

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE UM PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACO ANTILEUCÊMICO

A. E. S. FERREIRA¹, N. S. FUGANHOLI², T. GOUVEIA³, C. O. RANGEL-YAGUI²,
A. PESSOA-JR², A. R. AZZONI¹

¹ Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Química

² Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

³ Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Laboratório de Biotecnologia Industrial
E-mail para contato: adamo.esf@usp.br

RESUMO – A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é um dos tipos de câncer que apresenta maior incidência infanto-juvenil, sendo a L-asparaginase o biofármaco que atua como primeira linha de tratamento, apresentando altos índices de cura. Casos de hipersensibilidade e reações alérgicas à forma nativa da enzima levaram à necessidade do desenvolvimento de novas variantes deste biofármaco, por exemplo, através da sua peguilação. Neste trabalho buscou-se simular o processo de produção de L-asparaginase peguilada, em uma escala capaz de futuramente atender as necessidades do mercado brasileiro. Através do uso do software SuperPro Designer®, simulou-se um processo base (inicial) a partir de dados experimentais obtidos em laboratório. Ainda que o flowsheet básico represente o primeiro esforço de avaliação técnico-econômica deste processo, os dados obtidos permitem identificar importantes restrições de processo, como as etapas de peguilação e a etapa final de purificação (permeação em gel) sendo, portanto, uma ferramenta preciosa para orientar os esforços seguintes (experimentais) necessários ao escalonamento do processo.

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfóide Aguda é o câncer caracterizado pela presença de linfócitos na medula óssea e na corrente sanguínea, correspondendo a aproximadamente 25% dos diagnósticos em crianças menores de 15 anos (Instituto Nacional do Câncer, 2020). A L-Asparaginase é uma enzima usada como principal agente terapêutico no tratamento dessa doença, com efeito anti-leucêmico através da inibição do crescimento tumoral na hidrólise da asparagina necessária para a manutenção das células tumorais, as quais dependem de asparagina extracelular para realizar a síntese protéica (El-Naggar *et al.*, 2014). A L-Asparaginase não é produzida no Brasil, estando disponível no mercado em três diferentes formulações: Leuginase® (Pequim, China), Spectrila® (Medac, Alemanha) e Oncaspar® (Sigma-Tau, Itália). Todos esses biofármacos apresentam alta atividade anti-leucêmica. Contudo, diferem no tempo de meia-vida, farmacocinética e imunogenicidade. Seus valores variam entre US\$ 38,00/dose a US\$ 1.619,10/dose (Ministério da

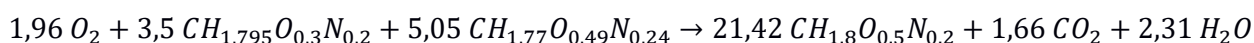
Saúde, 2017). É interesse de nosso grupo de pesquisa a prospecção de novas Asparaginases e a superação dos desafios para uma possível produção no Brasil.

No contexto de auxiliar o desenvolvimento de bioprocessos, existem simuladores especialmente voltados para processos biofarmacêuticos (Petrides *et al.*, 2014). O software SuperPro Designer® é um software capaz de simular bioprocessos descontínuos e semi-contínuos. Diferentes cenários podem ser gerados e modificados, de maneira dinâmica e rápida, permitindo avaliação técnico-econômica. Gargalos, inconsistências de *scheduling* e operações críticas podem ser identificados, sendo ferramenta importante para a otimização do processo.

O objetivo deste trabalho é simular o processo de produção da L-asparaginase peguilada, em escala capaz de futuramente suprir a demanda anual brasileira. Através de simulação computacional, um processo base foi gerado com base em dados experimentais (Torres-Obreque, 2019). Ainda que o fluxograma básico represente o primeiro esforço de avaliação técnico-econômica desse processo, os dados obtidos permitem estimar o valor por dose e a identificação de gargalos do processo, mostrando-se uma ferramenta interessante para orientar os esforços experimentais necessários para a melhoria do processo, bem como orientar futuras pesquisas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo em biorreator: O processo de simulação foi desenvolvido utilizando o software SuperPro Designer v10 (Intelligen®, EUA), usando como base o processo de produção de L-Asparaginase em escala de bancada, descrito por Torres-Obreque (2019). Foi assumida uma demanda correspondente a 62000 doses/ano (Ministério da Saúde, 2017). Foram definidos volumes de biorreator iguais a 150L e 1500 L para o preparo de inóculo e o biorreator principal, respectivamente. A bactéria *E. coli* recombinante foi cultivada em meio Luria Bertani com 50 µg mL⁻¹ de ampicilina a 37°C, com um tempo de cultivo de 5 h, indução por IPTG 0,1 mM, até atingir uma concentração de 3,2 g/L de biomassa. A equação estequiométrica de fermentação utilizada é apresentada a seguir:



Recuperação e purificação: Respeitando o fator de escalonamento de 2130, a biomassa do biorreator foi concentrada por uma centrífuga de discos para, em seguida, ser submetida a choque osmótico. A L-asparaginase liberada do periplasma foi clarificada novamente por centrifugação e filtração *dead-end*. A solução foi então submetida a concentração/diafiltração por filtração tangencial e equilíbrio em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 5,5. A purificação foi feita em coluna de cromatografia de troca iônica, seguida novamente de diafiltração.

Peguição: A solução contendo L-asparaginase foi adicionado mPEG-NHS10 kDa por 30 min a 22°C. A purificação final da enzima peguilada ocorreu via cromatografia de permeação em gel em tampão fosfato de sódio 20mM, pH 7,5, para então seguir à etapa de esterilização.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas premissas descritas anteriormente, foi estimada uma produção de 2500 gramas da enzima recombinante por ano, sendo o *flowsheet* base (inicial) apresentado na Figura 1.

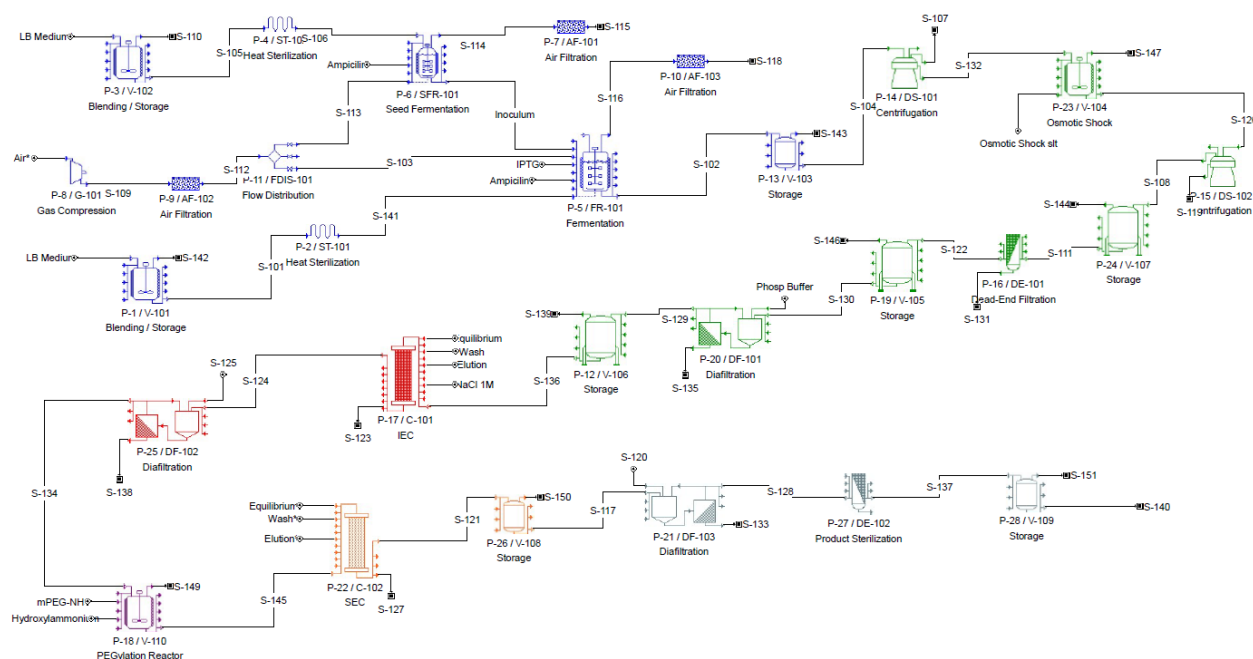


Figura 1 – *Flowsheet* do cenário-base da simulação do processo de produção da L-asparaginase.

Foram utilizadas 28 operações unitárias, algumas ausentes no trabalho de Torres-Obreque (2019), como tanques, compressores de gás e filtros de ar, e diafiltradores. Em seguida, relatórios econômicos para avaliação da composição de custos do processo foram gerados (Figura 2).

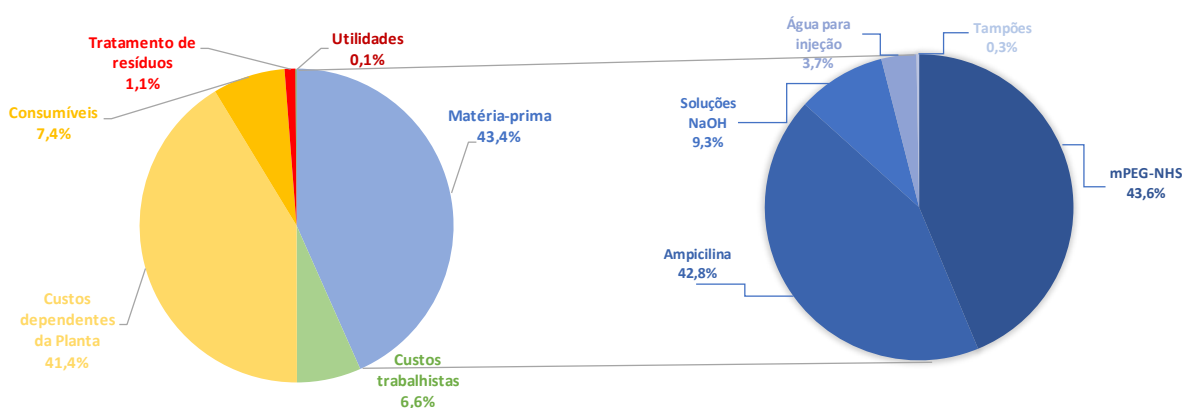


Figura 2 – Composição do custo de produção da L-asparaginase pegulada.

Matérias-primas e custos associados à planta (depreciação, manutenção, seguro, taxas

locais, etc) corresponderam a 43% e 41% dos custos totais de produção, respectivamente. Neste trabalho, o reagente mPEG-NHS foi o componente com maior contribuição nos custos de matérias-primas. Seu alto valor é justificado por seu alto valor de mercado e a elevada quantidade utilizada na reação de peguilação (Torres-Obreque, 2019). Por fim, o antibiótico ampicilina também contribuiu significativamente, representando 43% do custo de matérias primas. O custo de produção por grama de L-Asparaginase peguilada foi estimado em US\$ 8520,00.

4. CONCLUSÃO

Ainda que distante de representar um processo otimizado para produção em larga escala, o cenário-base apresentado aqui permite concluir que algumas operações unitárias influenciam nos custos de processo de forma desproporcional, em especial a etapa de peguilação. A otimização da etapa de reação e reaproveitamento da L-asparaginase não peguilada podem reduzir os custos gerais do processo. No que diz respeito às etapas de purificação, verificou-se que os custos com colunas e resinas de adsorção foram elevados, principalmente a cromatografia de permeação em gel, sendo esta uma operação candidata a substituição. Ainda que o estudo detalhado do processo não esteja concluído, observa-se que o alto custo da L-asparaginase peguilada oferecida no mercado é justificável devido aos altos custos das etapas de peguilação e purificação, quando comparado à enzima nativa. As próximas etapas desse estudo envolverão a busca por novas alternativas de peguilação e purificação, além da otimização da etapa de fermentação.

5. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2013/08617-7) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Processo nº 88887.480444/2020-00) pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

EL-NAGAR, N.E.A., EL-EWASY, S.M., EL-SHWEIHY, N.M., Microbial L-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: The pros and cons. *Int. J. Pharmacol.*, v.10, p. 182–199, 2014.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). 2020. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. 122f. <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf> (acessado em 23/06/19).

Ministério da Saúde: Esclarecimentos L-asparaginase. 2017. 44f. https://www.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/22/2.%20b%20-%20L-ASPARAGINASE_CIT_22_06_2017.pdf (acessado em 19/04/2020).

PETRIDES, D., CARMICHAEL, D., KOULOURIS, A., Biopharmaceutical process optimization with simulation and scheduling tools. *Bioengineering* v. 1, p. 154–187, 2014.

TORRES-OBREQUE, K.M., MENEGUETTI, G.P., CUSTÓDIO, D., MONTEIRO, G., PESSOA-JUNIOR, A., RANGEL-YAGUI, C.O., Production of a novel N-terminal PEGylated crisantaspase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* v. 66, p. 281–289, 2019.