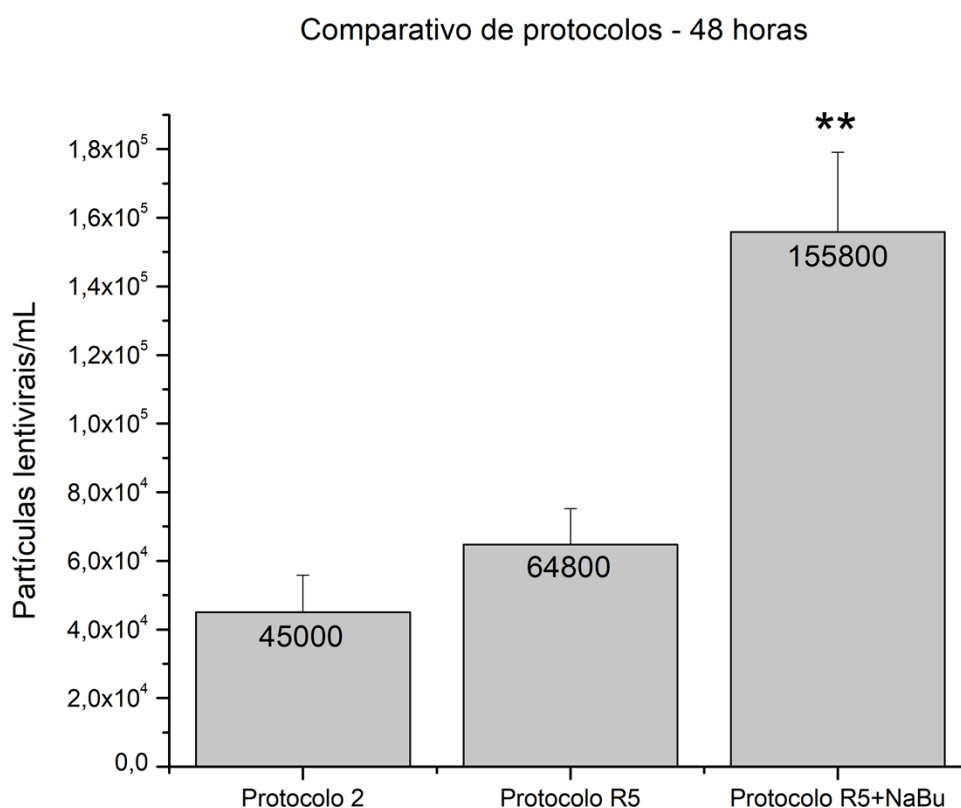
Figura 39: Titulação viral para obtenção da quantidade de partículas virais/mL pelo método de citometria de fluxo e expressão de células GFP positivas no cultivo nas coletas de 48 e 72 horas após a transfecção transiente, protocolo R5 + 5mM NaBu. Média \pm desvio padrão, n=5, ** P < 0,001 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

A produção de partículas lentivirais foi avaliada até 96 horas, no entanto, não foi possível a obtenção de células expressando GFP na titulação utilizando a coleta de 96 horas. Desta forma, a produção foi avaliada somente nas coletas de 48 e 72 horas. Quando comparada com as produções anteriores foi possível avaliar que a coleta de 48 horas (R5+NaBu) demonstrou-se superior estatisticamente das demais ($p < 0,001$) (Figura 40), enquanto que a coleta de 72 horas não foi diferente entre os protocolos.

Figura 40:Comparativo dos protocolos 2 - padrão, R5 e R5+5mM de NaBu da produção de partículas lentivirais/mL obtidas da coleta de 48 horas após a transfecção transiente. Média \pm desvio padrão, n=3, ** P < 0,001 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

Com base nestes resultados o melhor protocolo identificado foi o R5 com adição de 5mM de NaBu, uma vez que este foi capaz de obter melhor produtividade de partículas lentivirais viáveis utilizando menor quantidade de DNA, PEI e número de células. Ainda, estes dados confirmaram que a melhor produção é realizada após 48 horas da realização da transfecção transiente. Considerando as diversas variáveis que influenciam na transfecção e produção viral, como já discutido anteriormente neste trabalho, estudos futuros podem otimizar ainda mais o protocolo de produção deste vetor (CAR anti-CD19 IL-18 GFP).

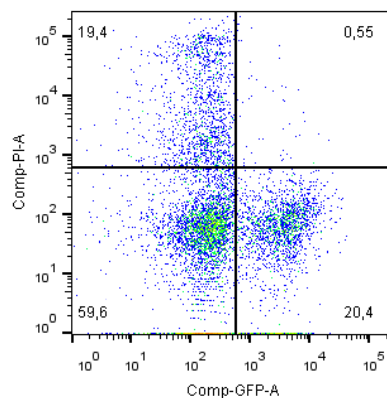
5.10. Avaliação da funcionalidade das partículas lentivirais produzidas em suspensão

A funcionalidade das partículas lentivirais produzidas em monocamada já foi avaliada e comprovada anteriormente neste trabalho, fato que demonstra que o vetor construído é funcional. No entanto, como as condições de cultivo das células e de transfecção foram alteradas a mesma avaliação faz-se necessária. Desta forma, a partir de PBMC isolado do filtro de leuco-redução de doador saudável, linfócitos T foram isolados por seleção negativa e ativados por beads magnéticas anti-CD3/CD28. Por meio de marcação dos receptores CD3, CD4 e CD8 por citometria de fluxo foi avaliada a pureza do cultivo isolado, confirmando uma pureza de 99%.

5.10.1. Modificação dos linfócitos T

A modificação dos linfócitos T isolados foi realizada por meio de transdução, onde foram adicionadas 2×10^6 partículas lentivirais em 4×10^5 linfócitos (MOI=5) juntamente com o reagente Polybrene® (1 μ L/mL) e centrifugados por 90 minutos a 1285 x g e 30°C. Um cultivo controle de linfócitos T não transduzidos também foi mantido e os subcultivos foram realizados a cada 48 horas para expansão de ambas as culturas, modificadas ou não. Como já citado anteriormente, para monitoramento da eficiência de transdução foi avaliada a expressão de células GFP positivas por citometria de fluxo. Após 4 dias da transdução o cultivo apresentou 20,4% de células GFP positivas, ou seja, células T-CAR (Figura 41).

Figura 41: Citometria de fluxo dos linfócitos T transduzidos com o vetor lentiviral CAR anti-CD19 IL-18 GFP. O quadrante inferior direito identifica a quantidade de células, em porcentagem (%), positivas para a expressão de GFP.



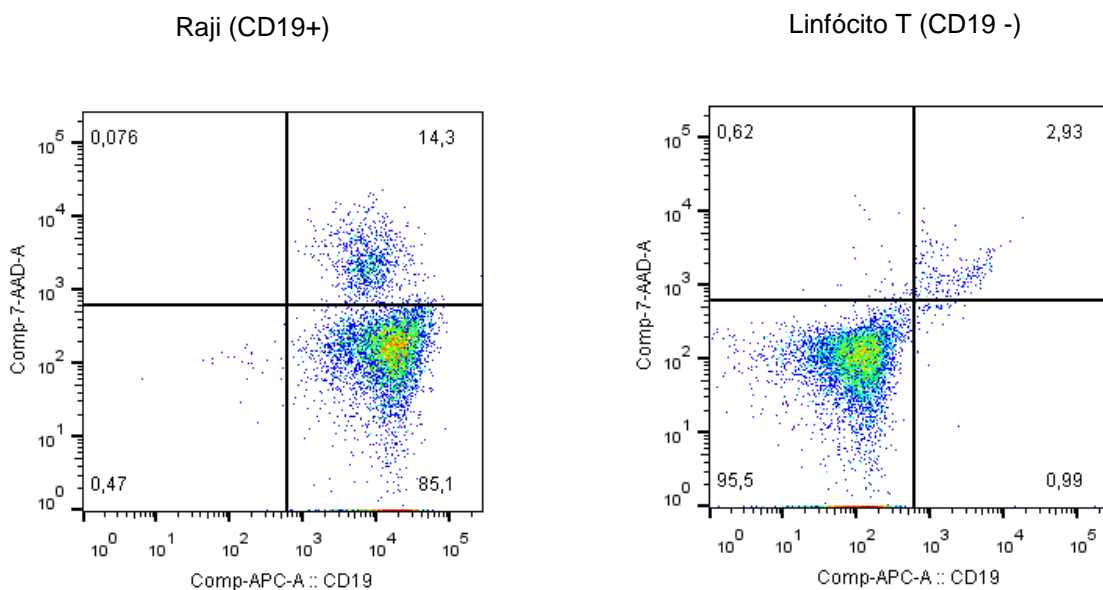
Fontes: Dados do estudo.

Estes resultados demonstraram que as partículas lentivirais produzidas em suspensão e meio livre de SFB foram capazes de modificar um linfócito T gerando um linfócito T-CAR. Assim, a próxima etapa consistiu na avaliação *in vitro* da funcionalidade destes linfócitos.

5.10.2. Cocultivo linfócito T-CAR e linhagem CD19+

Para avaliação da atividade antitumoral dos linfócitos T modificados com os vetores lentivirais produzidos na HEK293 em suspensão sem SFB foi realizado novamente cocultivo do linfócito T, modificado ou não, com a linhagem tumoral Raji (CD19+). Para isso foram utilizadas $0,5 \times 10^5$ células Raji em cada experimento e para os linfócitos T, modificados ou não, foram utilizadas as proporções em relação a Raji de 1:1, 5:1 e 10:1. Como a porcentagem de células GFP+ no cultivo de células T-CAR foi de 21,4%, este valor foi considerado para que a proporção de células Raji fosse em relação as células CAR+. O marcador de viabilidade utilizado foi 7-AAD e os experimentos foram realizados em duplicata. A Figura 42 apresenta a análise das duas populações de células, Raji e Linfócito T, separadamente marcadas para CD19 como condição controle. As células CD19 positivas permanecem à esquerda da imagem.

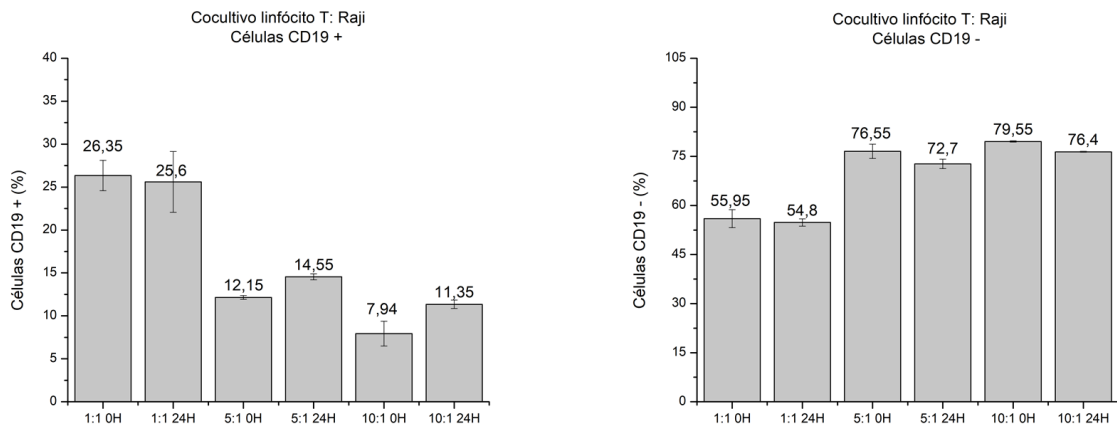
Figura 42: Citometria de fluxo de células CD19+ marcadas com anticorpo CD19 (à esquerda) para identificação das células Raji vivas e linfócitos T viáveis que não possuem CD19 em sua superfície (à direita).



Fonte: Dados do estudo.

As análises foram realizadas por citometria de fluxo e foi possível observar o comportamento e porcentagem das populações (CD19 + e CD19-) nos tempos analisados e identificar se houve morte das células alvo (CD19+). Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de variância ANOVA de uma-via seguido de teste *post hoc* de Tukey, comparando cada uma das proporções entre si em 0 e 24 horas. A Figura 43 apresenta as comparações obtidas no cocultivo controle Linfócito T e Raji. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparadas as porcentagens das populações de 0 para 24 horas de cultivo, tanto as células CD19 positivas quanto as CD19 negativas mantiveram-se na mesma proporção, indicando que não houve morte significativa das células alvo Raji (CD19+).

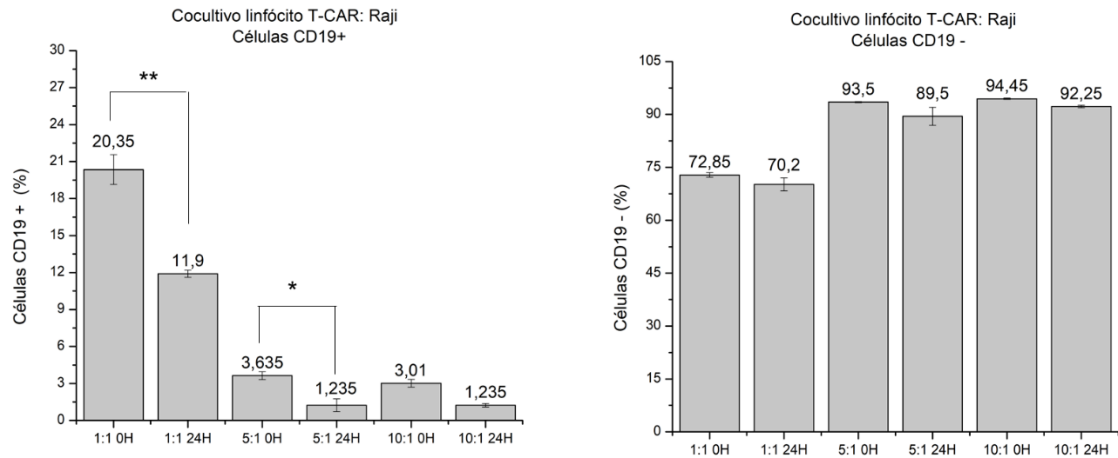
Figura 43: Cocultivo em 0 e 24 horas em três diferentes proporções 1:1, 5:1, 10:1 de linfócito T não transduzido e da célula Raji CD19+. +. Porcentagem de células CD19 + (esquerda) e CD19 - (direita). Média \pm desvio padrão, n=2. *P < 0,05 **P < 0,001 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

A Figura 44 mostra os resultados obtidos no cocultivo de Linfócitos T-CAR e Raji. Diferente do experimento anterior, foi possível observar diferenças entre 0 e 24 horas de cultivo. A população CD19 negativa não foi alterada, permanecendo em proporções semelhantes nos tempos analisados, indicando que não houve perda significativa dessa população. No entanto, as células CD19 positivas apresentaram diferença de quantidade entre 0 e 24 horas nas proporções de 1:1 ($p < 0,001$) e 5:1 ($p < 0,05$) indicando morte dessa população quando cocultivadas com os linfócitos T-CAR. Assim como no cocultivo utilizando os vetores lentivirais produzidos em monocamada, apenas as proporções 1:1 e 5:1 apresentaram diferença significativa, indicando um perfil semelhante.

Figura 44: Cocultivo em 0 e 24 horas em três diferentes proporções 1:1, 5:1, 10:1 de linfócito T-CAR e da célula Raji CD19+. Porcentagem de células CD19 + (esquerda) e CD19 - (direita). Média \pm desvio padrão, n=2. *P < 0,05 **P < 0,001 (ANOVA uma-via seguida de teste de Tukey).



Fonte: Dados do estudo.

Diversos estudos tem avaliado a especificidade das células T CAR anti-CD19 produzidas por meio de ensaios *in vitro* de citotoxicidade, como por exemplo o cocultivo com células que possuem expressão de CD19 em sua superfície como linhagem Raji e K562 ou avaliação da liberação de lactato desidrogenase (LDH) (ZHU et al., 2017; MOÇO, 2018; PIKANÇO-CASTRO et al., 2019) sendo possível caracterizar as células produzidas e avaliar sua viabilidade para estudos *in vivo*. O cocultivo realizado no presente trabalho apontou que os vetores lentivirais produzidos em suspensão sem SFB foram capazes de modificar linfócitos T humanos e proporcionar atividade antitumoral específica para o receptor CD19, indicando funcionalidade do vetor quando produzido em diferentes condições.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram verificar a integridade e funcionalidade do vetor utilizado neste trabalho, sendo o mesmo capaz de modificar um linfócito T humano que por sua vez induziu atividade antitumoral e especificidade pelo antígeno CD19. A produção lentiviral em monocamada em meio contendo SFB e utilizando PEI como reagente de transfecção mostrou resultados comparáveis com a literatura utilizando condições semelhantes. Já a transfecção transiente em suspensão em meio livre de SFB, deu origem a uma menor produção de partículas lentivirais. Novas condições de transfecção foram estabelecidas por meio de delineamento experimental e o modelo matemático foi capaz de gerar um protocolo otimizado de transfecção transiente em suspensão utilizando menor quantidade de DNA e células por cultivo. A utilização do aditivo Butirato de Sódio no protocolo otimizado aumentou ainda mais a produção de partículas lentivirais, apresentando-se como o melhor protocolo adotado neste estudo, sendo ele: meio FreeStyle 293 sem suplementação, concentração celular no dia da transfecção de 1×10^6 células/mL, quantidade total de DNA de $1 \mu\text{g}/10^6$ células com proporção de DNA plasmidial CAR:pHelp1:pHelp2:pHelp3 - 3:1:1:1, proporção de PEI:DNA de 2,5:1 e adição de 5mM de NaBu no momento da transfecção. Além disso, também foi possível comprovar a funcionalidade dos vetores lentivirais produzidos tanto em células aderente quanto em células adaptadas a suspensão em meios livres de SFB.

7. REFERÊNCIAS

- ALTAMIRANO, C. et al. 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** 110, v. 110, p. 171–179, 2004.
- ANSORGE, S. et al. Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures. **The journal of gene medicine**, v. 10, n. 6, p. 610–618, 2009.
- ANSORGE, S. Development of a Scalable Process for Lentiviral Vector Mass Production by Transient Transfection. **PhD Thesis**, 2010.
- ANSORGE, S.; HENRY, O.; KAMEN, A. Recent progress in lentiviral vector mass production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 362–377, 2010.
- AVANZI, P.M.; VAN LEEUWEN, D.G.; LI, X.; CHEUNG, K.; PARK, H.; PURDON, T.J.; BRENTJENS, R.J. IL-18 Secreting CAR T Cells Enhance Cell Persistence, Induce Prolonged B Cell Aplasia and Eradicate CD19+ Tumor Cells without Need for Prior Conditioning. **Bloodjournal**, v.128, n.22, 2016.
- BACKLIWAL, G. et al. Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g / l by transient transfection under serum-free conditions. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 15, 2008.
- BAULER, M. et al. Production of Lentiviral Vectors Using Suspension Cells Grown in Serum-free Media. **Molecular Therapy: Methods & Clinical Development**, v. 17, n. June, p. 58–68, 2020.
- BATISTA, A. **A imunoterapia no tratamento do cancro**. [s.l.] Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2016.
- BIAGGIO, R. T. AG. et al. Serum-free suspension culturing of human cells: adaptation, growth, and cryopreservation. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 8, p. 1495–1507, 2015.
- BOLLIN, F.; DECHAVANNE, V.; CHEVALET, L. Design of Experiment in CHO and HEK transient transfection condition optimization. **Protein Expression and Purification**, v. 78, n. 1, p. 61–68, 2011.
- BROUSSAU, S. et al. Inducible packaging cells for large-scale production of lentiviral vectors in serum-free suspension culture. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 3, p. 500–507, 2008.
- BURNS, J. C. et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 17, p. 8033–8037, 1993.
- BUCHSCHACHER, G. L.; WONG-STAAAL, F. Review article Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. **Blood journal**, v. 95, n. 8, p. 2499–2505, 2018.
- CAO, S.; CRIPPS, A.; WEI, M. Q. 2nd Australia – China Biomedical Research Conference (ACBRC2009) New strategies for cancer gene therapy: Progress and opportunities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, p. 108–114, 2010.
- CARPENTIER, E.; KAMEN, A. A.; DUROCHER, Y. Limiting factors governing protein expression following polyethylenimine-mediated gene transfer in HEK293-EBNA1 cells. **Journal of biotechnology**, v. 128, p. 268–280, 2007.
- CERVERA, L. et al. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free

- medium. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 4, p. 152–165, 2013.
- CERVERA, L. et al. Selection and optimization of transfection enhancer additives for increased virus-like particle production in HEK293 suspension cell cultures. p. 9935–9949, 2015.
- CHENG, L.; SUN, X.; YI, X. Large-scale plasmid preparation for transient gene expression. **Biotechnol Lett**, p. 1559–1564, 2011.
- CLAMME, J. P.; AZOULAY, J.; ME, Y. Monitoring of the Formation and Dissociation of Polyethylenimine / DNA Complexes by Two Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy. v. 84, n. March, p. 1960–1968, 2003.
- COMISEL, R. et al. Lentiviral vector bioprocess economics for cell and gene therapy commercialisation. **Biochemical Engineering Journal**, n. July, p. 107868, 2020.
- COSTA, B. L. V. **Cultivos de células animais visando a altas concentrações celulares: processo em perfusão e cultivos de células animais visando a altas concentrações celulares: processo em perfusão**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.
- CLINICAL TRIALS. Lentiviral vector and gene therapy. Disponível em <<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=lentivirus+vector+gene+therapy&Search=Search>> Acesso em 25 de abril de 2018.
- CRUZ, H. J. et al. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. v. 27, p. 43–52, 2000.
- DA SILVA, F. H. **Produção de vetores lentivirais baseados em HIV-1 em linhagem de célula tronco mesenquimal murina**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2005.
- DAUTZENBERG, I. J. C.; HOEBEN, R. C. The stability of envelope-pseudotyped lentiviral vectors. **Gene Therapy**, 2020.
- DEPIL, S. et al. the-shelf[®] allogeneic CAR T cells: development and challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. March, p. 185–199, 2020.
- DEVITT, A. et al. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. v. 392, n. April, p. 505–509, 1998.
- DOTTI, G. et al. Design and Development of Therapies using Chimeric Antigen Receptor-Expressing T cells. **Immunology Rev.**, v. 257, n. 1, p. 1–35, 2015.
- DUNBAR, C. E. et al. Gene therapy comes of age. **Science**, v. 4672, n. January, 2018.
- DUROCHER, Y.; PERRET, S.; KAMEN, A. High level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. **Nucleic acids research**, v.30, n.2, 2002.
- ELLIS, B. L.; POTTS, P. R.; PORTEUS, M. H. Brief Reports Creating Higher Titer Lentivirus with Caffeine 1 1. v. 100, n. January, p. 93–100, 2011.
- ESCORS, D.; BRECKPOT, K. Lentiviral Vectors in Gene Therapy: Their Current Status and Future Potential. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, p. 107–119, 2010.
- ESHAR, Z. et al. Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 248, n. 1–2, p. 67–76, 2001.
- FARAG, S. S. et al. Review article Natural killer cell receptor: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. v. 100, n. 6, p. 1935–1948, 2019.
- FARSON, D. et al. A New-Generation Stable Inducible Packaging Cell Line for Lentiviral Vectors. **Human Gene Therapy**, v. 12, n. 8, p. 981–997, 2001.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry: Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy. **Evaluation**, 1998.
- FUKUMOTO, Y. et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH.

Cytotechnology, p. 73–82, 2010.

GAAL, E. V. B. VAN et al. How to screen non-viral gene delivery systems in vitro? **Journal of Controlled Release**, v. 154, n. 3, p. 218–232, 2011.

GAGNON, M. et al. High-End pH-Controlled Delivery of Glucose Effectively Suppresses Lactate Accumulation in CHO Fed-Batch Cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 1328–1337, 2011.

GEISSE, S.; HENKE, M. Large-scale transient transfection of mammalian cells: A newly emerging attractive option for recombinant protein production. **Journal of Structural and Functional genomics**, v. 6, p.165-170, 2005.

GÉLINAS, J. et al. Assessment of selected media supplements to improve F / HN lentiviral vector production yields. n. December 2016, p. 1–12, 2017.

Gene Therapies in Research: Overview. GTnetwork. Disponível em: <https://genetherapynetwork.com/current-therapeutics-research/gene-therapies-in-research-overview/>

GODBEY, W.T.; WU, K. K.; MIKOS, A. G. Tracking the intracellular path of poly (ethylenimine)/ DNA complexes for gene delivery. v. 96, n. April, p. 5177–5181, 1999.

GOLCHIN, A.; FARAHANY, T. Z. Biological Products: Cellular Therapy and FDA Approved Products. **Springer Science+Business Media**, v. 15, p. 166–175, 2019.

GRAHAM, C. et al. Allogeneic CAR-T Cells: More than Ease of Access? cells, p. 1–11, 2018.

GRAHAM, F. L. et al. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by D N A from Human Adenovirus Type 5. **Journal gene Virology**, v. 36, n. 2977, p. 59–72, 1977.

GUTIÉRREZ-GRANADOS, S. et al. Optimized production of HIV-1 virus-like particles by transient transfection in CAP-T cells. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 3935–3947, 2016.

HALL, A. et al. Polyplex Evolution: Understanding Biology, Optimizing Performance. **Molecular Therapy**, v. 25, n. 7, p. 1476–1490, 2017.

HAN, X. et al. The heterogeneous nature of polyethylenimine-DNA complex formation affects transient gene expression. p. 63–75, 2009.

HIGASHIKAWA, F.; CHANG, L. Kinetic Analyses of Stability of Simple and Complex Retroviral Vectors. v. 131, p. 124–131, 2001.

JAALOUK, D. E. et al. Inhibition of histone deacetylation in 293GPG packaging cell line improves the production of self-inactivating MLV-derived retroviral vectors. **Virology Journal**, v. 3, p. 1–12, 2006.

JIANG, W. et al. An optimized method for high- titer lentivirus preparations without ultracentrifugation. **Nature Publishing Group**, p. 1–9, 2015.

JUNE, C. H. et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, v. 359, n. 6382, p. 1361–1365, 2018.

JÚNIOR, D. M. et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. v. 55, n. 11, 2010.

KAISER, A. D. et al. Towards a commercial process for the manufacture of genetically modified T cells for therapy. **Cancer Gene Therapy**, v. 22, n. 2, p. 72–78, 2015.

KALOS, M. et al. T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. **Science translational medicine**, v. 3, n. 95, p. 95ra73, 2011.

KAROLEWSKI, B. A. et al. Comparison of Transfection Conditions for a Lentivirus Vector Produced in Large Volumes ABSTRACT. v. 1296, p. 1287–1296, 2003.

- KISZEL, P. et al. Transient Gene Expression Using Valproic Acid in Combination with Co- transfection of SV40 Large T Antigen and human p21. **Cell Culture and Tissue Engineering**, 2019.
- KUWAE, S.; OHDA, T.; TAMASHIMA, H. Development of a Fed-Batch Culture Process for Enhanced Production of Recombinant Human Antithrombin by Chinese Hamster Ovary Cells. **Journal of Biosciences and Bioengineering**, v. 100, n. 5, p. 502–510, 2005.
- KURODA, H. et al. Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection. **Journal of Virological Methods**, v. 157, n. 2, p. 113–121, 2009.
- LI, J. et al. Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: Lessons learned and strategies for moving forward. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 11, n. 1, 2018.
- LE, H. et al. Multivariate analysis of cell culture bioprocess data — Lactate consumption as process indicator. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 2–3, p. 210–223, 2012.
- LIN, S.-M. et al. Differential Regulation of Membrane CD14 Expression and Endotoxin-Tolerance in Alveolar Macrophages. v. 31, n. 2, p. 162–170, 2014.
- LISTE-CALLEJA, L.; LECINA, M.; LOPEZ-REPULLO, J. Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 9951–9960, 2015.
- LEUNG, P. S. C. et al. Autoimmunity Reviews Gene therapy in autoimmune diseases: Challenges and opportunities. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 3, p. 170–174, 2010.
- LOMBA, A. L. O. Adaptação para o cultivo em suspensão e meio de cultura livre de soro fetal bovino da linhagem celular HEK-293T para produção em larga escala de vetores lentivirais. Processo Fapesp nº 2017/21737-2.
- MCCARRON, A.; DONNELLEY, M.; MCINTYRE, C. Challenges of up-scaling lentivirus production and processing. **Journal of Biotechnology**, v. 240, p. 23–30, 2016.
- MANCEUR, A. P. et al. Scalable lentiviral vector production using stable HEK293SF producer cell lines. **Human Gene Therapy Methods**, v. 28, n. 6, 2017.
- MARTHO, L. J.; DEGASPERI, G. R.; TARSITANO, C. A. B. Imunoterapia com células T-CAR: bioengenharia contra a leucemia. **Cuidarte Enfermagem**, v. 2, n. 11, p. 168–173, 2017.
- MATOZO, H. DO C. **Estudos estruturais do domínio catalítico da proteína tirosina fosfatase η de rato**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.
- MAUS, M. V.; LEVINE, B. L. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for the Community Oncologist. **The Oncologist**, v. 21, n. 5, p. 608–617, 2016.
- MERCILLE, S.; MASSIEZ, B. Induction of Apoptosis in Nutrient-Deprived Cultures of Hybridoma and Myeloma Cells. 1994.
- MERTEN, O. W.; HEBBEN, M.; BOVOLENTA, C. Production of lentiviral vectors. **Molecular Therapy - Methods and Clinical Development**, v. 3, n. December 2015, p. 16017, 2016.
- MOÇO, P.D. Estabelecimento de uma plataforma para produção de vetores lentivirais para modificação de linfócitos T com CAR anti-CD19. Universidade de São Paulo, dissertação, 2018.
- MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. Imunobiologia de Janeway, 7ª edição. Porto Alegre, Artmed, 2010.
- NADEAU, I. et al. Low-Protein Medium Affects the 293SF Central Metabolism

- During Growth and Infection with Adenovirus. 2002.
- NALDINI, L. et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 21, p. 11382–11388, 1996.
- NICOLAS MARCEAU, Savign Sur Orge (FR); MEHDI GASMI, Sarasota, FL. **Scalable lentiviral vector production system compatible with industrial pharmaceutical applications**. Int CL C12N15/86 C12N7/00 US 2014/0315294 A1. nov. 26, 2012, Oct. 23, 2014. Relate U.S. Aplicativo Data.
- OKON, E. U. et al. In-vitro cytotoxicity of Polyethyleneimine on HeLa and Vero Cells. v. 5, n. 3, p. 192–199, 2014.
- OLIVEIRA, N. A. DE J. **Desenvolvimento de modelos animais de terapia gênica para o hormônio de crescimento utilizando queratinócitos transduzidos e injeção direta de DNA plasmidial**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.
- ORTIZ, R. et al. New Gene Therapy Strategies for Cancer Treatment: A Review of Recent Patents. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, p. 297–312, 2012.
- PAPANEOPHYTOU, C. Design of Experiments as a Tool for Optimization in Recombinant Protein Biotechnology: From Constructs to Crystals. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 12, p. 873–891, 2019.
- PARK, F. et al. Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. **Nature Genetics**, v. 24, n. 1, p. 49–52, 2000.
- PASTERNAK, C.A.; AIYATHURAI, J.E.J.; MAKINDE, V.; DAVIES, A.; BALDWIN, S.A.; KONIECZKO, E.M.; WIDNELL, C.C. Regulation of glucose uptake by stressed cells. **Journal of cellular physiology**, n.149, p. 324-331, 1991.
- PETIOT, E. et al. Metabolic and Kinetic analyses of influenza production in perfusion HEK293 cell culture. p. 1–12, 2011.
- PHAM, P. L.; KAMEN, A.; DUROCHER, Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. **Molecular Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 225–237, 2006.
- PICANÇO-CASTRO, V. et al. Lentiviral-mediated gene transfer – a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 18, p. 525–539, 2008.
- PICANÇO-CASTRO, V.; MOÇO, P.D.; MIZUKAMI, A.; VAZ, L.D.; PEREIRA, M.S.F.; SILVESTRE, R.N.; AZECEDO, J.T.C.; BONFIM, A.S.; ABREU NETO, M.S.; MALMEGRIM, K.C.R.; SWIECH, K.; COVAS, D.T. Establishment of a simple and efficient platform for car-t cell generation and expansion: from lentiviral production to *in vivo* studies. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 2019.
- RAYMOND, C. et al. A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 44–51, 2011.
- RITACCO, F. V; WU, Y.; KHETAN, A. Cell Culture Media for Recombinant Protein Expression in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells: History, Key Components, and Optimization Strategies. **Biotechnol Prog**, 2018.
- ROBINSON, B. T. J. Box-Behnken Designs. **Wiley StatsRef**, p. 1–7, [s.d.].
- ROCHA, B.B. **Imunoterapia para o câncer**. Universidade de São Paulo, tese, 2014.
- POLYPLUS TRANSFECTION. PEIpro large scale virus production. Disponível em <<https://www.polyplus-transfection.com/products/pei-pro/>> Acesso em 22 de outubro de 2019.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 3. ed. Campinas: Cárita, 2014.

- RUELLA, M.; JUNE, C. H. Chimeric Antigen Receptor T cells for B Cell Neoplasms: Choose the Right CAR for You. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 11, n. 5, p. 368–384, 2016.
- SAKUMA, T.; BARRY, M. A.; IKEDA, Y. Lentiviral vectors: basic to translational. **Biochemical Journal**, v. 443, n. 3, p. 603–618, 2012.
- SANTOS, N. S. DE O.; ROAMNOS, M. T. V.; WIGG, M. D. *Virologia humana*. 3a ed. [s.l.: s.n.].
- SEGURA, M.M. et al. Production of Lentiviral Vectors by Large-Scale Transient Transfection of Suspension Cultures and Affinity Chromatography Purification. **Biotechnology Bioengineering**, v. 98, n.4, p. 789-799, 2007.
- SEGURA, M. M. et al. Lentivirus Gene Engineering Protocols. v. 614, n. 1, p. 39–52, 2010.
- SEGURA, M. M. et al. Expert Opinion on Biological Therapy New developments in lentiviral vector design, production and purification New developments in lentiviral vector design, production and purification. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 2598, n. October, 2016.
- SELIGER, B.; RITZ, U.; FERRONE, S. Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 1, p. 129–138, 2006.
- SENA-ESTEVEZ, M. et al. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. v. 122, p. 131–139, 2004.
- SENSEBÉ, L.; BOURIN, P.; TARTE, K. Good Manufacturing Practices Production of Mesenchymal Stem/Stromal Cells. **Human Gene Therapy**, v. 22, n. 1, p. 19–26, 2011.
- SIEGWART, P. et al. Adaptive Control at Low Glucose Concentration of HEK-293 Cell Serum-Free Cultures. p. 608–616, 1999.
- SWIECH, K. et al. Transient transfection of serum-free suspension HEK 293 cell culture for efficient production of human rFVIII. **BMC Biotechnology**, v. 11, 2011.
- SUH, J.; WIRTZ, D.; HANES, J. Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. n. Track II, 2003.
- TING, X. L. et al. Production of lentiviral vectors in suspension cells using low proportion of supercoiled circular plasmid DNA. **Cytotechnology**, v. 72, n. 6, p. 897–905, 2020.
- TOLEDO, J. R.; PRIETO, Y.; ORAMAS, N. Polyethylenimine-Based Transfection Method as a Simple and Effective Way to Produce Recombinant Lentiviral Vectors. p. 538–544, 2009.
- VALLÉE, C.; DUROCHER, Y.; HENRY, O. Exploiting the metabolism of PYC expressing HEK293 cells in fed-batch cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 169, p. 63–70, 2014.
- VEDOVELI, N. C. P. S. **Construção e análise funcional de vetores lentivirais de interesse biotecnológico**. [s.l.] Universidade de São Paulo - USP, 2016.
- YAMANO, S.; DAI, J.; MOURSİ, A. M. Comparison of Transfection Efficiency of Nonviral Gene Transfer Reagents. **Molecular Biotechnology**, p. 287–300, 2010.
- YE, J. et al. High-Level Protein Expression in Scalable CHO Transient Transfection. v. 103, n. 3, p. 542–551, 2009.
- YESCARTA, 2018. Disponível em < <https://www.yescarta.com/> >. Acesso 2 de julho de 2018.
- WALKER, A.; JOHNSON, R. Commercialization of cellular immunotherapies for cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 2, p. 329–332, 2016.
- WANG, X.; RIVIÈRE, I. Clinical manufacturing of CAR T cells: Foundation of a

- promising therapy. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 3, n. February, p. 1–7, 2016.
- WIRTH, T.; PARKER, N.; YLÄ-HERTTUALA, S. History of gene therapy. **Gene**, v. 525, p. 162–169, 2013.
- WORLD CANCER REPORT 2014. World Health Organization. Disponível em <<http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>> Acesso em 18 de abril de 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer, key facts. Disponível em <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> Acesso em 18 de abril de 2018.
- 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, n.2, p.238-245, 2013.
- ZARITSKAYA, L. et al. New flow cytometry assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. **Expert Rev Vaccines**, v. 9, n. 6, p. 601–616, 2010.
- ZHANG, W. et al. Characterization of clinical grade CD19 chimeric antigen receptor T cells produced using automated CliniMACS Prodigy system. p. 3343–3356, 2018.
- ZHANG, Y. Approaches to Optimizing Animal Cell Culture Process: Substrate Metabolism Regulation and Protein Expression Improvement. n. April, p. 177–215, 2009.
- ZHU, F. et al. chimeric antigen receptor T cells using the CliniMACS Prodigy device at an academic medical center. **Cytotherapy**, n. September, 2017.

8. ANEXOS

ANEXO A - Aprovação da Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio) e Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)

