

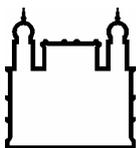
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**Padronização e Validação da técnica do Limulus Amebocyte Lysate  
(LAL) Semi-Quantitativa e Quantitativa para o Biofármaco  
Alfainterferona 2b Humana Recombinante**

**RICARDO CRISTIANO DE SOUZA BRUM**

**Rio de Janeiro  
2009**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

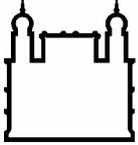
**RICARDO CRISTIANO DE SOUZA BRUM**

**Padronização e Validação da técnica do Limulus Amebocyte Lysate  
(LAL) Semi-Quantitativa e Quantitativa para o Biofármaco  
Alfainterferona 2b Humana Recombinante**

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

**RIO DE JANEIRO  
2009**

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Departamento de Controle de Qualidade, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elezer Monte Blanco Lemes.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**RICARDO CRISTIANO DE SOUZA BRUM**

**Padronização e Validação da técnica do Limulus Amebocyte Lysate  
(LAL) Semi-Quantitativa e Quantitativa para o Biofármaco  
Alfainterferona 2b Humana Recombinante**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Elezer Monte Blanco Lemes

Dissertação aprovada em 06/ 04 /2009.

Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna  
Bio-Manguinhos / FIOCRUZ  
Presidente

Prof<sup>a</sup> Dra. Akie Kawakami Ávila  
Fundação BIO-RIO – Pólo de Biotecnologia do Rio de Janeiro

Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Luisa Miranda  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro  
2009

Dedico este trabalho a minha mãe “*Alcyone Mendes de Souza Brum*” (*in memorian*), que tanto amo, e ao “astral superior”, que não deixaram de irradiar vibrações de fé, amor e esperança até o último momento.

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço Deus pela vida e pela oportunidade de aprender...

À Fundação Oswaldo Cruz por ter proporcionado as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

À Bio-Manguinhos, na pessoa do Doutor Akira Homma, pelo apoio financeiro e condições de trabalho.

À D<sup>ra</sup> e Orientadora *Elezer Monte Blanco Lemes*, pela orientação, auxílio e contribuição potencial para o meu aprimoramento científico.

À vice-diretora de Qualidade *Maria da Luz Fernandes Leal* e a chefe do Departamento de Qualidade *Darcy Akemi Hokama* pela oportunidade e confiança depositados.

À servidora *Lilia Ribeiro Serodio*, chefe do Laboratório de Controle Microbiológico, pelas palavras de força, compreensão, acreditação e incentivo depositados, imprescindível para a dinâmica da equipe e concretização do trabalho.

Ao Mestre *Fernando Cesar Ferreira* pelo apoio e confiança depositados.

À coordenação do MPTI por todo tipo de apoio e ajuda fornecida durante o curso.

Ao corpo docente de Professores Doutores que passaram por mim e deixaram um pouco de si, em especial a D<sup>ra</sup> *Márcia Terezinha Baroni*, meus agradecimentos verdadeiros.

Aos profissionais *Miguel Angel de La O Herrera* e *Camila Eleotério Lopes Soares* pela imensa contribuição na elaboração deste trabalho.

Às secretárias *Zaíra Antunes Prado* e *Andrea Lemos Tavares Ayrosa* por terem agüentado tantos alunos desesperados e chatos em vésperas de prova, além de contribuírem enormemente para que chegássemos ao término, vitoriosos.

Ao meu Pai e irmãos pelos votos de incentivo, acreditação e confiança.

Ao meu irmão/pai/amigo *Jorge Brum* pelas palavras de força, apoio e esperanças infinitas.

Aos meus sobrinhos queridos, que muito alegraram a minha mente e me fizeram sorrir nos momentos difíceis.

Ao amigo e companheiro *Luís Carlos Virginio de Araújo*, pela ajuda nos momentos mais difíceis, por sua constante presença de espírito e amizade verdadeira. Nem o tempo e a distância me farão esquecer os momentos vividos.

Ao amigo *João Silveira*, a quem muito devo e aprendi sobre a vida.

A toda equipe do SETBI, pelo apoio profissional, compreensão e compromissos prestados durante a minha ausência no decorrer do curso, para o andamento das atividades de rotina. Não chegaria aqui sem a colaboração de todos vocês.

Aos alunos e companheiros do MPTI turma 2007 por todos os momentos vividos e compartilhados juntos e, principalmente, por todas as dificuldades superadas.

As funcionárias do Laboratório de Metrologia e Validação *Ester Ribeiro de Figueiredo e Maria Betânia Silva de Oliveira Marchetti* pela contribuição imprescindível na avaliação dos resultados.

A todos os meus “amigos”, de longe ou perto, que de certa forma, direta ou indiretamente, contribuíram e torceram grandiosamente para que tudo saísse bem.

E a ti, amada Mãe, por preparar-nos tão cuidadosamente para a vida.

## ÍNDICE

<b>LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	x
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	xiii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	xv
<b>RESUMO.....</b>	xvi
<b>ABSTRACT.....</b>	xvii
<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 – Qualidade.....	01
1.2. Controle de Qualidade.....	02
1.3 Biofármacos.....	03
1.4 - Histórico Biofármacos.....	10
1.5 – Interferons.....	11
1.5.1 - Hepatite C.....	14
1.6 - História da Febre e do Pirogênio.....	15
1.7 – Endotoxinas.....	17
1.7.1 - Efeitos das Endotoxinas no Organismo e Mecanismo da Febre.....	20
1.7.2 - Teste de Pirogênio <i>in vivo</i> .....	22
1.7.3 - Ensaio de Ativação de Monócitos.....	24
1.8 - Estrutura do LPS, Função e Atividade.....	26
1.9 - Limulus Amebocyte Lysate (LAL).....	28
1.9.1 - LAL na Indústria Farmacêutica.....	31
1.9.2 - Métodos de LAL.....	33
1.10 - Validação de Método para Detecção de Endotoxinas Bacterianas.....	34
1.10.1 - Descrição da amostra.....	35
1.10.2 - Limite de Endotoxina.....	35
1.10.3 - Validação dos Experimentos.....	35
1.10.4 - Influência do pH.....	35
1.10.5 - Perfil de Compatibilidade.....	36
1.10.6 Validação de 03 lotes.....	37
1.10.7 - Relatório de Validação.....	38
<b>2 – OBJETIVO .....</b>	<b>39</b>
2.1 – Objetivo Geral .....	39
2.2 – Objetivos específicos .....	39
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>

3.1. Amostras de Alfainterferona 2b Humana Recombinante.....	40
3.2. Reagente Limulus Amebocyte Lysate (LAL).....	40
3.3. Endotoxina Padrão.....	41
3.4. Ferramenta de Informática .....	42
3.5. Ensaio RSE/CSE.....	42
3.6. Água apirogênica.....	43
3.7. Condições de Armazenamento das Amostras.....	43
3.8. Medidas de pH.....	44
3.9. Outros Materiais utilizados na Padronização.....	44
3.10. Método Gel Clot.....	45
3.10.1. Preparo do Reagente LAL.....	45
3.10.2. Controle positivo e Curva padrão.....	45
3.10.3. Cálculo do MDV (máxima diluição válida do produto).....	46
3.10.4. Reconstituição e diluição das amostras de alfainterferona.....	46
3.10.5. Análise de Interferentes.....	47
3.10.6. A reação.....	47
3.10.7. Leitura e interpretação.....	47
3.10.8. Critérios de Aceitação do teste.....	47
3.10.9 Ensaio de Validação.....	48
3.10.10. Cálculo da concentração de endotoxina na amostra-teste.....	48
3.11. Método Cinético-Cromogênico.....	48
3.11.1. Reconstituição da Endotoxina padrão.....	49
3.11.2. Preparo da Curva-Padrão.....	49
3.11.3. Cálculo da Máxima Diluição Válida (MDV).....	50
3.11.4. Reconstituição e diluição das mostras de alfainterferona.....	50
3.11.5. Análise de interferentes.....	51
3.11.6. Reação.....	51
3.11.7. Leitura e interpretação.....	52
3.11.8. Ensaio de Validação.....	52
3.11.9. Critérios de Aceitação.....	53
3.11.10. Comparações com o teste de pirogênio <i>in vivo</i> .....	53
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
4.1 Quantificação dos níveis de endotoxinas no Ingrediente Farmacêutico ativo (IFA) – Pré-Validação.....	54
4.1.1 Verificação do pH.....	54

4.1.2 Verificação da Interferência em IFA.....	55
4.1.3 Verificação da Repetibilidade.....	56
4.1.4 Análise através de medidas de tendência central e variação (média, amplitude, desvio-padrão e coeficiente de variação).....	57
4.2 Validação pelo Método Gel-Clot para produto acabado – 3 MUI.....	59
4.2.1 Teste para confirmação da sensibilidade ( $\lambda$ ) e precisão intermediária entre analistas 1 e 2.....	60
4.2.2 Teste para Fatores de Interferência e Precisão .....	60
4.2.3 Sensibilidade e Validação.....	63
4.3 Validação pelo Método Cinético-Cromogênico para o Biofármaco alfainterferona 2b humano recombinante 3 MUI e 10 MUI.....	64
4.3.1 Teste de Linearidade.....	64
4.3.2 Teste de Exatidão.....	66
4.3.3 Teste de Repetibilidade do Método.....	68
4.3.4 Precisão Intermediária variando dia.....	69
4.3.5 Precisão Intermediária variando analistas.....	70
4.3.6 Repetibilidade do Sistema.....	71
4.3.7 Teste de Pirogênio <i>in vivo</i> .....	73
<b>5- CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>
<b>7 – ANEXOS.....</b>	<b>83</b>

## LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\Sigma$	Somatório
°C	Graus Celsius
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\lambda$	Lambda
$\mu$ l	Microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucléico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARN	Ácido Ribonucléico
BET	<i>Bacterial Endotoxin Test</i>
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
CBER	<i>Center for Biologics Evaluation and Research</i>
CD 14	Molécula de superfície de Células
Core	Área Conservada
CPP	Controle positivo do produto
CSE	Controle Padrão de Endotoxina
CV	Coeficiente de variação
Da	Dalton
DTP	Difteria, Tétano e Pertussis
DT	Difteria e Tétano
DTaP	Difteria, Tétano antígeno particulado
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EL	Limite de Endotoxina
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EP	Pirogênio Endógeno
EU/Kg	Unidades de endotoxina por Quilograma
EU/mg	Unidades de endotoxina por miligrama
EU/mL	Unidades de Endotoxina por mililitro
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FNT- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa

HCl 1N	Ácido clorídrico 1 Normal
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
IFN	Interferon
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
INCQS	Instituto Nacional de Controle em Qualidade de Saúde
IPT	<i>In Vitro</i> Pyrogen Test
Kd	Kilodalton
kg	Quilograma
LAMEV	Laboratório de Metrologia e Validação
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
LE	Limite de endotoxina
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Metro
MDV	Máxima diluição válida
mg	Miligrama
mg/ml	Miligrama por mililitro
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mL	Mililitro
MNC	Célula Mononuclear
MUI	Milhões de Unidades Internacionais
N	Normal
ng/kg	Nanograma/quilo
NK	<i>Natural Killer</i>
Nm	Nanômetro
OAS	Ologoadenilatosintetase
pH	Potencial de Hidrogênio
PKR	Fosfofrutoquinase
PLL	Proteína de ligação-LPS
PMB	Polimixina B
pNa	p-nitroanilina
PPC	<i>Positive product control</i>
PSS	Sensibilidade Específica do Produto

R	Coeficiente de correlação da curva-padrão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rhIFN- $\alpha$ 2	Interferon Alfa 2b Humano Recombinante
RSE	Referência de Endotoxina
SPL	<i>Sample</i>
SEBIO	Setor de Controle Biológico
SETBI	Seção de testes moleculares e imunocitoquímica
SRE	Sistema Retículo Endotelial
THP-1	<i>Human acute monocytic leukemia cell line</i>
TLK4	<i>Tool like receptor 4</i>
UE/mL	Unidade de endotoxina por mililitro
UE/ng	Unidade de endotoxina por nanograma
EU/UI	Unidade de endotoxina por unidade internacional
UI	Unidades Internacionais
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
VHC	Vírus da Hepatite C
WFI	<i>Water for injections</i>
Spike	<i>Amostra aditada com concentração conhecida</i>
LBP	<i>LPS binding protein</i>

## ÍNDICE DE TABELAS

1.1 - Comparação do tamanho de um medicamento químico e biofármaco.....	07
1.2 - Substâncias bacterianas pirogênicas e seus testes.....	18
1.3 - Métodos para detecção de pirogênios.....	25
1.4 - Histórico e Evolução do teste de LAL.....	33
1.5 - Perfil de pH.....	36
1.6 - Perfil de compatibilidade para contraste do produto com LAL.....	37
3.1 - Relação de lotes de IFA e produto acabado.....	40
3.2 - Lotes de reativo LAL dos ensaios de pré-validação e validação.....	41
3.3 - Equipamentos e materiais acessórios.....	45
3.4 - Curva padrão de endotoxina.....	45
3.5 - Diluição das amostras de alfainterferona conforme MDV.....	47
3.6 - Parâmetros da Validação para o método do gel-clot.....	48
3.7 - Construção da Curva-Padrão.....	49
3.8 - Cálculo do MDV para o método cinético-cromogênico.....	50
3.9 - Diluição das amostras de alfainterferona.....	51
3.10 - Parâmetros de validação do método cinético-cromogênico.....	53
4.1 - Perfil de pH das amostras de IFA.....	54
4.2 - Perfil de Compatibilidade de amostras de IFA.....	55
4.3.1 - Repetibilidade do sistema numa mesma diluição lote 01IFA0602.....	56
4.3.2 - Repetibilidade do sistema numa mesma diluição lote 01IFA0603.....	56
4.3.3 - Repetibilidade do sistema numa mesma diluição lote 01IFA0605.....	57
4.3.4 - Repetibilidade do sistema numa mesma diluição lote 01IFA0702.....	57
4.4 - Análise estatística dos resultados.....	58
4.5 - Teste para confirmação de $\lambda$ analista 1.....	60
4.6 - Teste para confirmação de $\lambda$ Analista 2.....	60
4.7 - Verificação da interferência e precisão - analista 1 dia 01.....	61
4.8 - Perfil de endotoxina nos lotes de produto acabado.....	62
4.9 - Verificação da interferência e precisão - analista 2 dia 02.....	63
4.10 - Curva de amostras de produto acabado 3 MUI – analista 1.....	63
4.11 - Curva de amostras de produto acabado 3 MUI – analista 2.....	64
4.12 - Resultados dos testes de linearidade.....	65
4.13 - Resultados de linearidade emitidos pelo software ENDOSCAN.....	66

4.14 - Resultados do teste de exatidão.....	67
4.15 - Repetibilidade do Método em 3MUI.....	68
4.16 - Repetibilidade do Método em 10MUI.....	69
4.17 - Dados de Precisão Intermediária variando dia.....	70
4.18 - Estatística da Precisão Intermediária variando dia para 3 MUI.....	70
4.19 - Precisão intermediária entre analistas 1,2 e 3 para 3MUI.....	71
4.20 - Precisão intermediária entre analistas 1 e 2 para 10MUI.....	71
4.21 - Repetibilidade do Sistema lote 076BIA003Z.....	72
4.22 - Repetibilidade do Sistema lote 04UBIA008Z.....	72
4.23 - Repetibilidade do Sistema lote 04UBIC001Z.....	72
4.24 - Repetibilidade do Sistema lote 066BIC001Z.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

1.1 - Biofármacos Produzidos em Bio-Manguinhos.....	03
1.2 - Produção de Proteínas Recombinantes.....	05
1.3 - Estrutura do Interferon Alfa.....	11
1.4 - Importância dos biofármacos na qualidade de vida das pessoas.....	14
1.5 - Classificação dos pirogênios.....	20
1.6 - Mecanismo da febre.....	21
1.7 - Ação do LPS sobre CD 14 e TLR4 e liberação de citocinas pró- inflamatórias.....	22
1.8 – Teste de pirogênio <i>in vivo</i> .....	23
1.9 - Macrófagos arredondados e alongados ativados expostos a LPS.....	24
1.10 - Estrutura do LPS.....	27
1.11 - Parede Celular de Bactéria Gram Negativa.....	27
1.12 - <i>Limulus polyphemus</i> .....	29
1.13 - Gel característico de Positividade.....	29
1.14 - Cascata de Ativação da Proenzima por Endotoxina liberando pNA no ensaio cinético.....	29
1.15 - Cascata de reações bioquímicas que ocorrem na coagulação pelo LPS	30
3.1 – Exemplo de uma curva cinética emitida pelo software Endoscan.....	43
3.2 - Modelo de placa cinética.....	52
4.1 - Variabilidade das amostras.....	58

## RESUMO

Nos últimos anos, as farmacopéias e principais agências regulatórias para produtos farmacêuticos e biofarmacêuticos exigem cada vez mais em suas monografias a aplicação do método para detecção de endotoxinas bacterianas pelo lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) no controle de pirogênio de produtos terminados parenterais. O objetivo do presente estudo foi padronizar e validar o ensaio de LAL para o biofármaco alfainterferona 2b humana recombinante, produzido em *E. coli*. Foram empregados os métodos Gel-Clot e Cinético-Cromogênico (semiquantitativo e quantitativo, respectivamente). Para o método Cinético-Cromogênico, a máxima diluição válida (MDV) foi calculada para cada apresentação com base na concentração do produto e a sensibilidade do teste (3 MUI, MDV: 1:3.888 e 10 MUI, MVD: 1:12.962). Diluições seriadas abaixo da MDV foram avaliadas em triplicata para a verificação dos interferentes, sendo eleitas as diluições de 1:80 e 1:100 que exibiram a melhor recuperação no controle positivo do produto. Para o ensaio Gel-Clot na apresentação de 3 MUI (MDV: 1:17) foi estipulada a diluição de 1:8 para a validação dos testes de rotina. Durante a validação dos ensaios, foi utilizada uma curva-padrão de endotoxina nas concentrações de 0,005 – 50 EU/ml e avaliados o seu coeficiente de correlação (R) e o desvio-padrão relativo. Os critérios de desempenho do método cinético (linearidade, especificidade, exatidão, repetibilidade, reprodutibilidade) foram atendidos de acordo com os parâmetros farmacopéicos e regulatórios (ANVISA e FDA), garantindo desta forma a robustez necessária para que o método de LAL possa ser incluído nos ensaios de rotina do Laboratório de Controle de Qualidade.

## ABSTRACT

In recent years, the Pharmacopean, technical reports and international guides for pharmaceuticals products requires each time more in their monographies the application of *Limulus Ambocytes Lysate* endotoxins assay (LAL) for release and pyrogen control in parenteral finished products. The objective of this study was the standardization and validation of the LAL test for the human recombinant biopharmaceutical interferon alpha 2b, produced in *E. coli*, were used Gel-Clot and Chromogenics Kinetic methods (semi-quantitative and quantitative). In the case of Chromogenics method test, the maximum valid dilution (MDV) was calculated for each presentation based on the concentration of product (3 MUI, MDV: 1:3,888 and 10 MUI, MVD: 1:12,962), serial dilutions under the MDV (1:80) were evaluated in triplicate to detect interferences. For the gel-clot test for the 3 MUI presentation (MDV: 1:17) 1:8 dilution was set for interferences detection test. For tests' validation, several dilutions were performed using standard endotoxin concentrations in 0,005 to 50 EU / ml to confirm the criteria for the methods performance (linearity, specificity, accuracy, reply, reproducibility). The results of validation showed that all pharmacopeia and regulatory parameters (ANVISA) studied, are compatible with the MDV used for each studied presentation of the human recombinant biopharmaceuticals interferon alpha 2b and may be used in quality control.

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 Qualidade

Nesta última década, marcada pelo fenômeno da globalização, tem-se registrado um avanço sem precedentes na evolução da competitividade e, conseqüentemente, na busca de produtividade e eficiência nas atividades empresariais. Em todo o mundo industrializado verifica-se um esforço grandioso para o aperfeiçoamento da qualidade dos produtos e processos.

Neste contexto, existem diversas definições para o termo qualidade, o que torna impossível ter-se uma postura em definitivo para o consensual do termo qualidade. No entanto, encontramos a qualidade em vários segmentos, seja no trabalho, em casa, na produção de bens ou na prestação de serviços. Enfim, em qualquer atividade humana, a qualidade tornou-se um fator essencial.

Qualidade é um conceito subjetivo que está relacionado diretamente às percepções de cada indivíduo. Diversos fatores como cultura, modelos mentais, tipo de produto ou serviço prestado, necessidades e expectativas influenciam diretamente nesta definição.

Falconi (1992) sintetiza o conceito de qualidade nos seguintes termos: “um produto ou serviço de qualidade é aquele que atende perfeitamente, de forma confiável, de forma acessível, de forma segura e no tempo certo às necessidades do cliente”.

No que diz respeito aos produtos e/ou serviços vendidos no mercado, há várias definições para qualidade: "conformidade com as exigências dos clientes", "relação custo/benefício", "adequação ao uso", "valor acrescentado, que produtos similares não possuem"; "produtos e/ou serviços com efetividade". Enfim, o termo é geralmente empregado para significar "excelência" de um produto ou serviço (Falconi, 1992).

A qualidade de um produto ou serviço pode ser considerada sob duas ópticas: a do produtor e a do cliente. Do ponto de vista do produtor, a qualidade se associa à concepção e produção de um produto que vá ao encontro das necessidades do cliente. Do ponto de vista do cliente, a qualidade está associada ao valor e à utilidade reconhecida ao produto, estando em alguns casos ligada ao preço (Falconi, 1992).

De forma geral, tem ocorrido um importante avanço na relação entre as empresas e a sociedade. Estamos presenciando a mudança de um mercado regido pela indústria para um mercado dirigido pelo consumidor. Outrora, as empresas ditavam aos consumidores o que deviam comprar. Entretanto, na atualidade, os regulamentos

normativos exigem que as empresas fabriquem produtos adequados e, em paralelo, ajam de forma socialmente responsável, gerenciando seus processos e atividades de maneira a não agredir ou comprometer o meio ambiente e/ou o bem estar e a saúde de seus colaboradores e da comunidade.

## 1.2 Controle de Qualidade

Podemos conceituar o Controle de Qualidade como um conjunto sistemático de análises destinadas a avaliar se um produto cumpre com as especificações estabelecidas, visando comprovar a qualidade ao longo do processo fabril até a obtenção do produto final. Desta forma, o controle de qualidade estabelece as especificações, padroniza e valida os métodos analíticos, com base em padrões de referência, retém e armazena amostras de lotes aprovados e liberados para possíveis rastreamentos.

A evolução do Controle de Qualidade de uma indústria biofarmacêutica se faz extremamente importante com o avanço das técnicas biotecnológicas, impactando diretamente nas atividades de rotina do laboratório, pois é necessário aprimorar técnicas cada vez mais compatíveis com a natureza dos produtos fabricados, possibilitando-nos assegurar que os mesmos encontram-se dentro das especificações estabelecidas. Por isso, a ciência avança, passo a passo, criando e viabilizando métodos mais específicos para acompanhar os sistemas de produção e controle de qualidade.

Em se tratando de saúde pública, a ética, o rigor, a responsabilidade no controle dos produtos e a capacitação de profissionais são fatores extremamente importantes para o aprimoramento tecnológico dos sistemas de produção e controle de qualidade no setor público, visto que estes contribuem para o desenvolvimento científico do país.

Na indústria de produtos biológicos e biotecnológicos, desde a matéria-prima ao produto acabado, o Controle de Qualidade deve desempenhar seu papel, atuando ativamente em todas as etapas de produção, respeitando procedimentos operacionais, critérios de aceitação e datas-limite para a realização dos ensaios e liberação dos resultados.

Baseados nestes princípios éticos, Bio-Manguinhos, Unidade de Produção de Imunobiológicos, localizada na Fundação Oswaldo Cruz desenvolve e aprimora métodos de produção e controle, sendo atualmente um grande produtor/exportador de vacinas como: Febre Amarela, Poliomielite, vacina combinada contra *Haemophilus*

*influenzae* tipo B, DTP, meningite A e C, sarampo, caxumba e rubéola, além de produzir biofármacos e kits para diagnóstico, suprindo também as carências nacionais através de campanhas de vacinação junto ao Ministério da Saúde.

Em 2003, através do acordo com o governo cubano para transferência de tecnologia, Bio-Manguinhos passou a investir na indústria biofarmacêutica através dos biofármacos: Alfainterferona 2b Humana Recombinante (figura 1.1) nas apresentações 3MUI, 5MUI e 10MUI, e Alfaepoetina Humana Recombinante 2000UI e 4000UI, que são produzidos por técnicas de biologia molecular, oferecendo assim uma característica inovadora nos processos de produção.



**Figura 1.1:** Biofármacos Produzidos em Bio-Manguinhos  
Fonte: [www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=248](http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=248)

### 1.3 Biofármacos

Até a década de 70, o ADN era o componente celular mais difícil de ser analisado. Sua seqüência de nucleotídeos de enorme tamanho e monotonia química era geralmente analisada por meios indiretos como a seqüência de proteínas e análise genética. A partir da década de 70 novas tecnologias foram desenvolvidas permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos num processo chamado de clonagem

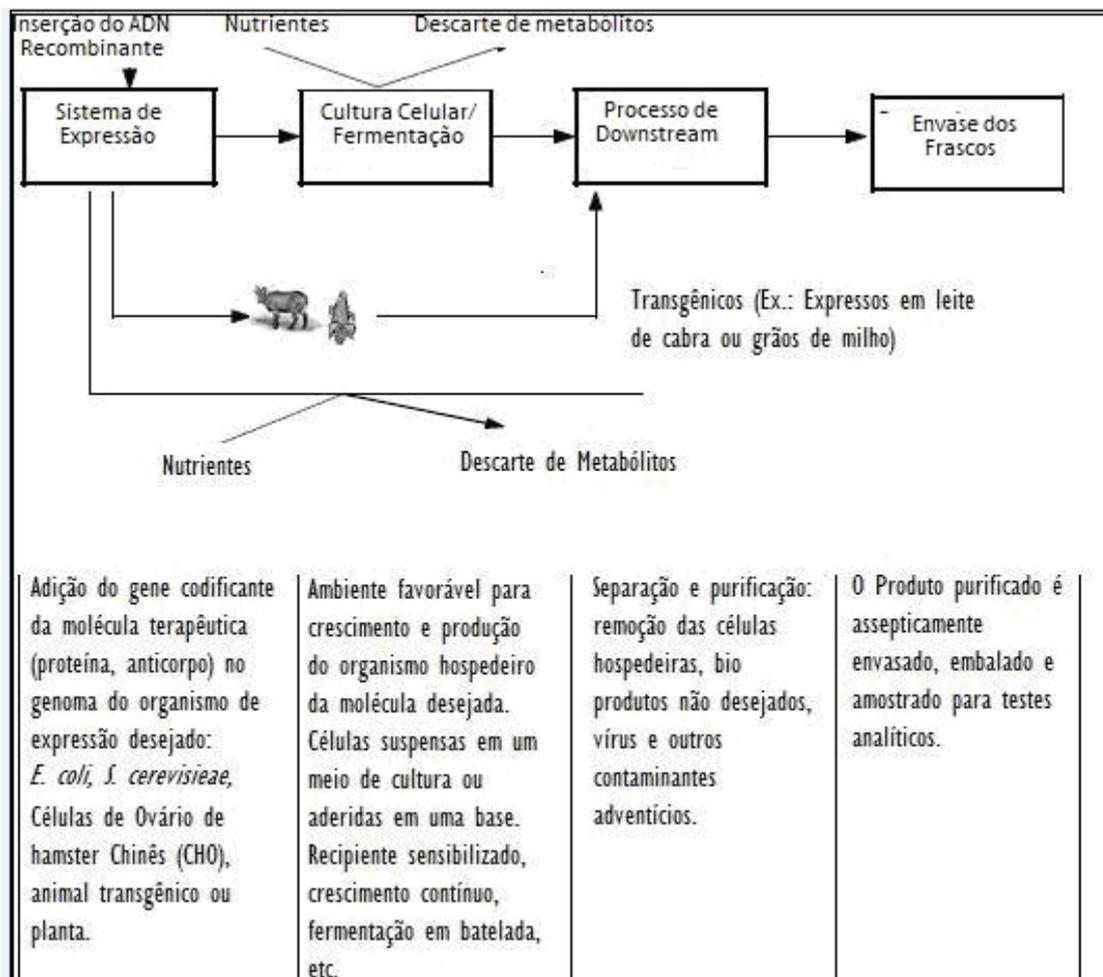
gênica. Na verdade, muitas destas técnicas são provenientes da Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Genética Microbiana e permitiram que a análise do ADN ganhasse um novo enfoque. O ADN tornou-se, então, uma molécula mais fácil de ser analisada, sendo possível isolar regiões específicas, obtê-las em grande quantidade e determinar a sua seqüência numa velocidade de milhares de nucleotídeos por dia (Watkins, 2002).

A tecnologia do ADN recombinante, como se convencionou denominar este conjunto de técnicas, tem uma ampla aplicação. Ela pode ser usada para estudar mecanismos de replicação e expressão gênica, na determinação da seqüência de um gene e conseqüentemente da proteína que ele codifica, ou no desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis, tais como a insulina humana, hormônio de crescimento, vacinas e enzimas industriais em grandes quantidades. Sua aplicação comercial ou biotecnológica parece ter um potencial inesgotável (Watkins, 2002).

As empresas de biotecnologia podem ser caracterizadas como empresas que utilizam técnicas e processos para o desenvolvimento de produtos ou serviços na obtenção de organismos geneticamente modificados, o aumento da produtividade agrícola, a melhoria de processamento alimentar, a utilização de recursos energéticos renováveis, aplicações ambientais, para a obtenção de princípios ativos, fármacos, e intermediários para a indústria farmacêutica e de química fina (Watkins, 2002).

As principais aplicações da biotecnologia moderna na área de saúde são o uso da engenharia genética para a produção de biofármacos (por exemplo: insulina, hormônio do crescimento e interferon), de vacinas (vacinas recombinantes contra hepatite B) e os estudos genômicos para prevenção e cura de diversas doenças (terapia gênica e farmacogenômica) (Werner, 2004).

Os biofármacos são medicamentos biológicos de última geração obtidos pelo emprego industrial de microorganismos ou células modificadas geneticamente (pela tecnologia do ADN recombinante), crescidas em reatores, para a produção de determinadas proteínas que são idênticas ou muito parecidas com as proteínas humanas. A figura 1.2 exhibe as etapas básicas a produção de proteínas recombinantes.



**Figura 1.2:** Produção de Proteínas Recombinantes. Adaptado de Williams, 2007

Os biofármacos são produtos gerados por clonagem molecular e expressos em grandes quantidades em células bacterianas ou células de mamíferos em cultivo, entre outros. A indústria dos biofármacos passou por uma etapa de crescimento e desenvolvimento convertendo-se rapidamente em um setor estratégico em nível financeiro e social em vários países e regiões do mundo e hoje representam cerca de 84 biomedicamentos de uso geral na medicina. Cerca de 60 milhões de pacientes no mundo se beneficiam com estes medicamentos que excedem a 12 bilhões de dólares. Mais ou menos 500 biofármacos estão em ensaios clínicos, assegurando o crescimento deste setor. Os principais focos são para o tratamento do câncer, enfermidades infecciosas e cardiovasculares. Uma das etapas mais críticas no desenvolvimento de um biofármaco protéico é estabelecer os parâmetros intrínsecos e extrínsecos de estabilidade física e química, como: desaminações, oxidações, desglicosilações, ruptura, pontes de sulfeto, hidrólises, etc. A identificação destes fatores permite desenhar proteínas mais seguras e estáveis (Werner, 2004).

O primeiro passo para desenvolver um biofármaco consiste em modificar geneticamente uma célula ou microorganismo pela introdução de uma seqüência de

ADN que produza a proteína escolhida. A célula ou microorganismo é conservado e réplicas dele serão cultivadas durante o processo de manufatura. Feito a partir de certas condições de crescimento inicia-se a recuperação da proteína, junto de todas as outras proteínas e resíduos celulares, que são remanescentes do meio de cultivo. Depois, esse extrato passa para a etapa de purificação - que implica vários passos e utilizam uma diversidade de operações unitárias e processos - até atingir o componente ativo para o qual cada fabricante define os testes que garantem a pureza. Por último, o concentrado protéico é filtrado, estabilizado e formulado. A partir daí são realizados os ensaios clínicos para o tratamento terapêutico. Para obter a indicação terapêutica desejada, é importante garantir que o produto seja resultante de um processo validado e amplamente controlado ao longo de todas as fases (EuropaBio, 2005).

Quando comparado às drogas sintéticas – pequenas moléculas - as proteínas terapêuticas possuem alta especificidade e atividade em concentrações baixas, o que reduz o potencial conhecido de toxicidade. (Chuan e Robinson, 2001).

Os métodos atuais de descobertas de drogas e produção são invariavelmente baseados na era genômica e proteômica, nas quais partiram do seqüenciamento de mais de 297 genomas de microorganismos e, mais recentemente, todo o genoma humano. Existem duas áreas da genômica, a estrutural e a funcional. A genômica estrutural consiste na construção de mapas genéticos de alta resolução para organismos específicos, e a genômica funcional envolve a coleta de dados gerados no genoma estrutural para explorar o funcionamento do mesmo, particularmente as causas da doença. O termo “proteômica” foi utilizado primeiramente em 1995 para descrever e caracterizar todas as proteínas de uma célula ou organismo, conferindo assim o seu proteoma (Graves, 2002).

Devido à relevância do controle de processo associado com a produção de biofármacos e materiais derivados de biotecnologia, grande atenção e cuidados devem estar voltados para a necessidade de um monitoramento, incluindo conteúdo genético do sistema de expressão, partículas virais, expressão de genes retrovirais endógenos e outros agentes adventícios microbianos (micoplasmas, etc). As regulamentações para produtos biológicos são necessariamente rigorosas, requerendo a permissão do FDA para a liberação de todo lote fabricado. Os tipos de preocupações envolvidas nos processos de fabricação devem ser pesquisados e emitidos ao CBER (Center for Biologics Evaluation and Research) (FDA, 1997).

Como já foram citados anteriormente, os biofármacos são biomoléculas obtidas pelo emprego industrial de microorganismos ou células modificadas geneticamente para

a produção de determinadas proteínas de aplicação terapêutica (Interferon, Eritropoetina, Insulina, etc). Esta tecnologia permite reproduzir proteínas idênticas às naturais e também elaborar outras totalmente novas, com maior atividade biológica, maior vida média e redução de efeitos colaterais. A tabela 1.1 faz uma comparação de alguns produtos químicos e biomedicamentos em relação ao seu peso molecular, expresso em Daltons (Roche, 2007).

**Tabela 1.1:** Comparação do tamanho de um medicamento químico e biofármaco.  
Fonte: EuropaBio,2005

<b>Produto químico</b>	<b>Peso molecular (Daltons)</b>	<b>Biofármaco</b>	<b>Peso molecular (Daltons)</b>
Prozac®	166	Intron-A®	19.625
Paxil®	375	ReoPro®	47.615
Claritin®	383	Enbrel®	75.000
Zocor®	419	Rituxan®	145.000

As companhias farmacêuticas desenvolvem produtos cujos componentes ativos são obtidos por sínteses químicas ou sintetizados por organismos vivos, que na sua maioria são proteínas. Os medicamentos biotecnológicos ou biofármacos são substâncias terapêuticas homólogas ou que interagem com as proteínas humanas. Sua estrutura molecular é extremamente complexa e, além disso, o componente ativo é heterogêneo. Estas moléculas são difíceis de serem caracterizadas e replicadas (Federación Latinoamericana de la Industria Farmacêutica, 2006).

Os biofármacos são elaborados utilizando matéria-prima procedente de duas origens:

- Componente ativo de origem biológica: extraído de microorganismos, órgãos e tecidos de origem vegetal ou animal, células ou fluidos de origem humana ou animal.
- Componente ativo de origem biotecnológica: em geral, são proteínas obtidas a partir de células modificadas geneticamente.

A escolha do vetor de expressão também constitui etapa importante no processo de produção de biofármacos, pois os mesmos estão presentes em diversos tipos celulares. Uma vez que um bacteriófago ou outro vetor que contenha o gene de interesse é preparado, uma quantidade ilimitada do gene purificado pode ser obtida pela multiplicação celular do vetor em um sistema hospedeiro específico e posterior extração do ADN. Os vetores também podem carrear moléculas de ADN recombinante em processos de fermentação, células vegetais superiores e células humanas. Os microbiologistas industriais utilizam a engenharia de bactérias e outros tipos celulares

facilmente cultiváveis para obtenção de proteínas de uso terapêutico, na agricultura e pesquisa (Darnell, 1990).

A expressão e a obtenção de proteínas recombinantes têm aumentado significativamente nos últimos anos a produção de proteínas biologicamente ativas. Esta tecnologia inclui processos de *upstream* (a montante), como fermentação, e *downstream* (a jusante) com etapas de purificação, com o intuito de se produzir proteínas em hospedeiros como a *Escherichia coli*. Neste processo, são detectadas impurezas oriundas, respectivamente, do processo fermentativo (componentes extracelulares e da lise celular) e do próprio produto (proteínas celulares do microorganismo), tornando a purificação um grande desafio. Dentre as impurezas inerentes ao extrato bruto dos microrganismos estão relacionados fragmentos da própria célula hospedeira, endotoxinas e ácidos nucleicos (ADN e ARN). Conseqüentemente, o desenho do processo para purificar o produto desejado, a fim de se obter uma proteína com altos padrões qualitativo e quantitativo, é uma tarefa fundamental. Antes da inicialização da escala de produção, o processo deve ser otimizado e caracterizado em cada etapa para que se obtenha um produto seguro e de alta qualidade (Mosaabadi, 2006).

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas ou células de animais constitui uma etapa complexa do processo, quando consideradas as variadas características dos meios de cultivo e das biomoléculas de interesse tais como ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormônios, aminoácidos, peptídeos e proteínas. Dentre as características dos meios, podemos citar a elevada proporção de água, a presença de moléculas orgânicas e inorgânicas constituintes do meio de cultura, metabólitos extracelulares distintos da molécula que será purificada, bem como metabólitos intracelulares oriundos de células mortas e fragmentos celulares. Como resultado das variáveis descritas, as etapas de purificação são tão ou mais desafiadoras do que o estudo e o desenvolvimento da etapa de cultivo, pois não há processo sem purificação de aplicação geral. No entanto, a purificação pode ser dividida em quatro etapas genéricas: separação das células e seus fragmentos de meio de cultivo (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução; purificação de alta resolução; e, finalmente, operações para acondicionamento final do produto (Júnior, 2008).

Os biofármacos ao serem produzidos por organismos vivos são inerentemente variáveis. Por isso, qualquer mudança no processo de manufatura, por menor que seja, muda os parâmetros de fabricação, equipamentos, ingredientes, dentre outros. Toda

mudança no processo, caso necessário, deve ser novamente avaliada pelas agências regulatórias por meio de um complexo processo de comparabilidade com o processo anterior e que sempre deve considerar, em alguns casos, novos ensaios complementares (Roche, 2007).

Para garantir a consistência nas características dos produtos finais, e os perfis de segurança e eficácia, a fonte do material, os processos de manufatura, a formulação e as condições de armazenamento devem ser cuidadosamente seguidas e controladas, cumprindo as estritas exigências das boas práticas de fabricação (BPF) específicas para os produtos biotecnológicos, que incluem:

- Produção do princípio ativo por biotecnologia;
- Isolamento e purificação do princípio ativo;
- Desenvolvimento e validação do processo de fabricação consistente em todas as suas etapas;
- Análise do produto final;
- Comprovação com eficácia e segurança do medicamento através da realização de ensaios clínicos durante o desenvolvimento do produto (Federación Latino-americana de la Industria Farmacêutica, 2006);

Geralmente as companhias desenvolvem padrões e ensaios específicos para cada medicamento biológico. Devido à variabilidade inerente de obtenção (processo/purificação), é de se esperar que os processos de manufatura variem dependendo do fabricante do produto, porém os ensaios e especificações de controle de qualidade do produto final devem ser mantidos e seguidos rigorosamente de acordo com a legislação estabelecida (Roche, 2007).

Para um produto obtido por síntese química, composto de uma molécula menor, alguns ensaios de bioequivalência com o produto original poderão ser suficientes. Entretanto, para demonstrar a bioequivalência de um biofármaco, precisa-se de muito mais rigor. Para estabelecer as diferenças entre os processos de produção do produto original e um similar (com um nível de certeza razoável), de modo a não afetar a segurança, qualidade e/ou eficácia para os pacientes, não basta somente ter experiência na produção, também se requer controles restritos durante o processo de manufatura, como ensaios de toxicidade, farmacocinética *in vivo*, farmacodinâmica e, essencialmente, ensaios de imunogenicidade (resposta adversa do organismo a substâncias estranhas), além dos outros ensaios clínicos de segurança e eficácia necessários em cada caso (Roche, 2007).

## 1.4 Histórico dos Biofármacos

O primeiro medicamento desenvolvido via técnica de biologia molecular foi a insulina humana, por Eli Lilly, EUA, 1982, a qual foi aprovada para comercialização nos Estados Unidos em 1984, com o nome “Humulin”. A primeira vacina recombinante contra a Hepatite B e a primeira terapia de anticorpo monoclonal contra rejeição de transplantes de fígado foi lançada em 1986. Em 2004, a FDA tinha outorgado sua aprovação para comercialização de 100 produtos biológicos. Atualmente, estima-se que 1/5 do total de remédios que saem para o mercado a cada ano são derivados de processos biotecnológicos (Roche, 2007).

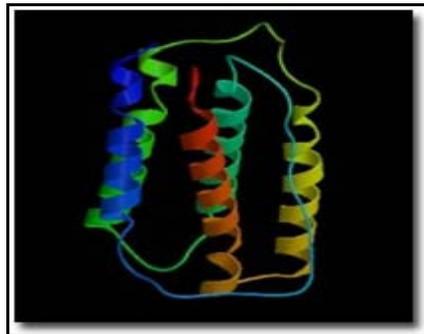
O primeiro teste baseado em ácidos nucleicos, bem delineado e aceito para uso pelo Food and Drug Administration (FDA) foi o Gen-Probe Pace em 1988, para detecção de *Chlamydia* e gonococos utilizando a hibridização de ácidos nucleicos (Gen-Probe Inc. 2007). Nos anos subsequentes, testes baseados na amplificação de ácidos nucleicos foram desenvolvidos para detectar virtualmente todos os bioagentes clinicamente relevantes. As vantagens dos testes baseados em ácidos nucleicos sobre os métodos microbiológicos incluem a precisão de resultados aliada aos baixos níveis de detecção (teoricamente uma única célula) e detecção alvo-específica. Devido à alta sensibilidade dos testes baseados na amplificação de ácidos nucleicos, a prevenção de eventuais contaminações, assim como a inserção de controles de reação deve ser sempre implementada (Mothershed e Whitney 2006).

Os biofármacos mais importantes são:

- Fatores sanguíneos como fator VIII e IX: utilizados como fator de coagulação para hemofilia tipos A e B.
- Agentes tromboembólicos ativadores dos tecidos plasminogênicos: utilizados para condições associadas à trombose e embolias.
- Hormônios: como a insulina (utilizada para diabete), o hormônio do crescimento e as gonadotrofinas.
- Fatores de crescimento hematopoiéticos como a eritropoietina: são fatores relacionados com a produção de glóbulos vermelhos utilizados no tratamento das anemias causadas por falha renal crônica ou pela quimioterapia para o câncer.
- Interferons  $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$  : são proteínas naturais produzidas pelas células do sistema imunológico em resposta à ameaça de agentes como vírus, bactérias,

parasitas e tumores. São utilizados para tratar condições como a esclerose múltipla, câncer sistêmico hepatite C e leucemia (figura 1.3).

- Produtos baseados em Interleucina: utilizados para tratar doença de Crohn e a colite ulcerosa.
- Vacinas: para prevenção de várias doenças (Hepatite B).
- Anticorpos Monoclonais: são anticorpos idênticos porque são produzidos por tipos específicos de células imunes, a partir de uma célula mãe única (monoclonal). São utilizados para tratar uma ampla variedade de doenças (Rituximab – tratamento de linfoma não-Hodgkin – Trastuzumab “Herceptin®” – tratamento do câncer de mama).
- Outros produtos: enzimas terapêuticas e fatores de necrosamento de tumores, utilizados para doenças autoimunes como artrite reumatóide, a doença de Crohn e muitos outros.



**Figura 1.3:** Estrutura do Interferon alfa.

Fonte: [www.flamel.com](http://www.flamel.com)

## 1.5 Interferons

Os interferons foram a primeira família de citocinas descobertas. Em 1957, pesquisadores observaram que células animais suscetíveis à exposição viral se tornavam resistentes à infecção por outros vírus. Esta resistência foi induzida por uma substância secretada por células infectadas por vírus, chamada de “Interferon” (IFN). Subseqüentemente, muitas espécies têm mostrado a existência de uma grande faixa de interferons. Os interferons do tipo I compreendem o  $\alpha$  (produzido pelos macrófagos) e o  $\beta$  (produzido pelos fibroblastos) e o tipo II compreende o interferon  $\gamma$  (produzido pelas células T ativadas e células NK). As citocinas compõem um grupo diversificado de proteínas regulatórias ou glicoproteínas, porém sua classificação permanece ainda

pouco clara. Estas moléculas são normalmente produzidas pelo organismo em quantidades adequadas para uma resposta imediata à infecção viral. Elas atuam como comunicadores químicos entre várias células, induzindo seus efeitos por ligação a receptores de superfície celular específicos, desencadeando vários eventos de sinais transduccionais (Walsh, 2007).

Isaacs e Lindenmann relataram em 1957 que células de pinto infectadas com vírus Influenzae, produziram um “fator secretado” que mediou a resistência destas células contra os vírus homólogos e heterólogos. Esta observação, associada às pesquisas de Nagamo e Kojima, em 1958, iniciou um estágio de estudos subseqüentes que levaram à elucidação do sistema interferon em maiores detalhes. O vírus são indutores de interferons e sensíveis às ações antivirais dos mesmos. Alguns vírus também codificam produtos que antagonizam a resposta antiviral, o que se torna uma estratégia para que o vírus não seja eliminado. As proteínas do tipo interferon exibem atividades tanto autócrinas como parácrinas (Samuel, 2001).

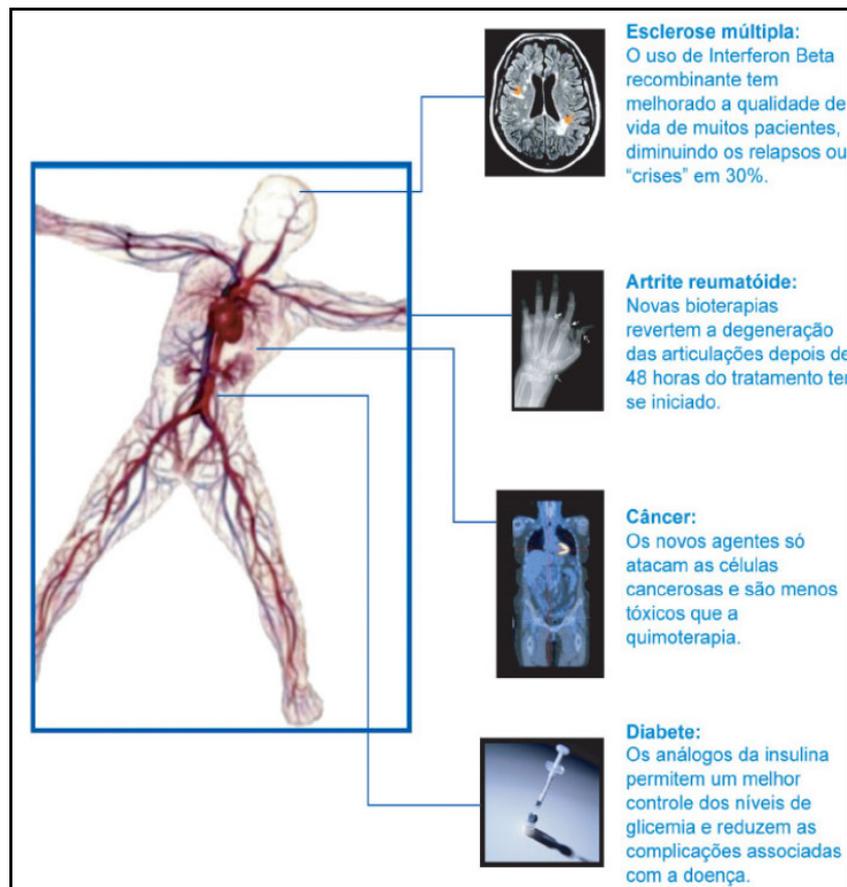
Segundo Samuel (2001), grande progresso tem sido observado para um melhor entendimento da ação antiviral dos interferons em nível molecular, assim como as estratégias que os vírus têm desenvolvido para antagonizar estas ações. Afirmou que “as ações dos interferons são pleiotrópicas e afetam muitos processos biológicos na replicação viral. As respostas de indução e ação dos interferons diferem quantitativamente e qualitativamente, e são dependentes da cepa viral, do tipo de célula hospedeira infectada e do tipo de interferon. Enzimas como PKR (fosfofrutoquinase), OAS (oligoadenilatosintetase), Rnase L e a proteína Mx (gtpase) estão entre as moléculas que mais contribuem para a realização de um estado antiviral. Entretanto, uma grande quantidade de genes tem sido identificada por análise em técnica de microarranjo, onde a expressão dos mesmos é alterada na resposta pelo tratamento com interferon e infecção viral. No animal infectado com vírus, ocorre uma resposta imune celular elevada mediada pela expressão do MHC de classe I e II, induzidos por interferon alfa, beta e gama, o que pode contribuir significativamente para uma resposta antiviral total”. O uso do sistema interferon em estudos de interação vírus-hospedeiro, ambos em cultura celular e animal intacto, continua a promover grande contribuição para um melhor entendimento, não somente dos mecanismos da patogenia viral, mas também dos mecanismos de transdução de sinal e controle da transcrição e tradução de macromoléculas, que são importantes em muitas áreas da biologia celular de mamíferos e virologia.

Os interferons são produzidos por uma variedade de diferentes tipos celulares, e exibem uma ampla faixa de efeitos biológicos, incluindo:

- Indução de resistência celular a infecção viral;
- Regulação da resposta imune;
- Regulação do crescimento e diferenciação de muitos tipos celulares;
- Sustentação das fases primárias da gravidez em algumas espécies animais.

Ruiz (2003) cita os autores Zoon (1986), e Borden (1997), na seguinte afirmativa: os interferons têm mostrado uma grande atividade contra uma variedade de vírus de ARN e ADN, exibindo potentes efeitos antiinflamatórios (atua na regulação da atividade de células NK e na modulação da expressão de proteínas codificadas no MHC) e ainda possuem atividade antiproliferativa contra células malignas. Devido a esse grande espectro de atividades biológicas, muitos usos voltados para a terapêutica têm sido investigados. Em particular, o interferon alfa 2b humano recombinante (rhIFN-  $\alpha$ 2), produzido em cepas de microorganismos como *E.coli*, está sendo usado mundialmente para a terapia de várias doenças virais crônicas e câncer.

Como o modelo de expressão deste biofármaco é a *E.coli*, uma bactéria gram negativa que apresenta LPS em sua parede celular, reforça-se a necessidade de um controle ajustado e validado na detecção de resíduos de endotoxinas provenientes dos processos fermentativos. Este controle deve incluir o ingrediente farmacêutico ativo (IFA), o produto acabado a granel e o produto final, garantindo desta forma a eficácia do processo de purificação. A figura 1.4 ilustra o impacto dos biofármacos na qualidade de vida dos seres humanos.



**Figura 1.4:** Importância dos biofármacos na qualidade de vida das pessoas. (<http://www.roche.com.br/NR/rdonlyres/27273F4A-1D0B-4FE4-9DD2-8951FB89EE6E/6488/medicamentosbiologicos1.pdf>).

### 1.5.1 Hepatite C

Hepatite C é a inflamação do fígado causada pela infecção pelo vírus da hepatite C (VHC ou HCV), transmitido através do contato com sangue contaminado. Essa inflamação ocorre na maioria das pessoas que adquire o vírus e, dependendo da intensidade e tempo de duração, pode levar à cirrose e câncer do fígado. Ao contrário dos demais vírus que causam hepatite, o vírus da hepatite C não gera uma resposta imunológica adequada no organismo, o que faz com que a infecção aguda seja menos sintomática e que a maioria das pessoas que se infectam se tornem portadores de hepatite crônica, com suas conseqüências em longo prazo ([www.minhavidacom.br](http://www.minhavidacom.br), capturado em 24/11/2008).

A hepatite C crônica é considerada um importante problema de saúde pública nos Estados Unidos. Está estimado que aproximadamente quatro milhões de americanos possam estar infectados, sendo que 15 a 20 % deles desenvolvem cirrose. Nos Estados Unidos, a infecção com o vírus da hepatite C (HCV) é a principal causa de problemas hepáticos, aumentando assim o número de transplantes. Até recentemente, a terapia

com interferon alfa era a única disponível para estes pacientes, entretanto, após 48 semanas de tratamento, os níveis de ARN nos soros eram detectáveis somente em 15 a 20% dos pacientes. Estudos epidemiológicos randomizados sugerem que uma combinação do interferon com ribavirina aumenta a eficácia do tratamento. Muitos são os trabalhos realizados para estabelecer os níveis de segurança do tratamento com interferon sozinho e combinado com ribavirina (McHutchison, 1998).

O avanço recente mais importante na terapia foi o surgimento do IFN conjugado ao polietilenoglicol, IFN peguilado-alfa-2A (40 Kd) e IFN peguilado-alfa-2B (12 Kd), utilizado como alternativa terapêutica em alguns casos. Esta conjugação resulta em modificações importantes no seu metabolismo e excreção, mantendo níveis séricos da droga elevados por 5 a 8 dias, permitindo assim aplicações semanais e, além disso, mostrando em alguns casos, resultados terapêuticos mais favoráveis. Os estudos controlados randomizados de eficácia com monoterapia com IFN peguilado mostraram resultados superiores ao IFN convencional (Siciliano, 2004).

### **1.6 História da Febre e do Pirogênio**

Muitos médicos e cientistas antigos acreditavam que a febre deveria ser considerada como uma principal doença a ser combatida na época. Hipócrates acreditava que a febre servia para cozinhar os excessos de “humores” (a causa proposta da doença naquele dia) e, portanto, para remoção dos mesmos do corpo. Essas hipóteses eram válidas até o início do século XVIII, quando vários estudos puderam elucidar melhor as causas da febre.

Estudos primários surgiram de observações associando o aparecimento de febre em homens e animais que tiveram contato com materiais orgânicos apodrecidos. Entre 1809 e 1822, Gaspard injetou extratos de fluidos podres em cachorros e foi verificado que estes extratos causavam febre e doença nos animais. Em 1823, François Magendie notou as péssimas condições de higiene em volta de muitos abrigos e fundamentou-se de que as águas poluídas eram responsáveis pela ocorrência de muitas doenças graves, incluindo a febre tifóide, febre intermitente, disenteria, febre amarela, cólera e assim por diante. Ele seguiu os experimentos liderados por Gaspard e descobriu que os peixes de águas contaminadas seriam um potente indutor de febre. Também demonstrou que na ausência de materiais orgânicos em decomposição nenhuma febre era induzida (Williams, 2007).

Para ser mais efetivo, sugeriu que a mesma pudesse ser absorvida através da circulação. Concomitante às observações de Magendie, os farmacêuticos franceses Pelletier e Caventue isolaram “quinina” como uma droga antipirética pura de casca de “cinchona”. Então, piréticos e antipiréticos (do grego “pyreto” para febre) devem ser produzidos artificialmente e estudados. A compreensão do mecanismo da febre e o papel da bactéria em sua causa foi auxiliada pelo nascimento da teoria microbiológica moderna e seus métodos, e prosseguiu junto de muitas linhas de sobreposições de inquéritos, incluindo: (1) higiene médica geral, infecção por feridas (ou sépticas), (2) toxinas bacterianas, (3) febre por injeção, (4) terapia da febre, (5) purificação química e elucidação estrutural da endotoxina e (6) caracterização molecular moderna do lipopolissacarídeo (LPS) (Williams, 2007).

A expansão da caracterização do pirogênio microbiano em 1822 foi realizada por dois cientistas europeus que estudaram independentemente as toxinas bacterianas: Richard Pfeiffer e Eugênio Centanni. Sendo Pfeiffer, um dos estudantes de Koch em Berlim, descobriu que a bactéria *Vibrio cholerae* produzia dois tipos diferentes de toxinas: exotoxina termo-lábil e uma substância resistente ao calor que não foi secretada pela célula, mas liberada quando a célula se desintegrava. Isto havia sido previamente estudado por Panum, cujo trabalho permaneceu desconhecido por muitos anos.

Pfeiffer primeiramente utilizou a palavra endotoxina para descrever essa “toxina interna”, a qual foi confirmada como parte da parede celular de células específicas. Ele também fortaleceu a idéia de que elas fazem parte da estrutura dos microorganismos e não são secretadas por eles, como as exotoxinas. +

Centanni na Universidade de Bologna extraiu uma toxina termo-estável de *Salmonella typhi*, o agente causador da febre tifóide, e chamou-a de “pirotoxina”. Hoje é sabido que as toxinas estáveis de Centanni e Pfeiffer foram as próprias endotoxinas, comum em bactérias gram negativas. Foram lançados uma série de artigos em 1884 com o seguinte nome: “*Investigações nas Infecções Febris – A febre da Toxina Bacteriana*” nas quais ele descreveu a preparação da “pirotoxina bacteriana”. Ele descreveu uma endotoxina bacteriana obtida pelo crescimento de culturas em fermentação, coletando o filtrado estéril. Após o fracionamento alcoólico, o cientista finalizou seu experimento com a obtenção de um pó branco e estéril. Produziu o mesmo material para muitas bactérias ainda não identificadas, como a *Escherichia coli* e sugeriu que a família inteira da bactéria possuía a mesma toxina, um “veneno” mantido junto da

célula, fazendo parte da sua estrutura e dependente de sua forma típica, assim como dos distúrbios gerais causados pelas infecções bacterianas.

Embora hoje saibamos que as endotoxinas são limitadas apenas para as bactérias gram negativas, Centanni tinha descrito corretamente a natureza da mesma. Infelizmente, muitos dos trabalhos de Centanni permaneceram sem publicação nas revistas científicas italianas da época (Williams, 2007).

Estudos relatam que as endotoxinas constituem uma molécula complexa (Fávero, 1992). Pesquisadores procuraram determinar a relação entre a estrutura da endotoxina e sua função como toxina. Na era moderna, o foco do problema relacionado à endotoxina era a extração do LPS (lipolissacarídeo). Esta molécula foi quimicamente manipulada de acordo com as técnicas da época, iniciando com o método de extração de Westphal e Luderitz, do Instituto de Pesquisa de Wander, o qual mais tarde foi transformado no Instituto de Imunologia Max Planck, no final de 1940. Eles usaram o processo de extração a quente sobre vários membros da família *Enterobacteriaceae*, a fim de produzir uma proteína livre de LPS. Essas preparações foram pirogênicas em coelhos, em doses mínimas, com cerca de um nanograma por quilograma, quando administrado intravenosamente. Seu método de extração permitiu a produção de grandes quantidades de LPS adequados para pesquisa. O mesmo grupo em 1954 precipitou o fragmento lipídico de LPS com HCl 1N por aquecimento a 100<sup>0</sup>C por 30 minutos. Eles chamaram esta molécula de “lipídio A” (Williams, 2007).

## 1.7 Endotoxinas

As endotoxinas constituem o principal componente lipídico da membrana externa de bactérias gram-negativas, as quais liberam endotoxinas em seu meio circundante durante a sua multiplicação e, mais ainda, quando morrem. Tanto as endotoxinas como seus fragmentos são substâncias muito estáveis; os processos usuais de esterilização (estufa e autoclave) não são capazes de removê-las de superfícies ou soluções. Para degradá-las quimicamente devem ser usados ácidos ou bases fortes, ou um processo de pirólise - 180 ° C por 3 horas ou 250 ° C por 30 minutos - (Fávero, 1992).

O seu peso molecular situa-se em torno de 5000 daltons, mas suas características lipídicas e hidrofóbicas permitem a formação de agregados em soluções aquosas; o tamanho do agregado depende do tipo de solução, podendo atingir vários milhões de daltons e tornar-se particulado. O peso molecular também depende da

estrutura química que constitui uma determinada endotoxina, da espécie de bactéria de que é oriunda, das condições do meio de crescimento da bactéria e do método de sua extração. Por sua heterogeneidade bioquímica, as endotoxinas adsorvem-se de modo variado à maioria das superfícies, incluindo carvão ativado, resinas, vidros, plásticos e substratos de filtros (Harding, 1990).

Uma das maiores preocupações na indústria biofarmacêutica de um modo geral é o problema da contaminação por endotoxinas (LPS), componente estrutural de paredes celulares de bactérias gram-negativas, também conhecidas como pirogênio, principalmente por suas conseqüências à saúde humana, pois é capaz de gerar febre, inflamação e até morte, se seus níveis não estiverem dentro dos padrões estabelecidos. O controle de endotoxinas deve ocorrer desde a água de formulação até o produto acabado. Por esta razão, a utilização de materiais apirogênicos deve ser prioridade nos processos de produção (Grandics, 2000).

As endotoxinas são contaminantes freqüentes em soluções aquosas/fisiológicas e produtos obtidos pela tecnologia de ADN recombinante em modelo bacteriano. Devido a seus efeitos biológicos *in vivo* e *in vitro*, sua detecção e remoção são essenciais para a administração parenteral segura dos produtos injetáveis.

Os métodos tradicionais de detecção da endotoxina incluem os testes de pirogênios em coelho, LAL (Limulus Amebocyte Lysate), ensaios para MNC (célula mononuclear) e para fragmentos de lipopolissacarídeos marcados por radiação. Existem identificadas pelo menos 6 substâncias bacterianas diferentes capazes de gerar uma reação do tipo pirogênica (Arduino, 1998), como está mostrado na tabela 1.2

**Tabela 1.2:** Relação de substâncias bacterianas que podem gerar uma reação pirogênica. Fonte: (Arduino, 1998)

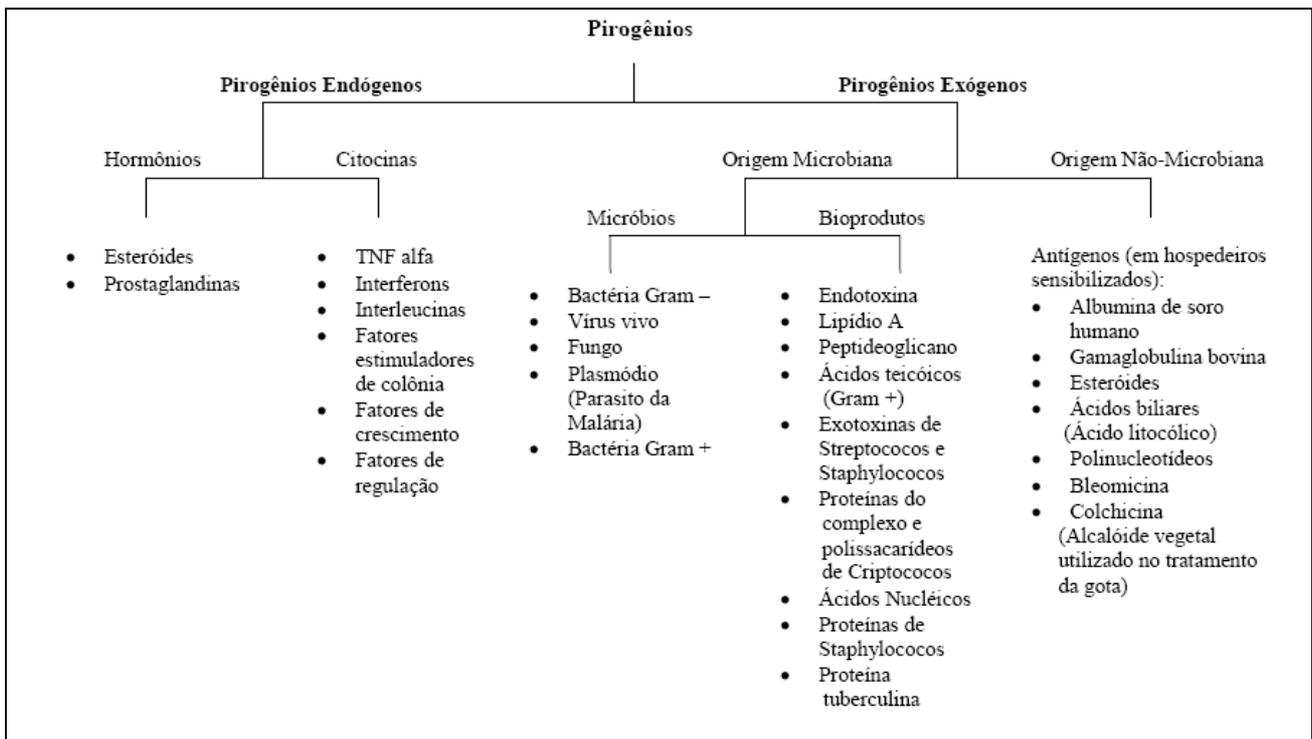
Substancia bacteriana	Peso molecular (kD)	LAL teste	MNC teste
1. Lipopolissacarídeo (LPS)	> 100	+	+
2. Fragmentos de LPS da camada A	2 - 4	+	+
3. Pepitideosglicanos	1 – 20	-	+
4. Muramilpeptídicos	0,4 - 1	-	+
5. Exotoxinas	20 - 50	-	+
6. Fragmentos de exotoxinas	< 5	-	+

A eliminação de endotoxinas permanece como um problema importante. Os métodos tradicionais aplicados nas indústrias, como esterilização em autoclaves ou a ultrafiltração, têm pouco efeito na eliminação da endotoxina. A melhor alternativa atual é

a despirogenização em forno, à temperatura de 250<sup>0</sup>C por 30 minutos ou 180<sup>0</sup>C por 3 horas (Sharma, 1986).

A despirogenização consiste na inativação ou remoção do pirogênio total (incluindo a endotoxina), dependendo da natureza físico-química do LPS. Pode ser obtida por vários caminhos: pirólise, hidrólise ácida, oxidação por água oxigenada, ultrafiltração, osmose reversa e destilação (no caso de água), atração hidrofóbica, carbono ativado e afinidade cromatográfica. Porém, vale certificar que cada método citado possui vantagens e desvantagens, o que vai depender diretamente do tipo de produto a que se destina a despirogenização. A afinidade cromatográfica tem sido usada com sucesso para remoção de endotoxinas de muitos produtos farmacêuticos, embora seja caro. O método inclui variados acoplamentos de sepharose com Polimixina B, substrato análogo a sepharose, LAL sepharose, DEAE sepharose e outros trocadores iônicos. Muitos estudos têm mostrado que a Polimixina B (PMB), um antibiótico catiônico, pode reduzir a atividade biológica do LPS (Weary, 1988).

Os pirogênios estão divididos em pirogênio exógeno e pirogênio endógeno (figura 1.5), baseados em sua origem. O termo “endotoxina endógena” é utilizado para evidenciar a endotoxina ambiental ou natural e não deve ser confundido com “pirogênio endógeno” (EP) e “mediador endógeno”, dos quais descrevem substâncias produzidas (citocinas) pelo corpo em resposta a pirogênios e são responsáveis pela inflamação, coagulação e mecanismo da febre. O pirogênio exógeno corresponde a qualquer substância exógena capaz de induzir uma resposta febril após a injeção ou infecção, incluindo o pirogênio microbiano cuja endotoxina é a mais potente. Pirogênios exógenos não-microbianos incluem certos agentes farmacológicos ou, para hospedeiros sensíveis, antígenos como a soro-albumina humana (Williams, 2007).



**Figura 1.5:** Classificação dos Pirogênios

Adaptado de: Williams, 2007

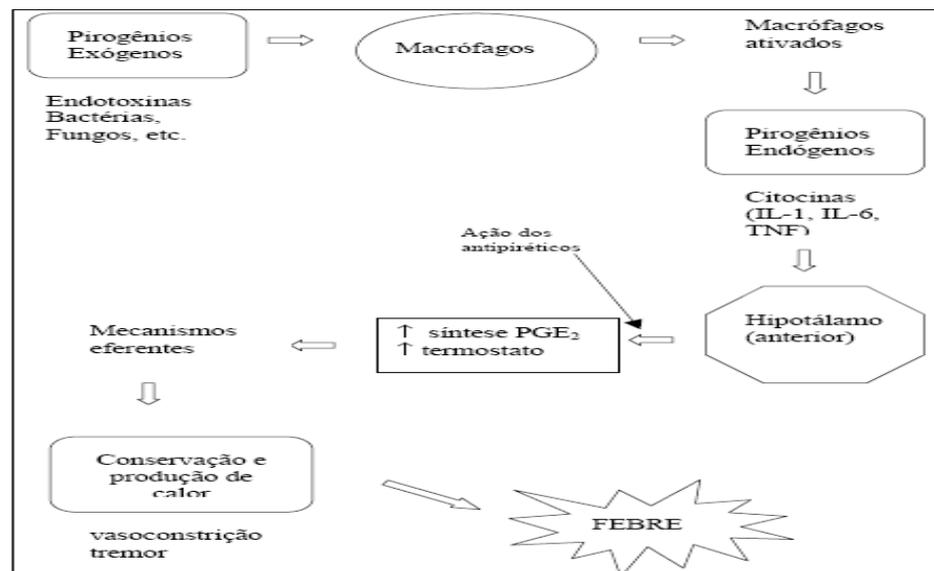
O termo pirogênio tem sido menos utilizado em relação à popularidade e acurácia de uso. A popularidade do termo tem sido reduzida devido à substituição do ensaio de pirogênio (em coelhos) com o teste do *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL), e a caracterização do número de bioprodutos microbianos análogos, a identificação de respostas biológicas do hospedeiro (que não incluem febre), a descoberta de materiais que reagem com LAL (reativos não pirogênicos) e o mais importante, o moderno conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares, que não se detém apenas na febre como efeito biológico (Williams, 2007).

### 1.7.1 Efeitos das Endotoxinas no Organismo e Mecanismo da Febre

O mecanismo de ação da endotoxina (figura 1.6) tem sido estudado extensivamente *in vitro* e *in vivo*. Liberado pela bactéria lisada, o LPS se liga através da proteína de ligação-LPS (PLL). Ambas, a PLL e a proteína de aumento da permeabilidade bacteriana desempenham um papel importante na resposta do hospedeiro a endotoxina. O complexo PLL-LPS se liga ao receptor CD 14 na superfície da célula, levando à sua ativação. As principais células alvo são as células mononucleares circulantes, que produzem citocinas inflamatórias como a interleucina-1

(IL-1) e fator alfa de necrose tumoral (FNT- $\alpha$ ). Citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas em inflamações agudas e crônicas, modulando a resposta do hospedeiro à infecção bacteriana (Grandics, 2000).

Dentre os múltiplos efeitos biológicos da IL-1 destacam-se a febre (ação no hipotálamo), a neutrofilia (ação na medula óssea), a proliferação de colágeno (estímulo de fibroblastos), a liberação de aminoácidos de músculos, a produção de IL-2 (ação nas células), assim como de anticorpos (ação nas células B). As endotoxinas interagem com vários sistemas celulares e humorais. Após penetrar na circulação, liga-se a lipoproteínas plasmáticas, resultando em redução de sua atividade biológica. Mesmo assim ativam o complemento, induzem a coagulação, afetam a função hepática e o sistema neuro-endócrino. Esta diversidade de respostas fisiológicas são direcionadas à eliminação de endotoxinas, seus fragmentos, e até mesmo bactérias gram-negativas, e a seguir promover o reparo das lesões teciduais. Porém, devido às altas concentrações ou maior sensibilidade das endotoxinas, as ações dos sistemas de defesa tornam-se incontroláveis e, ao invés de contribuir, muitas destas respostas acabam sendo deletérias ao paciente (Dinarello, 1989).



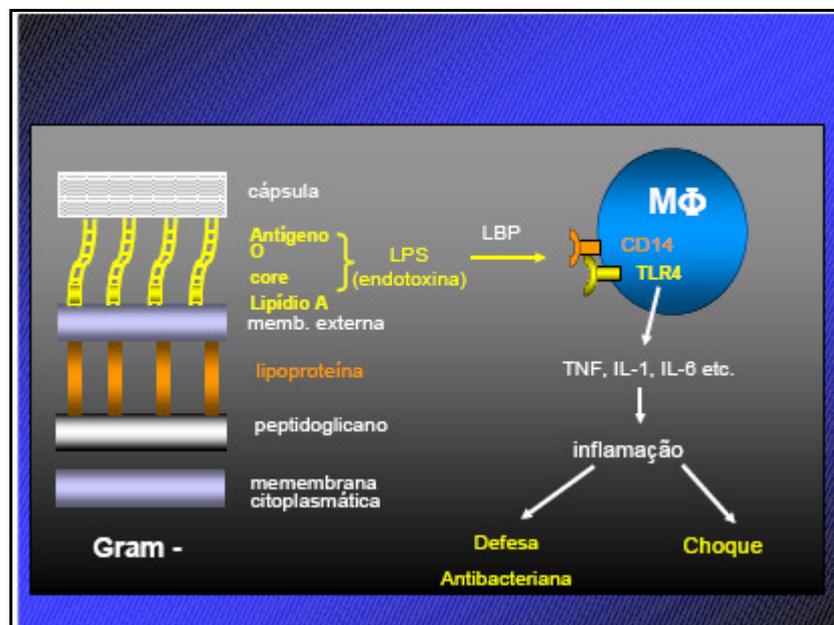
**Figura 1.6:** Mecanismo da Febre

Fonte: Presgrave, 2003

Mesmo na ausência de febre e das citocinas IL-1 e FNT- $\alpha$ , as endotoxinas induzem a produção de IL-6 e proteínas de fase aguda como a proteína-C reativa. Esse fato foi recentemente apresentado como marcador da mortalidade e morbidade crescentes em pacientes no estágio final de moléstias renais (Bergstrom, 1995). Desta forma, a crescente produção de citocina causada pela contaminação com LPS pode

refletir uma reação inflamatória com conseqüências potencialmente prejudiciais (Grandics, 2000).

A resposta pirogênica é a mais conhecida, mas apenas um dos vários efeitos produzidos por endotoxinas (figura 1.7); também induzem macrófagos do Sistema Retículo Endotelial (SRE) a liberar fatores antagonistas a glicocorticóide, fatores insulina-like, fatores coagulantes, coagulação de capilares, prostaglandinas, óxido nítrico (indutor de vasodilatação sistêmica e hipotensão no choque endotóxico), superóxidos e enzimas lisossômicas. Enfim, estas substâncias introduzidas acidentalmente na corrente circulatória de pacientes em hemodiálise produzem sintomas que afetam vários sistemas, dificultando a caracterização de um diagnóstico preciso (Dinarello, 1989).



**Figura 1.7:** Ação do LPS sobre CD14 e TLR4 e liberação de citocinas pró-inflamatórias

Fonte: Presgrave, 2003.

### 1.7.2 Teste de Pirogênio *in vivo*

O teste de pirogênio em coelhos (figura 1.8) baseado na injeção intravenosa da solução teste foi adotado por muitos anos para o controle de qualidade de produtos injetáveis. Alternativas para o refinamento do teste, incluindo a comparação da resposta do animal para duas preparações de endotoxinas diferentes, sugerem que a temperatura de corte de 0,6°C deve ser diminuída para 0,5°C, como critério para um resultado positivo. Entretanto, o teste de pirogênio em coelhos tem alguns inconvenientes,

incluindo baixa sensibilidade, ausência de quantificação, resistência e estresse do animal e a questão ética do envolvimento de animais nos experimentos. Embora o teste de pirogênio *in vivo* ainda seja necessário em algumas situações, vem sendo substituído aos poucos pelo teste *in vitro* (LAL). Portanto, a validação do teste de LAL e as especificações estabelecidas para os produtos biológicos contribuirão para confirmação da qualidade e segurança de produtos farmacêuticos injetáveis (Silveira, 2004).



**Figura 1.8:** Teste de Pirogênio *in vivo*

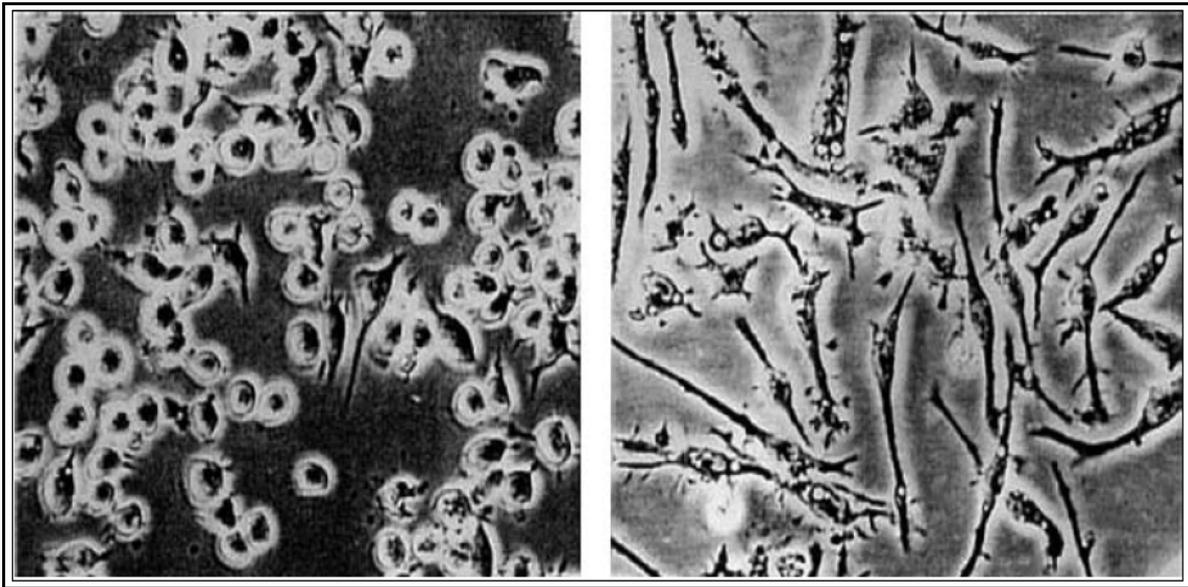
Fonte: Presgrave, 2003.

Por mais de 40 anos o ensaio de pirogênio em coelhos permaneceu invariável e sua efetividade foi pouco questionada. Hoje, para a aprovação e comercialização de grande parte dos produtos farmacêuticos e biotecnológicos administrados por via parenteral, os principais órgãos reguladores internacionais exigem o controle de endotoxina pelo método de LAL (Morales, 2004).

O teste de LAL somente detecta as endotoxinas oriundas de bactérias gram negativas, consistindo em grande parte da resposta pirogênica. O teste de pirogênio *in vivo* (que detecta o pirogênio total) ainda é mantido, pois existem pirogênios que não são endotoxinas e, portanto, não detectáveis pelo método de LAL.

### 1.7.3 Ensaio de Ativação de Monócitos

Um teste de pirogênio alternativo é o ensaio de citocina por ativação de monócitos (figura 1.9). Neste ensaio, os monócitos isolados do sangue periférico humano são incubados com as amostras em teste e o sobrenadante testado quanto à presença de citocinas pirogênicas como interleucina-1 (IL-1) ou fator de necrose tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ). Uma variação possível neste teste é o ensaio de interleucina-6 (IL-6) no sangue. Um ensaio com base em células monocíticas também está em fase de desenvolvimento.



**Figura 1.9:** Macrófagos arredondados (esq) e alongados ativados (dir) – quando expostos a LPS

Fonte: Old, 1988

A desvantagem deste tipo de ensaio está no fato de que a sensibilidade dos monócitos recentemente isolados pode variar de acordo com a resposta imunológica dos doadores. Para tornar este ensaio adequado aos propósitos de controle de qualidade, é preciso uma linhagem de células monocíticas bem definidas, que possuam a capacidade de sintetizar e segregar citocinas. Isso pode levar ao desenvolvimento de um teste de pirogênio quantitativo com grande aplicabilidade. As linhagens de células Mono-Mac-6 e THP-1 foram caracterizadas quanto a sua adequação em um ensaio de pirogênio com base celular e mostraram-se capazes de detectar pirogênios bacterianos. As células Mono-Mac-6 têm sido bem sucedidas para detectar a pirogenicidade em lotes de soroalbumina que haviam anteriormente apresentado resultados satisfatórios nos testes de coelho e LAL, mas causaram reações adversas (pirogênicas) em humanos. Tal situação sugere que o ensaio com base em células monocíticas está em fase de estudo e pode complementar as metodologias existentes (Taktak, 1990).

Um ensaio patenteado pela empresa Charles River Laboratories é o “IPT” (*In Vitro* Pyrogen Test). O mesmo consiste em um ensaio *in vitro*, imunoenzimático (ELISA), que utiliza citocinas como marcador, alternativo ao teste de pirogênio em coelhos. O kit IPT pode ser utilizado para detecção de pirogênios provenientes tanto de bactérias gram negativas quanto gram positivas, leveduras, vírus, parasitas, etc, e têm grande aplicabilidade em laboratórios de pesquisa, para produtos biológicos complexos, principalmente soroalbumina humana e produtos derivados do plasma, que podem interferir com método de LAL.

Neste ensaio, é necessário sangue humano fresco e criopreservado. As células imunes do sangue (monócitos) reconhecem pirogênios exógenos e em resposta liberam citocinas (interleucina 1- $\beta$ ) que podem ser mensuradas por ELISA. Um espectrofotômetro deve ser utilizado para avaliar a presença de pirogênios. O ensaio pode ser quantitativo utilizando-se uma curva-padrão como referência ou apenas qualitativo como o teste de pirogênio em coelhos ([www.crl.com](http://www.crl.com), capturado em 10/09/2008). Um estudo colaborativo entre parceiros industriais, governamentais e acadêmicos da Europa, tem sido empregado para avaliar a possibilidade de substituição do teste de pirogênio *in vivo* por este teste. Porém, a sua aplicabilidade em controle de qualidade de imunobiológicos e biofármacos ainda é questionável, devido à necessidade de utilização de sangue humano fresco e os riscos de biossegurança envolvidos, além do tempo de ensaio que não supera o teste de LAL.

A tabela 1.3 mostra os resultados do kit IPT comparado com os métodos tradicional e LAL.

**Tabela 1.3:** Diferentes métodos para detecção de pirogênios.

Adaptado de: [www.criver.com](http://www.criver.com)

		Teste em coelhos	LAL	IPT
	Princípio do Teste	Reação febril em mamíferos	Mecanismo de defesa artrópode	Reação febril humana
Pirogênios detectáveis	Gram-negativa	+	+	+
	Gram-positiva	+	-	+
	Fungos	+	-	+
	Vírus	+/- <sup>1</sup>	-	+
Aplicações	Fármacos	+	+	+
	Biológicos	+	+/- <sup>2</sup>	+
	Dispositivos médicos	+ <sup>3</sup>	+/- <sup>3</sup>	+
	Terapias celulares	-	+/-	+
	Poluentes do ar	+ <sup>3</sup>	+/- <sup>3</sup>	+

1. Resposta pirogênica variável.

2. Teste em coelhos necessário frequentemente.

3. Somente testado indiretamente por extração do produto ou filtro com água ou salina livre de pirogênio.

O impacto dos pirogênios que não são LPS deve ser relativamente baixo para produtos farmacêuticos, desde que se certifique como menos potente que o LPS e mais sensível à padronização dos procedimentos de inativação e esterilização. Entretanto, pouco se sabe sobre as contaminações em materiais sólidos (produtos médicos), terapia celular (sangue estocado, células tronco, células modificadas geneticamente) ou pirogênios inalados, especialmente esporos resistentes ao calor. Novos desafios estão surgindo com as ferramentas da biotecnologia (por exemplo, sistemas de expressão de proteínas utilizando fontes não bacterianas, terapia celular, engenharia de tecido, órgãos artificiais, etc). O kit IPT deve ser submetido a validações e deve ser refinado para sua posterior inclusão nas farmacopéias. Assim como o LAL, o progresso desta tecnologia virá com o tempo (Endosafe Times, 2002).

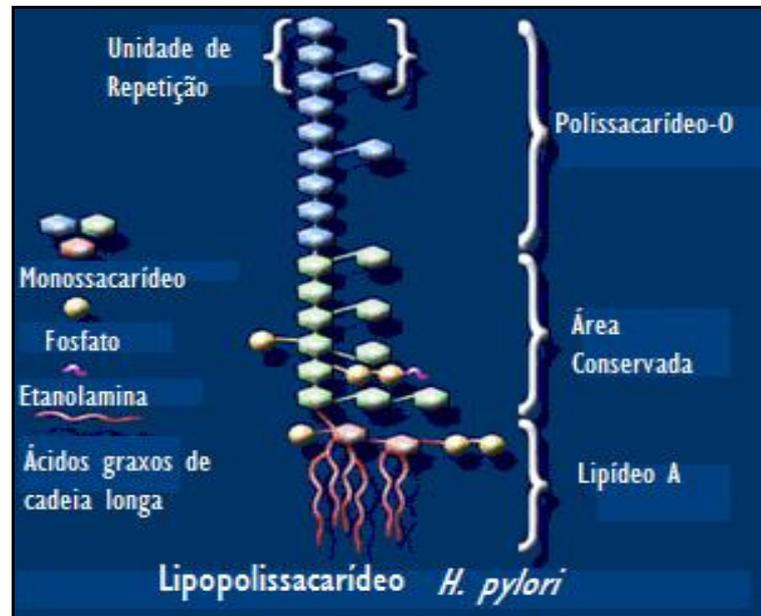
### **1.8 Estrutura do LPS, Função e Atividade.**

O lipopolissacarídeo (LPS) das paredes celulares de bactérias gram-negativas consiste num lipídio complexo, denominado lipídio A, ao qual está ligado covalentemente a um polissacarídeo constituído de uma área conservada e uma série terminal de unidades repetidas. O lipídio A consiste em unidades dissacarídicas de glicosamina fosforilada às quais estão ligados vários ácidos graxos de cadeia longa e é responsável por grande parte dos efeitos biológicos. O ácido  $\beta$ -hidroximirístico, um ácido graxo de 14 carbonos sempre está presente, sendo exclusivo deste lipídio. Os outros ácidos graxos, juntamente com grupos substituintes nos fosfatos variam com a espécie bacteriana (Grandics, 2000).

A porção polissacarídea possui dois domínios: uma área conservada (core) com pequenos grupos de açúcares, e outra bem maior e mais variável conhecida como polissacarídeo-O (antígeno-O) – figura 1.10. O antígeno-O é responsável pela resposta antigênica em humanos, promovendo imunidade às infecções oriundas de bactérias gram negativas (Morrison, 1994).

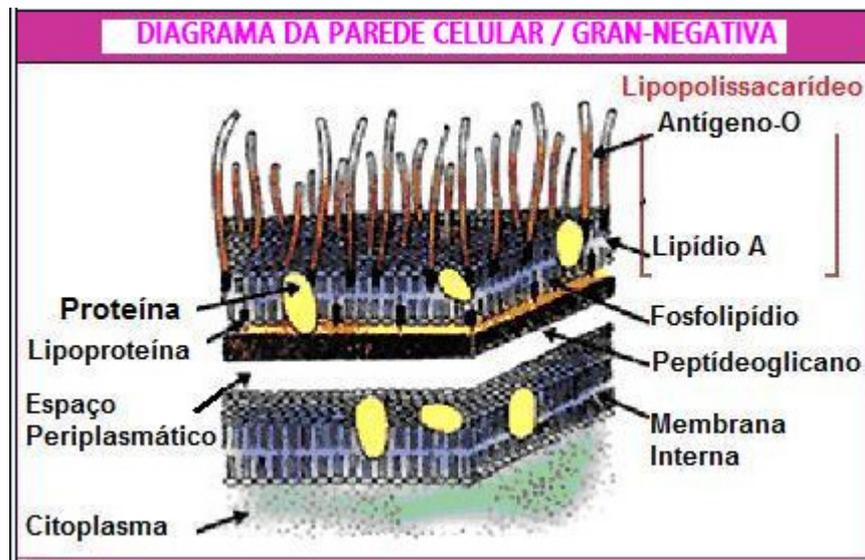
O LPS é extremamente tóxico para animais, uma vez que está firmemente ligado à superfície celular, sendo liberado apenas quando as células são lisadas. Quando o LPS é clivado em lipídio A e polissacarídeo, toda toxicidade está associada ao lipídio A (figura 1.11). Por outro lado, o polissacarídeo representa um importante antígeno de superfície de célula bacteriana – denominado polissacarídeo O. A especificidade

antigênica é conferida pelas unidades terminais de repetição, que circulam a cadeia, formando uma camada de polissacarídeos hidrofílicos. O número de tipos antigênicos possíveis é muito grande: foram identificadas mais de 1000 espécies em *Salmonella* (Grandics, 2000).



**Figura 1.10:** Estrutura do LPS

Adaptado de: [www.nuigalway.ie/microbiology/mbi/lps.htm](http://www.nuigalway.ie/microbiology/mbi/lps.htm)



**Figura 1.11:** Parede Celular de Bactéria Gram Negativa

Adaptado de: [www.microbiochip.com](http://www.microbiochip.com)

Segundo Cardoso (2007), as proteínas recombinantes expressas em *Escherichia coli* são geralmente contaminadas com endotoxinas. Em suas pesquisas, foi avaliada a

habilidade do antibiótico polimixina B em inibir a ação do LPS contaminante em proteínas expressas por *E.coli*, na indução de citocinas, como fator de necrose tumoral e interleucina 10.

Os níveis de citocinas foram avaliados por ELISA. Mais de 90 % de redução nos níveis de citocinas foi verificada após a adição de polimixina B. O estudo mostrou que este antibiótico foi capaz de inibir o efeito da endotoxina.

Além do LPS, a bactéria gram-negativa libera peptídeos tais como a exotoxina A (de *Pseudomonas sp*), peptidoglicanos, peptídeos muramila e outras substâncias ainda não identificadas. Esses produtos bacterianos atuam de maneira similar ao LPS quanto à indução da secreção de citocinas. O tamanho molecular desses produtos também varia bastante. Peptidoglicanos e LPS são moléculas grandes, considerando que subunidades de LPS e peptídeos muramila podem ser tão pequenos quanto 2.000 Da. No sobrenadante de uma preparação contendo *Pseudomonas*, principal grupo de bactérias encontradas na água, foi identificado recentemente um pirogênio com um peso molecular muito baixo (<1.000 Da). Amostras de produto final podem conter uma mistura de pirogênios, sugerindo que apenas uma única forma de remoção pode ser insuficiente (Mahiout, 1991).

### **1.9 Limulus Amebocyte Lysate (LAL)**

O reagente de LAL teve seu descobrimento em 1956 quando o pesquisador Frederick B. Bang relata a morte, por coagulação intravascular, de um caranguejo ferradura americano *Limulus polyphemus*. Bang, junto com Jack Levin, revela em 1964 que as endotoxinas são responsáveis pela coagulação da hemolinfa do *Limulus*. Mais tarde, estes pesquisadores comprovam que os elementos responsáveis pela coagulação induzida por endotoxina são de natureza enzimática, e se encontram nos amebócitos, únicos tipos de célula presente na hemolinfa do caranguejo. O reagente de LAL é um extrato aquoso de amebócitos, composto por uma cascata de enzimas serino-proteases do tipo tripsina capaz de reagir frente a pequenas quantidades de endotoxinas (Morales, 2004).

A técnica do LAL baseia-se na capacidade que as células sanguíneas (Amebócitos) do *Limulus polyphemus* (figura 1.12), conhecido também como caranguejo ferradura, têm de reagir em presença de endotoxinas, promovendo opacificação,

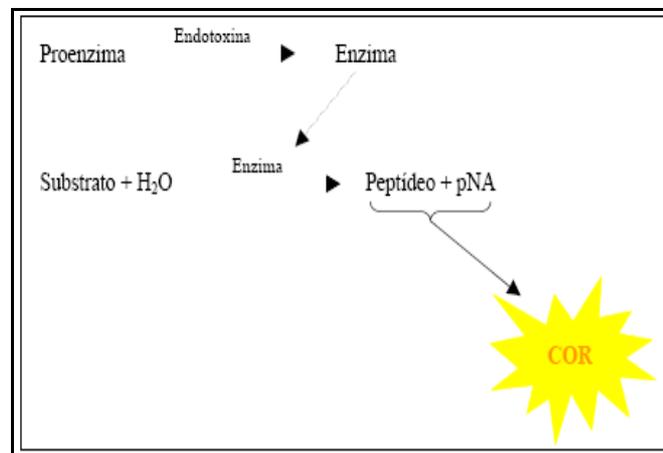
gelificação (figura 1.13) e coloração amarelada juntamente com cromógenos específicos (figura 1.14), permitindo assim a determinação de endotoxinas e posterior quantificação. Além da alta sensibilidade, que permite quantificar pequenas quantidades de endotoxinas.



**Figura 1.12:** *Limulus polyphemus*  
Fonte: [www.corpct.com](http://www.corpct.com)

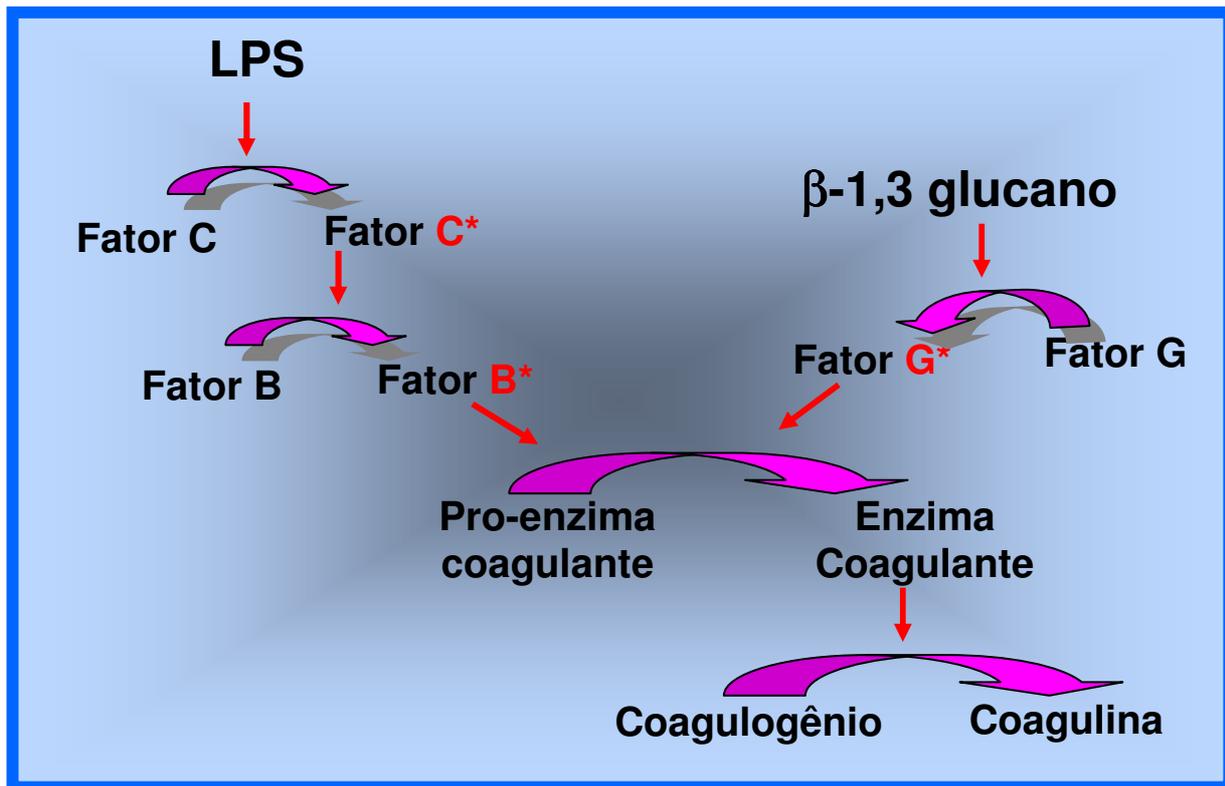


**Figura 1.13:** Gel característico de Positividade  
Fonte: [www.bge.com.tw/LAL/LAL/lalproducts.htm](http://www.bge.com.tw/LAL/LAL/lalproducts.htm)



**Figura 1.14:** Cascata de Ativação da Proenzima por Endotoxina liberando pNA no Ensaio Cinético  
Fonte: Presgrave, 2003.

Sabe-se hoje que a reação produzindo a formação de um gel, típica de teste positivo, é uma reação em cascata de ativação de enzimas (a figura 1.15 ilustra a cascata de coagulação da hemolinfa pelo LPS). A proteína de coagulação (coagulogênio) é clivada por uma enzima coagulante ativada: os produtos insolúveis da clivagem se ligam por interação iônica para formar o gel, característico de positividade do teste do LAL.



**Figura 1.15:** Cascata de reações bioquímicas que ocorrem na coagulação pelo LPS  
Adaptado de: [www.webalice.it/alberto.frangini/LAL.jpg](http://www.webalice.it/alberto.frangini/LAL.jpg)

Em 1978, Geier, realizou uma pesquisa em diferentes vacinas usando o Limulus Amebocyte Lysate (LAL) e avaliou sua eficácia. As vacinas testadas foram Smallpox, Rubéola, Poliomielite, Influenza, Caxumba, DTP célula inteira, DT e DTaP. Os autores concluíram que o monitoramento de endotoxinas e outros contaminantes em imunobiológicos devem ser controlados e avaliados, objetivando a redução dos efeitos adversos observados em algumas vacinas, e que as vacinas com concentrações de endotoxinas mais baixas reduzem estes efeitos. Foi verificado que as altas concentrações de endotoxinas na vacina DTP célula inteira são as mais preocupantes. Os resultados demonstraram que o componente Pertussis foi o principal causador das elevadas concentrações deste contaminante.

Em alguns estudos, está claro que a endotoxina causa hemorragia cerebral por ruptura da barreira sanguínea, sendo, portanto, a grande causa de efeitos adversos neurológicos seguidos da vacinação com DTP célula inteira. Sendo assim, os resultados sugerem que as altas concentrações de endotoxinas presentes na vacina DTP célula inteira podem estar correlacionadas com a alta incidência de efeitos adversos, e que o método de LAL apresentou resultados consistentes nas pesquisas (Geier, 1978).

Kelly *et al* (1997) através de suas pesquisas em pacientes com queimaduras severas, contaminadas com endotoxinas, avaliou seus níveis pela técnica de LAL em amostras de plasma sanguíneo que haviam sido diluídas 1:5 e 1:10 em água aprotogênica. A técnica adotada foi cinética turbidimétrica, com spike de endotoxinas em diluições seriadas a partir de uma endotoxina padrão, mensurada por um leitor de microplacas à 37<sup>0</sup>C. Seus resultados com este kit foram satisfatórios e as dosagens estabelecidas. Pacientes com ferimentos graves freqüentemente têm níveis de endotoxinas plasmáticas mensuráveis logo após o ferimento ocorrer, porém suas pesquisas mostraram que nos 10 primeiros dias após o ferimento, mesmo com níveis de endotoxinas presentes no plasma, as concentrações de citocinas pro inflamatórias, IL-1 e FNT- $\alpha$ , não foram relevantes, o que sugere um estudo mais aprofundado no que diz respeito à presença de endotoxina e os mecanismos da resposta inflamatória. Os modelos animais utilizados na pesquisa, após serem submetidos a ferimentos, não demonstraram uma evidência direta do LPS circulante com a produção de mediadores inflamatórios.

Como mencionado, o teste de LAL detecta apenas as endotoxinas bacterianas. Este aspecto, a primeira vista, passa como uma desvantagem para a implementação deste método, porém, verificou-se que a endotoxina é o pirogênio mais relevante que se conhece. Como as bactérias gram-negativas são capazes de se multiplicar em ambientes aquosos, pode-se esperar que elas e suas endotoxinas estejam presentes na maioria dos produtos, contaminando comumente as matérias-primas e equipamentos empregados na produção de injetáveis. É o pirogênio mais encontrado nos lotes de produtos biológicos contaminados devido a sua alta resistência a destruição térmica e química. São caracterizadas por sua potente atividade biológica, capaz de produzir mudanças fisiológicas graves quando administradas por via parenteral. Uma dose de 1-10ng/kg de endotoxina já é suficiente para provocar uma resposta febril no homem (Morales, 2004).

### **1.9.1 LAL na Indústria Farmacêutica**

As primeiras respostas e as vantagens do LAL apareceram na indústria farmacêutica com os trabalhos de James F.Cooper no início da década de 70.

Cooper aplicou pela primeira vez o LAL em uma droga parenteral, um rádiofarmaco de meia vida curta, do qual não podia avaliar pelo método convencional em coelhos, e reconheceu a importância da equivalência entre ambos os ensaios.

Posteriormente, demonstrou que a equivalência dos resultados do teste de LAL é 10 vezes mais sensível que o teste realizado em coelhos. Demonstrou então algumas vantagens do LAL na indústria farmacêutica (sua simplicidade, menor tempo e volume de amostra, o fato de ser quantitativo).

A alta sensibilidade do teste de LAL é particularmente importante para as proteínas terapêuticas parenterais e imunobiológicos, o que no método tradicional (coelhos) não é capaz de detectar devido a sua baixa sensibilidade. Cooper demonstra pela primeira vez que clinicamente os pirogênios são mais tóxicos por via parenteral. Este fato também foi observado por Bennet e outros. Estes estabeleceram que os efeitos tóxicos da endotoxina pelas vias subcutânea e intramuscular em cachorros e coelhos são 1000 vezes mais potentes para produzir febre do que por via intravenosa. Por seu efeito farmacológico, certos citostáticos, alguns sedativos e anestésicos, corticosteróides, derivados da "fenotiazina" e antipiréticos não são avaliados pelo método de pirogênio em coelhos, porque mascaram o potencial pirogênico das amostras (Morales, 2004).

Embora o FDA reconheça as inúmeras vantagens do teste de LAL na indústria farmacêutica, procedeu cautelosamente para sua oficialização. Durante a década de 70 o FDA publicou os primeiros regulamentos para o uso de LAL em produtos derivados de sangue e vacinas, realizou numerosas pesquisas em mais de 2.526 produtos farmacêuticos no início da década de 80. Mas foi em 1983 que o método foi oficializado, através do lançamento do "primeiro guia para validação do teste de LAL e liberação de produtos finais, para medicamentos parenterais de uso humano e animal, produtos biológicos e acessórios médicos" (tabela 1.4). Por outro lado, no período de 1975 -1980 o Comitê de Revisão da Farmacopéia dos Estados Unidos (USP), considerou a substituição do teste de pirogênio em coelho pelo teste de LAL. Empregou tempo e esforço revisando os dados disponíveis, até que foi publicado um capítulo "Ensaio de Endotoxinas Bacterianas" (Bacterial Endotoxin Test; BET, capítulo 85), que foi publicado no fórum da farmacopéia, e logo na USP XX, oficializada em primeiro de julho de 1980. Já na farmacopéia européia (EP) foi publicado em 1987 (Morales, 2004).

**Tabela 1.4:** Histórico e Evolução do teste de LAL  
Adaptado de: <http://www.ocean.udel.edu/horseshoecrab/research/lal.html>

Histórico do LAL	
1880	W.H Lowell realiza os primeiros estudos em coagulação sanguínea de <i>L. polyphemus</i> na Universidade Johns Hopkins
1956	Bang descobre que a hemolinfa do caranguejo ferradura forma coágulos na presença de bactérias ( <i>Vibrio</i> sp.).
1964	Levin e Bang descobrem que o agente de coagulação sanguínea do caranguejo ferradura é um amebócito.
1968	Cientistas descobrem que uma endotoxina causa reação de coagulação no caranguejo ferradura. O método do LAL foi desenvolvido.
1971	O teste de LAL padrão foi estabelecido.
1977	O FDA substitui o teste de pirogênios em coelhos pelo teste de LAL.
1983	O FDA aceita o LAL como um teste padrão para testes de detecção da endotoxina bacteriana.
1987	O FDA estabelece o guia de LAL para dispositivos médicos e biofarmacêuticos.

Atualmente, a maioria das monografias para injetáveis nas principais Farmacopéias exige o teste de LAL para produtos finais.

### 1.9.2 Métodos de LAL

No mercado existem três variações básicas do teste de LAL: o método de gelificação (gel clot), os métodos cinéticos turbidimétrico e cromogênico, além das suas versões em ensaios de “end-point”. Cada fabricante descreve sua própria metodologia, porque geralmente as variações são pequenas. A correlação entre os métodos está baseada na descoberta da menor diluição capaz de eliminar a interferência ( $\beta$ -glucanos, derivados de celulose, derivados de processos fermentativos, etc). No geral, existe uma correlação moderada entre os métodos quando o reagente de LAL é produzido pelo mesmo fabricante, porém vale ressaltar que os resultados podem ser diferentes para o mesmo método se forem utilizados fabricantes distintos. Por esta razão a validação se torna indispensável e é considerada como um aspecto crítico, pois garante a segurança do teste, tornando confiável a quantificação de endotoxinas. Ainda existem algumas dúvidas e confusões a respeito da validação deste método por parte de alguns analistas. Vale certificar que se valida a “amostra ou sua diluição de trabalho”. A validação do LAL apresenta-se detalhada no guia do FDA (Morales, 2004).

Segundo a RDC 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, nos ensaios biológicos quantitativos, a validação deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de

detecção e quantificação, exatidão, robustez, adequados a análise. Também afirma que no caso de metodologia analítica descrita em farmacopéias, como o teste de LAL, ou formulários oficiais devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros citados.

### **1.10 Validação de Método para Detecção de Endotoxinas Bacterianas**

A validação é um processo estabelecido por evidências documentadas que comprovam que uma atividade específica apresenta conformidade com as especificações pré-determinadas e atende aos requisitos de qualidade (RDC 899, 2003).

Os elementos críticos na validação dos testes para detecção de endotoxinas bacterianas (BET) estão nas formulações dos materiais a serem validados, no reagente de LAL e no controle-padrão de endotoxina (CSE). Os reagentes de LAL aprovados pelo FDA para diferentes fabricantes diferem na composição e maneiras nas quais eles são processados. As diferenças incluem a presença de cátions metálicos, proteínas, tampões e conteúdo de surfactante. As amostras que possuem extratos aquosos, baixas concentrações de soluções e pH neutro exibem um perfil de compatibilidade similar nos vários reagentes, poucas ou nenhuma diferença detectável nas propriedades de interferência. Entretanto, quanto mais complexa for a fórmula do produto, que possuem diferentes tampões, reagentes que agregam endotoxinas, podem reagir diferentemente em cada reagente. Conseqüentemente, a validação do LAL para o produto a ser analisado é justificada para muitas formulações (Cooper, 2003).

Passos importantes na validação do método para endotoxinas bacterianas:

- Objetivo;
- Descrição da amostra teste;
- Determinação do limite de endotoxina;
- Definição e condução dos experimentos de validação;
- Fazer um perfil de compatibilidade de dois métodos;
- Definir as condições de validação;
- Conduzir a validação com três lotes;
- Escrever o relatório de validação.

O objetivo dos procedimentos de validação é encontrar uma faixa válida e compatível (concentração ou diluição) da amostra para os testes de rotina com o LAL. A seguir, temos um resumo dos passos a serem seguidos para a validação das técnicas de detecção de endotoxinas bacterianas, de acordo com os Marcos Regulatórios Nacionais

e Internacionais. A criação de novas metodologias para este tipo de validação deve seguir os passos básicos e satisfazer os requerimentos regulatórios e farmacopeicos (Cooper, 2003).

#### **1.10.1 Descrição da amostra**

A descrição da amostra inclui o nome comercial, potência e volume do produto, categoria de uso, códigos do produto, fórmula completa, faixa de pH e outras especificações. O volume de reconstituição de um líofilo é necessário para determinação da potência resultante.

#### **1.10.2 Limite de Endotoxina**

A tolerância limite e a dose máxima humana por hora, como descritos nos diretórios do FDA ou Farmacopéias, são necessários para calcular o limite de endotoxinas pela fórmula  $K/M$ , onde  $K$  é o limite de tolerância e  $M$  é a dose máxima por hora. Os limites farmacopeicos devem ser seguidos, se disponíveis. Caso haja diferenças entre as farmacopéias, é prudente seguir a mais conservadora.

#### **1.10.3 Validação dos Experimentos**

Os experimentos necessários para documentar a ausência de interferência devem ser antecipados à rotina, a fim de garantir que o ensaio seja completamente validado. O principal experimento para a validação da amostra é a certificação da interferência através dos controles positivos do produto, para encontrar a diluição ou concentração que é mais compatível com os reagentes.

#### **1.10.4 Influência do pH**

O pH é uma parte essencial da validação para produtos que são tamponados e tem uma faixa de pH que não é neutra. Por exemplo, um agente antibacteriano que tem uma faixa de pH de 9 a 11 e foi diluído com água apirogênica. O pH foi verificado antes e depois da adição do reagente de LAL. Os resultados demonstraram a importância da diluição e o uso de LAL tamponado para neutralização (Tabela 1.5), ou seja, quanto

maior a diluição da amostra mais o pH se aproximou da neutralidade, e o LAL exibiu seu efeito tamponador.

**Tabela 1.5:** Importância da diluição na variação do pH no teste de LAL.

Adaptado de: (Cooper, 2003)

Antibiótico/ Perfil de pH			
Diluição	mg/mL	SPL	SPL/LAL
1:2	200	10.1	8.5
1:10	40	9.0	7.6
1:100	4	8.3	7.2
1:1000	0.4	7.5	7.0

O uso de tampões e agentes ativos de superfície em validação de métodos é desencorajador pelas seguintes razões: 1) reagentes LAL são extremamente sensíveis a mudanças de pH, cátions bivalentes e agentes ativos de superfície (dispersantes); 2) os efeitos desses agentes variam com cada lote do produto e do reagente LAL; 3) é difícil saber o tempo que um aditivo tem de superar a inibição ou apenas aumentar a recuperação do controle de endotoxina. A suficiência da diluição com água apirogênica para resolver a inibição simplifica o método validado e evita uma variação lote a lote na recuperação. A interferência relatada por pH pode ser evitada selecionando um LAL tamponado apropriado (Cooper, 2003).

### 1.10.5 Perfil de Compatibilidade

O perfil de compatibilidade é uma extensão da pesquisa preliminar para a inibição. A finalidade exclusiva deste perfil é encontrar uma concentração compatível da droga que não iniba ou aumente a recuperação de endotoxina. O passo para encontrar esta compatibilidade é testar uma série de diluições tipo base dois na amostra e identificar a faixa onde o controle positivo do produto é totalmente recuperado. A letra grega lambda ( $\lambda$ ) representa a sensibilidade do teste de LAL e é uma unidade internacional e farmacopeica. O controle positivo de dois lambda ( $2\lambda$ ), ou seja, duas vezes a sensibilidade, no método gel clot, somente assegura 50% de recuperação. Uma maneira mais informativa é realizar uma pesquisa com pelo menos dois métodos (gel clot e cinético) para obter uma melhor compreensão sobre a interferência e descobrir o quanto a diluição pode ajudar neste caso (tabela 1.6). Muitos produtos necessitam de uma diluição de base 10 ou 100 para a obtenção de uma diluição ideal de compatibilidade

com o LAL. A presença de  $\beta$ -glucanos pode ser responsável pelo aumento no controle positivo do produto nos ensaios cinéticos. Finalmente, o perfil pode mostrar que o método de LAL é mais adequado do que outros.

**Tabela 1.6.** Perfil de compatibilidade para contraste do produto com LAL.

Adaptado de: (Cooper, 2003)

Perfil de Compatibilidade para contraste do produto com LAL *							
<b>Potência (mg/mL)</b>	120	60	30	15	7.5	3.7	1.8
<b>2<math>\lambda</math> PPC/ Recuperação</b>	--	--	--	++	++	++	++
<b>% PPC/ Recuperação</b>	6	25	59	81	91	103	105
* Endosafe gel clot/ KTA reagent							

A concentração compatível ou a melhor diluição é identificada analisando os resultados dos testes cinéticos e gel clot do perfil de compatibilidade. Esta concentração não é a “primeira recuperação” (do controle positivo do produto ou spike) de dois lambda ( $2\lambda$ ) para o gel clot ou a recuperação cinética acima de 50%. Ela deve ser a mais próxima de 100% de recuperação, de forma que também não interfira no método. Quando somente os dados de gel clot são obtidos, a concentração ideal é a segunda ou terceira do controle positivo do produto. Esta precaução é tomada porque a mais alta concentração com um resultado positivo assegura somente 50% de recuperação.

A sensibilidade das condições do teste no perfil deve ser calculada e comparada com o limite de endotoxina para determinar se existe uma sensibilidade adequada. A sensibilidade específica do produto (PSS) é a razão entre o lambda e a concentração do teste de um pequeno volume parenteral ou a multiplicação de lambda pelo fator de diluição dos extratos. Se a sensibilidade específica do produto não for quatro vezes mais rigorosa do que o limite de endotoxina (EL), a sensibilidade deve ser aumentada reduzindo-se o lambda para promover uma melhor margem de segurança entre a sensibilidade específica do produto e o limite de endotoxina (Cooper, 2003).

### 1.10.6 Validação de 03 lotes

Segundo o guia de validação do FDA e ANVISA, são necessários no mínimo três lotes de produto para que a validação seja realizada. Os critérios de aceitação para iniciar a fase final da validação estão nos seguintes itens: compatibilidade, sensibilidade

e pH. A melhor escolha para os métodos cinéticos está descrita no próprio guia do FDA e nas Farmacopéias.

Os fornecedores, reagentes e recursos necessários para produzir um documento completo sobre validação do teste de endotoxinas precisam de substancialidade. Há um custo muito grande em validar múltiplos métodos de LAL ao mesmo tempo, porque envolve tempo, consumo, custo, preparação de amostras e documentação.

### **1.10.7 Relatório de Validação**

O relatório final deve documentar e descrever totalmente o produto, assim como os resultados de todos os experimentos durante os testes preliminares e experimentos finais de validação. Os elementos que devem constituir o relatório final de validação são mostrados abaixo. Produtos que possuem informações adicionais devem requerer documentação adicional.

- Identificar responsabilidades;
- Objetivo e escopo;
- Mostrar cálculos representativos;
- Descrever materiais e métodos;
- Discutir os resultados experimentais;
- Verificar a robustez do método;
- Especificar o método validado;
- Apresentar conclusões;
- Citar referências.

De acordo com toda pesquisa bibliográfica consultada, o presente trabalho de dissertação poderá contribuir fortemente para o controle de qualidade microbiológico de Biomanguinhos. A preocupação em se estabelecer um controle eficaz na detecção quantitativa de endotoxina bacteriana fez com que nossa atenção fosse voltada para o biofármaco alfainterferona 2b humano recombinante, oriundo de processo fermentativo e elaborado a partir de cepa bacteriana estabelecida (bactéria gram negativa), tornando relevante nossa pesquisa. De modo a garantir a qualidade do processo e do produto, todo este levantamento de dados e a própria validação experimental poderá abrir campo para novas pesquisas e desafios nessa área, assim como servir de base para futuros estudos.

A farmacopéia européia preconiza que o biofármaco alfainterferona 2b humano recombinante deve conter no máximo 100 EU/mg de interferon.

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O processo de obtenção do biofármaco alfainterferona 2b humana recombinante tem seu modelo de expressão na bactéria *E. coli*, uma bactéria Gram negativa, de morfologia tipo bastonete, e possuidora de grande quantidade de LPS em sua parede celular. Deste modo, torna-se relevante a padronização e a implementação da técnica para determinar endotoxinas (LAL) junto ao Controle de Qualidade, visando o aprimoramento científico e o incremento de técnicas de controle, tornando-as cada vez mais compatíveis com a natureza dos produtos fabricados, além de contribuir para o controle de processo de purificação do produto alvo.

O presente trabalho destina-se à padronização, validação e adequação da técnica do Limulus Amebocyte Lysate (LAL) para a determinação dos níveis de endotoxinas bacterianas no Biofármaco Alfainterferona 2b humana recombinante, desde os produtos intermediários até o produto final. Para tanto, foram estudados os métodos gel-clot e cinético-cromogênico, no Setor de Bioquímicos e Moleculares, do Laboratório de Controle Microbiológico do Departamento de Controle de Qualidade.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os diferentes tipos de interferentes que possam afetar o desempenho do teste, tais como  $\beta$ -glucanos, derivados de processos fermentativos, celulose, etc.).
- Comparar o teste *in vitro* com resultados obtidos no teste de pirogênio *in vivo* (coelhos) e avaliar os limites de detecção de ambos os métodos.
- Executar os experimentos de validação analítica de, no mínimo, 3 lotes de produto final e/ou produto intermediário (Ingrediente Farmacêutico Ativo).
- Avaliar o desempenho do método cinético-cromogênico por ensaios de pré-validação com Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA).

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras de Alfainterferona 2b Humana Recombinante

Para fins de padronização e validação, foram solicitadas amostras do produto acabado parenteral alfainterferona 2b humana recombinante, do arquivo do Departamento de Controle de Qualidade, identificadas de duas formas: a) Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA) e b) produto acabado final, garantindo desta forma uma amostragem significativa para os ensaios de validação.

Na tabela 3.1 encontra-se a lista de produtos e seus respectivos lotes utilizados durante a execução do trabalho.

**Tabela 3.1: Relação de lotes de IFA e produto acabado.**

Produto	Lote
Ingrediente Farmacêutico Ativo	01IFA0602
Ingrediente Farmacêutico Ativo	01IFA0603
Ingrediente Farmacêutico Ativo	01IFA0605
Ingrediente Farmacêutico Ativo	01IFA0702
Alfainterferona 2b Humana Recombinante 3MUI	074BIA002Z
Alfainterferona 2b Humana Recombinante 3MUI	076BIA003Z
Alfainterferona 2b Humana Recombinante 3MUI	079BIA005A
Alfainterferona 2b Humana Recombinante 3MUI	04UBIA008Z
Alfainterferona 2b Humana Recombinante 3MUI	079BIA009Z
Alfainterferona 2b Humana Recombinante 10MUI	04UBIC001Z
Alfainterferona 2b Humana Recombinante 10MUI	052BIC001Z
Alfainterferona 2b Humana Recombinante 10MUI	066BIC001Z

Para compor o escopo inicial deste trabalho foi realizada uma etapa de pré-validação, que compreendeu toda a pesquisa de endotoxinas no Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA), com objetivo de traçar um perfil analítico do mesmo, antes de se analisar o produto acabado, facilitando assim a validação propriamente dita e a verificação de possíveis interferentes.

#### 3.2 Reagente Limulus Amebocyte Lysate (LAL)

O reagente LAL foi desenvolvido para ser usado como um teste de endotoxina *in vitro* para produtos acabados parenterais, produtos biológicos e dispositivos médicos de uso humano e animal. Não é indicado para detecção de endotoxinas em amostras clínicas ou como ajuda no diagnóstico de doenças humanas. O método cinético-

cromogênico se baseia numa preparação de Lisado de Amebócito *Limulus* (LAL), combinado com o cromógeno p-nitroanilina (pNa) e um programa informatizado apropriado, para detecção fotométrica de endotoxina. No caso do método gel-clot, este é baseado na capacidade que o LAL tem de gelificar na presença de endotoxina. A reação ocorre em tubos de ensaio apropriados e mantidos à temperatura de 37°C em banho-maria durante 01 hora.

A tabela 3.2 apresenta os diferentes lotes do reagente LAL empregados para os ensaios de pré-validação e validação, tanto do método cinético-cromogênico quanto para o método do gel-clot.

**Tabela 3.2: Lotes de reativo LAL dos ensaios de pré-validação e validação.**

Método	Lote	Validade
LAL Cinético	W1942E	01/2009
	Y4152E	07/2010
LAL Gel Clot	X4321L	08/2010

Neste trabalho foi utilizado o reagente LAL da empresa Charles River Laboratories e os certificados dos lotes encontram-se no anexo 1.

Os procedimentos a serem apresentados estão em conformidade com aqueles descritos no Guia do FDA. Exigências similares de desempenho para ensaios com LAL têm sido publicadas e regularmente atualizadas nas Farmacopéias americana e Européia.

### **3.3 Endotoxina Padrão**

Para a execução do trabalho, foi utilizado o lote EX72972 da endotoxina padrão do próprio fabricante do reagente LAL (Charles River Laboratories) para o preparo das curvas cinéticas e como controle positivo. Trata-se, portanto, de uma endotoxina padrão extraída e purificada de bactéria *E.coli* e sua potência certificada contra um padrão ouro internacional. Os certificados dos reagentes encontram-se nos anexos 1, 2 e 3.

### 3.4 Ferramenta de Informática

O programa Endoscan-V, versão 3.1.4, faz parte do pacote e serviços da empresa Charles River Laboratories e foi utilizado nos ensaios fotométricos. Acoplado a um leitor de microplacas, modelo ELX 808, e um filtro de 405 nm, o programa recebe os dados emitidos pelo leitor e os traduz em curvas cinéticas, à temperatura de 37<sup>0</sup>C, com intervalos de reação pré-determinados, perfazendo desta forma, aproximadamente, 100 leituras/hora.

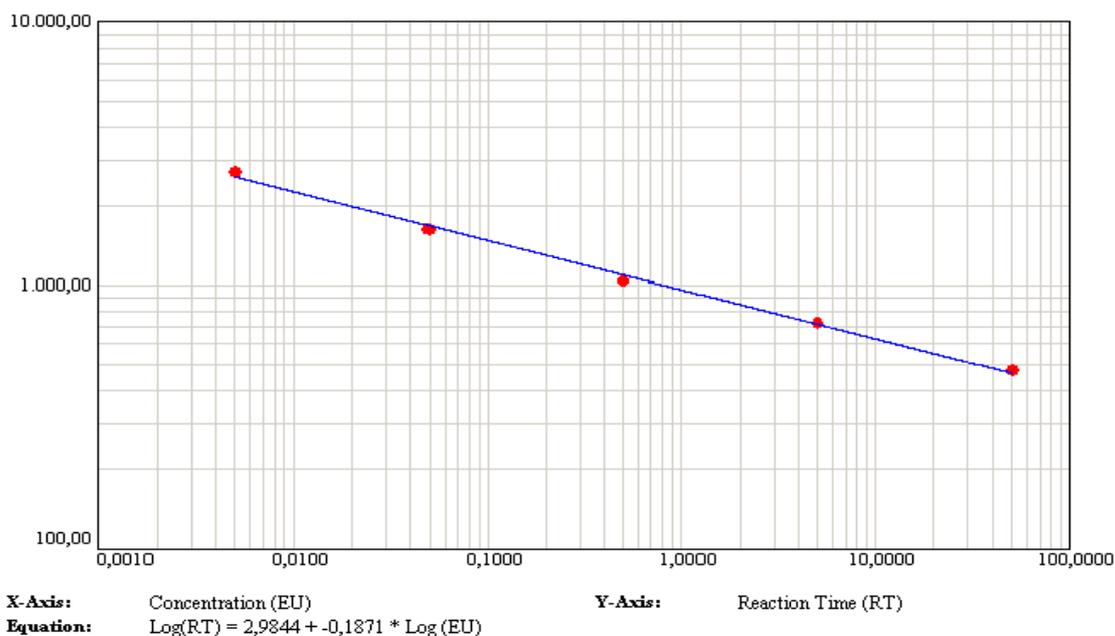
Uma vez criado o arquivo pelo Endoscan-V, gerando um relatório próprio, o mesmo pôde ser visto e impresso por analistas e modificado somente pelo administrador, garantindo desta forma um perfil de segurança e confiabilidade operacional. As senhas foram criadas pelo administrador e possuem um tempo previsto para sua expiração, além de personalizar uma assinatura própria.

### 3.5 Ensaio RSE/CSE

Para se determinar a potência de um Controle Padrão de Endotoxina (CSE) em termos de unidades de concentração, frente a um Padrão USP de referência de Endotoxina (RSE), é realizado um ensaio de RSE/CSE, pelo fabricante. Esta informação deve estar contida no certificado do reagente.

O ensaio requer uma série única de diluições de RSE e uma ou mais diluições do CSE. Dependendo das unidades de concentração do CSE, o *software* computa automaticamente os valores potenciais médios em termos de UE/ng ou UE/mL. O usuário também tem a opção de entrar com outras unidades além de UE ou ng.

De forma a calcular as concentrações de endotoxina em amostras desconhecidas, todo o ensaio de validação seja cinético ou gel-clot, foi referenciado a uma curva-padrão. Devido à larga faixa de concentração, em que os valores de endotoxina podem ser determinados, é possível ajustar a faixa quantitativa de qualquer teste, através do ajuste da concentração dos padrões de endotoxina usados para gerar uma curva-padrão. Um mínimo de três pontos é requerido. Nos ensaios, foram realizadas curvas-padrões com 05 pontos nos dois métodos, como apresentados na **figura 3.1**.



**Figura 3.1:** Exemplo de uma curva cinética emitida pelo *software* Endoscan, onde o eixo X é a concentração em UE/mL e Y o tempo reação em segundos

### 3.6 Água apirogênica

A água estéril para injetáveis (WFI) é a principal matéria-prima e possível fonte de contaminação por endotoxinas, especialmente na indústria farmacêutica. É utilizada na preparação e no processamento de produtos injetáveis, além do seu uso nos processos de limpeza e higienização. Portanto, é imperativo assegurar sua qualidade. Em Bio-Manguinhos esta tarefa é do Controle de Qualidade, que avalia a ausência de microrganismos viáveis e substâncias pirogênicas, além de outras características como pH, condutividade e compostos orgânicos dissolvidos.

Para minimizar qualquer tipo de interferente nos ensaios de pré-validação e validação, foi utilizado o lote 078DVA045Z de água estéril para injetáveis da Vacina Tríplice viral, aprovado pelo Controle de Qualidade com data de vencimento em 08/2012.

### 3.7 Condições de Armazenamento das Amostras

O reagente LAL, a endotoxina padrão, a água apirogênica e as amostras de produto acabado final de alfa interferona 2b humana recombinante foram mantidas à temperatura de 2 a 8°C. No caso da IFA, as mesmas foram armazenadas a -20°C, temperatura recomendada pelo cedente da transferência de tecnologia, somente sendo descongelada e mantida em 2 a 8°C para realização do ensaio de pré-validação.

Foram tomadas todas as precauções requeridas para proteger os materiais isentos de pirogênio de uma eventual contaminação ambiental subsequente no

Laboratório de Controle Microbiológico que possui salas adequadas para este tipo de trabalho.

### **3.8 Medidas de pH**

Foi utilizado o medidor de pH do fabricante Corning Modelo 445 (Série 001832) para definir a acidez, neutralidade ou alcalinidade da mistura de amostra com o reagente LAL e garantir que a mesma estivesse dentro da faixa ótima de pH (7 a 8) recomendada pelo fabricante do teste, seja para o ensaio cinético-cromogênico ou gel-clot.

### **3.9 Outros Materiais utilizados na Padronização**

Para realização dos diferentes ensaios foi necessário uma série de equipamentos e materiais acessórios básicos de um laboratório de bioquímica como descrito na tabela 3.3 e outros como:

- Tubos de diluição em borossilicato ou equivalentes;
- Tubos de reação apirogênicos;
- Ponteiras estéreis ou equivalentes;
- Micropipetas calibradas;
- Microplacas de 96 orifícios apirogênicas com certificado do fabricante;
- Estante para tubos de ensaios;
- Parafilme;
- Agitador de tubos;
- Banho-Maria a 37<sup>0</sup>C sem agitação;
- Hidróxido de sódio 0,1N diluído em água apirogênica;
- Ácido Clorídrico 0,1N diluído em água apirogênica.

**Tabela 3.3:** Equipamentos e materiais acessórios.

Descrição	Marca	Modelo	Série / TAG	Calibração	Validade	Certificado
Leitor de Microplacas	Bio-Tek	ELX 808	LTE-14-003	16/05/2008	09/2009	1685/2008
Micropipeta monocanal	Gilson P100	Pipetman	V14-101 (TAG antigo)	15/02/2008	15/11/2008	V14-101/5
			V699	21/11/2008	21/08/2009	V699/6
Micropipeta monocanal	Gilson P20	Pipetman	V14-005	03/05/2008	03/02/2009	V14-005/10
Micropipeta monocanal	Gilson P1000	Pipetman	V14-044	20/04/2008	20/01/2009	V14-044/6
Micropipeta monocanal	Labsystem P1000	Finnpipette	V14-121	19/04/2008	19/01/2009	V14-121/4
Pipeta de repetição	Gilson	Distri-man	V819	25/11/2008	25/08/2009	V819/1

### 3.10 Método Gel Clot

#### 3.10.1 Preparo do Reagente LAL

O manual do fabricante recomenda a armazenagem do líofilo do reativo LAL à temperatura de 2°C a 8°C e que o mesmo seja reconstituído com 5,2 mL de água apirogênica, homogeneizando levemente para evitar a formação de espuma; e deve-se aliquotar pequenas amostras com volumes de uso. Uma vez reconstituído, manter a -20°C, sendo que o mesmo só deve ser descongelado uma única vez.

#### 3.10.2 Controle positivo e Curva-padrão

A partir de três soluções estoque, de concentração conhecida de endotoxina, foram realizadas diluições para se atingir uma concentração final de 5 UE/mL, conforme demonstrado na tabela 3.4.

**Tabela 3.4:** Curva-padrão de endotoxina

Série	Estoque (UE/mL)	Diluição	Endotoxina (µL)	Diluyente (µL)	Volume Final	Concentração UE/mL
1	20	1:4	200	600	800	5
2	40	1:8	100	700	800	5
3	50	1:10	100	900	1000	5

Antes da primeira etapa da diluição, o frasco padrão de endotoxina foi agitado durante 15 minutos e, a cada diluição subsequente, durante 2 minutos.

Cada série foi diluída consecutivamente até serem obtidas soluções de endotoxina nas concentrações de: 5; 2,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,03 [UE/mL]. Porém, somente os 4 últimos pontos foram utilizados para a curva-padrão.

A curva-padrão foi composta dos seguintes pontos, sendo cada ponto designado como:  $2\lambda$  (0,25),  $\lambda$  (0,125),  $\lambda/2$  (0,06),  $\lambda/4$  (0,03), onde  $\lambda$  representa a sensibilidade do teste.

Foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição para compor a curva-padrão e transferidos para tubos de reação específicos, onde ocorrerá a reação de gelificação, sempre com resultado binário (+) ou (-).

O manual do fabricante aconselha utilizar como controle positivo o ponto  $2\lambda$  da curva-padrão e controle negativo a água de diluição sabidamente apirogênica.

### 3.10.3 Cálculo do MDV (máxima diluição válida do produto)

Para dar início ao cálculo da máxima diluição do produto, foi necessário converter as milhões de unidades internacionais do produto alfainterferona 2b humana recombinante em miligramas, uma vez que os requerimentos farmacopéicos expressam o resultado para o produto em “unidades de endotoxina por massa de produto” e não unidades internacionais (UI).

#### Conversão em mg de Interferon 3MUI:

Se 1mg de IFN –  $1,4 \times 10^8$  UI – dado farmacopéico

Logo,  $3 \times 10^6$  UI ou 3 MUI = 0,02143 mg

$$\text{MDV} = \frac{\text{Limite} \times \text{Concentração}}{\text{Sensibilidade}}$$

Então, 
$$\text{MDV} = \frac{100 \text{ EU/mg} \times 0,02143 \text{ mg/mL}}{0,125 \text{ EU/mL}} = 17,144$$

Para a apresentação do produto na concentração de  $3 \times 10^6$  UI a máxima diluição válida é de 1:17, ou seja, nos ensaios de determinação de endotoxina o produto não pode exceder uma diluição de 1:17.

### 3.10.4 Reconstituição e diluição das amostras de alfainterferona

Para a reconstituição das amostras de alfainterferona 2b humana recombinante foi utilizado 1,0 mL de diluente (WFI) apirogênico como descrito na bula fornecida com o produto. Entre as etapas de diluições, as amostras foram agitadas em vortex por 2 minutos, até se obter o esquema de diluição mostrado na tabela 3.5.

**Tabela 3.5:** Diluição das amostras de alfainterferona conforme MDV

Diluição	Volume de produto	Volume de diluente
1:2	500 µL	500 µL
1:4	500 µL da diluição 1:2	500 µL
1:8	500 µL da diluição 1:4	500 µL
1:16	500 µL da diluição 1:8	500 µL

O manual do fabricante preconiza utilizar 100 µl de cada diluição das amostras, em quadruplicata, para os tubos específicos de reação. Foi testada também a amostra pura, sem diluição.

### 3.10.5 Análise de Interferentes

A concentração de 2λ de endotoxina constitui o controle positivo do produto (CPP) e deve ser aditada em cada diluição de amostra-teste para verificação da inibição pelo produto durante a validação. As diluições que não inibirem o CPP poderão ser utilizadas nos ensaios de rotina, desde que pré-estabelecidas como não inibitórias.

### 3.10.6 A reação

Após a transferência das amostras, controles e curva-padrão para os tubos de reação, adicionar 100 µL do reagente LAL (sensibilidade 0,125 UE/mL), com auxílio de micropipeta repetidora. Todas as amostras devem ser agitadas de forma homogênea e levemente. Colocar a estante com os tubos em banho-maria, sem agitação, a uma temperatura de 37<sup>o</sup>C durante 1 hora. Durante a incubação o controle de temperatura deve ser monitorado no intervalo de 36,5 - 37,5 <sup>o</sup>C.

### 3.10.7 Leitura e interpretação

O critério de leitura da positividade ou não de cada amostra deve se dar conforme as instruções do fabricante, ou seja, verter cada tubo a uma inclinação de 180<sup>o</sup> em relação ao eixo central. O resultado é positivo quando, após inversão do tubo, a amostra teste gelificar; o resultado é considerado negativo quando a amostra teste escoar.

### 3.10.8 Critérios de Aceitação do teste

Como o método do gel-clot é um ensaio semiquantitativo, o manual do fabricante preconiza alguns critérios para aceitação do resultado binário: a) o ponto da curva 0,25 UE/mL obrigatoriamente precisa gelificar para ser considerado positivo; b) o ponto 0,03 UE/mL não deve gelificar para ser considerado negativo; c) os pontos 0,125 e 0,06

UE/mL podem ou não gelificar; d) o controle negativo obrigatoriamente não deve gelificar.

### 3.10.9 Ensaio de Validação

Todos os ensaios de validação foram conduzidos de acordo com os protocolos de validação pré-estabelecidos pelo laboratório de metrologia e validação (LAMEV) de Bio-Manguinhos em parceria com a seção de testes moleculares e imunocitoquímica (SETBI), de acordo com o guia do FDA (1987), Farmacopéia Européia e ANVISA, os mesmos encontram-se no anexo I. Para o ensaio do gel-clot, o protocolo foi designado como: Protocolo de Validação de LAL Gel Clot para o Biofármaco Alfainterferona 2b Humano Recombinante 3MUI e 10MUI – número 3314 (anexo 5). A tabela 3.6 mostra os parâmetros de validação para o ensaio.

**Tabela 3.6:** Parâmetros da Validação para o método do gel-clot.

Nº	Parâmetros de Avaliação	Conclusão
1	Limite de detecção	0,125EU/mL
2	Equivalência entre analistas e lotes	OK
3	Especificidade	Cálculo da máxima diluição válida (MDV) Teste de fatores de interferência na técnica não deverá haver interferentes na análise até o valor da máxima diluição válida.

### 3.10.10 Cálculo da concentração de endotoxina na amostra-teste

Deve-se multiplicar o fator da menor diluição que apresentou negatividade (-) pela sensibilidade do teste (0,125 EU/mL) e o resultado final precedido do sinal de “menor do que” (< ..... UE/mL).

### 3.11 Método Cinético-Cromogênico

Para garantir a precisão ou validade das técnicas cromogênicas, os testes preliminares são conduzidos para certificar que os critérios para a curva-padrão - linearidade e desvio-padrão relativo - são válidos e que as amostras não inibem ou potencializam a reação (nível de recuperação do CPP).

### 3.11.1 Reconstituição da Endotoxina padrão

O manual do fabricante recomenda reconstituir a endotoxina liofilizada com a quantidade de água apirogênica previamente estabelecida como descrito nos procedimentos. Após reconstituição e antes de se iniciar a curva-padrão, é aconselhado agitar a solução em vortex por 15 minutos e estocar em 2° C a 8°C no máximo por quatro semanas. Da mesma forma, os pontos da curva-padrão após diluição devem ser agitados por 02 minutos, a fim de evitar a formação de agregados e manter a homogeneidade.

### 3.11.2 Preparo da Curva-Padrão

A partir da endotoxina padrão reconstituída e agitada 15 minutos, deve-se preparar não menos que três diluições para compor uma curva-padrão. A tabela 3.7 sugere um esquema a ser seguido para construção da curva-padrão. O ensaio deve ser realizado em triplicata para cada ponto, amostras aditadas (spike) e o controle negativo, de acordo com as instruções do fabricante de LAL. Nem todas as diluições necessitam ser utilizadas para compor a curva. Esquemas alternativos de diluições podem ser usados, assim como outras endotoxinas não contidas nos procedimentos do manual do fabricante. Este mesmo tipo de esquema foi aplicado no protocolo de validação do método para o teste de linearidade para verificar a avaliação de desempenho do mesmo.

**Tabela 3.7:** Construção da Curva-Padrão.

Concentração final de endotoxina (EU/mL)	Volume de WFI apirogênica	Volume de solução de endotoxina adicionada
5	900 µL	100 µL de solução 50 UE/mL
0,5	900 µL	100 µL de solução 5UE/mL
0,05	900 µL	100 µL de solução 0,5 UE/mL
0,005	900 µL	100 µL de solução 0,05 UE/mL.

Após diluição e agitação já mencionadas, são transferidos 100 µL de cada ponto para as respectivas cavidades de uma placa de 96 orifícios, de acordo com o esquema de cada análise e número de amostras a serem avaliadas. Sendo assim, para configuração da placa, podem ser utilizadas amostras em duplicata ou triplicata, sendo esta última a configuração adotada neste trabalho. O controle negativo utilizado deve ser uma água padrão sabidamente apirogênica.

### 3.11.3 Cálculo da Máxima Diluição Válida (MDV)

A bula do biofármaco alfainterferona 2b humana recombinante preconiza no item de posologia para pacientes com Sarcoma de Kaposi, a dose máxima de 30.000.000 UI/m<sup>2</sup>/dia (30 MUI). Este dado foi confirmado pela análise de outras bulas do mesmo medicamento disponíveis para comercialização. Desta forma, o dado foi utilizado para se fazer o cálculo do limite de endotoxina que poderia ser encontrado no produto e considerado como aceitável por parâmetros farmacopeicos. Tomou-se como padrão a altura média de 1,8 m e 70 kg de peso, a fórmula mostra o cálculo do limite de endotoxina para o produto no caso mais drástico.

$$\text{Limite de endotoxina (LE)} = \frac{5 \text{ UE/kg}}{\frac{30.000.000 \text{ UI/m}^2 \times 1,8 \text{ m}^2}{70 \text{ kg}}}$$

Onde 5 EU/kg = representa a dose máxima permitida capaz de gerar reação pirogênica (dado farmacopeico).

No caso mais drástico, onde seria aplicada a maior concentração de produto permitida, o limite de endotoxina foi de 0,000006481 UE/UI. Foi possível, desta forma, calcular o MDV para cada apresentação de produto, conforme tabela 3.8, pela seguinte fórmula;

$$\text{MDV} = \frac{\text{LE} \times \text{concentração (UI/mL)}}{\text{sensibilidade do teste}}$$

**Tabela 3.8: Cálculo do MDV para o método cinético-cromogênico**

Apresentação do produto	LE (UE/UI)	MDV (UI/mL)
3.000.000 UI	0,000006481	3888,6
5.000.000 UI	0,000006481	6481
10. 000.000 UI	0,000006481	12962

### 3.11.4 Reconstituição e diluição das amostras de alfainterferona

Para a reconstituição das amostras de alfainterferona 2b humana recombinante foi utilizado 1,0 mL de diluente (WFI) apirogênico, como descrito na bula fornecida com o produto. Para este ensaio foram utilizadas amostras de alfainterferona nas apresentações de 3 e 10 MUI. Entre as etapas de diluições, as amostras foram agitadas por 2 minutos até se obter o esquema de diluição mostrado na tabela 3.9.

**Tabela 3.9: Diluição das amostras de alfainterferona**

Diluição	Volume de produto	Volume de diluente
<b>3 MUI</b>		
1:10	200 µL	1 800 µL
1:20	500 µL da diluição 1:10	500 µL
1:40	500 µL da diluição 1:20	500 µL
1:80	500 µL da diluição 1:40	500 µL
<b>10 MUI</b>		
1:10	100 µL	900 µL
1:80	100 µL da diluição 1:10	700 µL
1:100	100 µL da diluição 1:10	900 µL
1:160	100 µL da diluição 1:10	1 500 µL
1:200	100 µL da diluição 1:10	1 900 µL

De cada amostra, em triplicata, foram transferidos 100 µL das diluições para os orifícios da microplaca. Pela experiência adquirida nos testes de pré-validação com IFA, não foi necessário diluir as amostras até o MDV calculado. No entanto, a metodologia aplicada teria a mesma validade se fossem seguidas diluições até o MDV.

### 3.11.5. Análise de interferentes

Adicionalmente à microplaca, são colocadas amostras aditadas com concentração conhecida de endotoxina (Spike), para se avaliar o grau de interferência e calcular a recuperação da endotoxina adicionada. Neste trabalho, foi eleito o ponto de 5,0 UE/mL como Spike, onde se almeja uma recuperação na faixa de 50 – 200%. Quando os valores de recuperação de endotoxinas estiverem fora das faixas especificadas, os fatores de interferência devem ser removidos. A eficiência do tratamento das amostras é verificada pela repetição do teste em outras diluições, para remoção de interferentes. A faixa ideal de recuperação situa-se próximo de 100%, o que não significa dizer que um produto não pode ser validado com recuperações inferiores ou superiores, pois nem sempre a remoção dos interferentes é alcançada.

### 3.11.6 Reação

Reconstituir o reagente LAL cinético com 3,2 mL de água apirogênica, como especificado na bula do reagente, e agitar levemente sem formar espuma.

Adicionar 100 µL do lisado, reconstituído na hora, a toda placa, com auxílio de pipeta repetidora. Proceder a leitura em leitor de microplacas com programa previamente configurado.

### 3.11.7 Leitura e interpretação

A figura 3.2 exibe um modelo de placa cinética configurada pelo *software* ENDOSCAN, neste caso, com a curva-padrão, controle negativo e amostras aditadas em triplicata.

Template												
	Read Number: 113			Read Time: 3360			Replicates: 3					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	STD1	STD1	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN
B	STD2	STD2	STD2	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN
C	STD3	STD3	STD3	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN
D	STD4	STD4	STD4	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN
E	STD5	STD5	STD5	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN
F				IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN
G				IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN
H	CONT NEG	CONT NEG	CONT NEG	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN	IFN

**Figura 3.2:** Modelo de placa cinética

Azul = amostras; Vermelho = amostras com spike; Verde = controle negativo; Preto = curva-padrão.

Depois de transcorrido o tempo de reação de aproximadamente uma hora, ocorre o aparecimento de coloração amarelada, que se deve ao cromógeno liberado na reação enzimática descrita anteriormente.

Os resultados são impressos para avaliação dos níveis de endotoxinas, assim como os parâmetros do teste (Coeficiente de correlação da curva, Coeficiente de Variação, Desvio-Padrão, etc), pré-estabelecidos no protocolo de validação do método.

### 3.11.8 Ensaios de Validação

Todos os ensaios de validação foram conduzidos de acordo com os protocolos de validação pré-estabelecidos pela Seção de Testes Moleculares e Imunocitoquímica (SETBI) em parceria com o Laboratório de Metrologia e Validação (LAMEV) de Bio-Manguinhos, de acordo com o guia do FDA (1987), Farmacopéia Européia e ANVISA (anexo 4).

- Protocolo de Validação de LAL Cinético Cromogênico para o Biofármaco Alfainterferona 2b Humano Recombinante 3MUI e 10MUI – número 3313.

### 3.11.9 Critérios de Aceitação

Para o método cinético-cromogênico foram definidos os parâmetros de validação e suas especificações como descritos na tabela 3.10.

**Tabela 3.10: Parâmetros de validação do método cinético-cromogênico.**

Parâmetro	Especificação
Coefficiente de correlação da curva-padrão  R	-1 a -0,98
Inclinação da curva-padrão (slope)  a	-0,3 a -0,1*
y-interseção da curva padrão  b	+2,5 a +3,5
% de recuperação do controle positivo do produto	50 a 200%
% do coeficiente de variação das replicatas	Até 10% (para valores superiores ao $\lambda$ )
Faixa de leitura da curva-padrão (range)	2-3 log

\* Mais severo que o Guideline do FDA (-1,0 a -0,1)

### 3.11.10 Comparações com o teste de pirogênio *in vivo*

Todos os lotes de produto acabado (IFN 3MUI e 10MUI) utilizados nesta padronização e validação foram avaliados no teste de pirogênio *in vivo* pelo Setor de Controle Biológico (SEBIO), para liberação do produto final. Estes dados foram disponibilizados para análise comparativa com os dados obtidos no teste *in vitro*, e serão discutidos posteriormente.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento analítico deste trabalho, foram utilizadas amostras de IFA com o objetivo inicial de avaliar a melhor diluição “incapaz” de inibir o controle positivo do produto (CPP), no qual designamos como pré-validação, para o biofármaco alfainterferona 2b humano recombinante, e avaliar o quanto o método de LAL é capaz de reproduzir estes resultados na mesma diluição “eleita pelo teste de interferência” – *repetibilidade do método* - para que, desta forma, a endotoxina bacteriana, caso presente, possa ser detectada de forma segura.

Embora o objetivo central seja a validação do produto acabado nas apresentações 3MUI e 10 MUI, tornou-se relevante conhecer o perfil de compatibilidade e o grau de inibição da matéria-prima no método de LAL, para fins de rastreamento analítico e futuro controle de processo.

### 4.1 Quantificação dos níveis de endotoxinas no Ingrediente Farmacêutico ativo (IFA) – Pré-Validação.

#### 4.1.1 Verificação do pH

O perfil de pH da mistura “LAL + Amostra de IFA” é uma parte essencial da validação de produtos de forma geral, principalmente para produtos tamponados, como o caso das amostras de IFA, pois em sua etapa de purificação final o concentrado protéico é transferido para em tampão fosfato, para posteriormente ser armazenado. Como recomendado na metodologia foi mensurado o pH de cada amostra e não houve a necessidade de ajuste dos mesmos. A tabela 4.1 mostra as medidas executadas nas amostras.

**Tabela 4.1:** Perfil de pH das amostras de IFA

<b>Amostra Lote IFA + LAL</b>	<b>Medida de pH</b>
01IFA0602	7,0
01IFA0603	7,0
01IFA0605	7,0
01IFA0702	7,0

Como o reativo LAL é extremamente sensível a pH em soluções tamponadas, pois cátions divalentes podem alterar significativamente o reativo, mesmo que as amostras tenham sido diluídas. No entanto, para o escopo inicial do trabalho foi fundamental verificar o pH da mistura LAL + amostra e excluir a possibilidade de interferência por pH, uma vez que as amostras de IFA são tamponadas e possui íons potássio em sua formulação.

#### 4.1.2 Verificação da Interferência em IFA

Foi empregado o ensaio de LAL quantitativo Cinético-Cromogênico para determinação dos níveis de endotoxinas. Os resultados obtidos com as diluições seriadas de IFA para avaliação do perfil de compatibilidade e verificação dos fatores de interferência estão apresentados na tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Perfil de Compatibilidade de amostras de IFA.

Lote	Diluição	Dosagem de Endotoxina em EU/mL	Recuperação do spike (%)
<b>01IFA0602</b>	1:10	0,8892	31
	1:20	0,7289	80
	<b>1:40</b>	<b>0,6672</b>	<b>99</b>
	1:80	0,6722	120
<b>01IFA0605</b>	1:10	0,4289	25
	1:20	0,5483	72
	<b>1:40</b>	<b>0,9575</b>	<b>92</b>
	1:80	1,0858	119
<b>01IFA0603</b>	1:10	0,1482	14
	1:20	0,1850	79
	<b>1:40</b>	<b>0,3736</b>	<b>92</b>
	1:80	0,7108	127
<b>01IFA0702</b>	1:10	1,0732	46
	1:20	0,7894	121
	<b>1:40</b>	<b>0,8494</b>	<b>131</b>
	1:80	0,7267	153

EU: Unidades de endotoxina

IFA é o concentrado protéico oriundo do processo de produção e previamente esterilizado por filtração em membranas, o qual será utilizado para a formulação do produto acabado, onde teoricamente teríamos uma maior concentração de endotoxina bacteriana. O ensaio de pré-validação teve como objetivo determinar a diluição compatível com o reativo LAL e qualquer interferente (solubilidade, pH, água utilizada, resíduos de solvente, presença de polissacarídeos) que possa alterar os resultados de dosagem e recuperação.

O perfil de compatibilidade avalia a concentração compatível do produto (por diluição seriada) de forma a não reforçar ou inibir a recuperação das amostras, sem que haja interferência; portanto, a quantificação de endotoxinas em uma dada amostra torna-se confiável. A agregação de micelas, uma vez que a endotoxina é uma molécula grande com regiões lipofílicas e hidrofóbicas pode diminuir a reatividade do LAL. A tabela 4.2 aponta que a diluição de 1:40 demonstrou menos interferência, o que se observa nos valores de recuperação encontrados, com exceção do lote 01IFA0702, que apresentou um nível de interferência mais elevado, o que não invalida a análise, pois a USP e a Farmacopéia Européia oferecem uma faixa de 50 a 200% de recuperação.

Com relação aos parâmetros de análise citados nos “Critérios de Aceitação” em “Materiais e Métodos” para o teste cinético, todos foram alcançados de modo satisfatório, sendo linearidade da curva-padrão ( $R = -1$  a  $-0,98$ ), inclinação ( $-0,3$  a  $-0,1$ ), interseção ( $+2,5$  a  $+3,5$ ) e coeficientes de variação da curva-padrão e amostras ( $< 10\%$ ), tornando o ensaio válido.

#### 4.1.3 Verificação da Repetibilidade

Embora não se trate ainda da validação propriamente dita, foram conduzidos ensaios para verificação da repetibilidade do método conforme mostra a tabela 4.3, a fim de garantir que, numa mesma diluição (1:40) da matéria-prima, o método demonstre precisão.

**Tabela 4.3.1:** Repetibilidade do sistema numa mesma diluição lote 01IFA0602

01IFA0602 Diluição	Coefficiente de Variação <10%	Dosagem de Endotoxina em EU/mL	Recuperação (%)
1:40	1,71	0,6513	112
1:40	0,96	0,5965	97
1:40	0,81	0,6020	95
1:40	2,11	0,6094	112
1:40	2,18	0,7488	93
1:40	0,11	0,5732	84
1:40	0,13	0,5045	84
1:40	0,23	0,5878	108
1:40	9,30	0,8828	97
1:40	1,38	0,5628	95
1:40	1,68	0,5679	96
1:40	2,34	0,5447	97

**Tabela 4.3.2:** Repetibilidade do sistema numa mesma diluição lote 01IFA0603

01IFA0603 Diluição	Coefficiente de Variação <10%	Dosagem de Endotoxina em EU/mL	Recuperação (%)
1:40	1,04	0,6034	106
1:40	1,32	0,7935	89
1:40	1,68	0,6327	88
1:40	3,37	0,5952	107
1:40	1,91	0,6205	80
1:40	1,51	0,6192	85
1:40	2,22	0,6097	98
1:40	1,88	0,6265	91
1:40	0,71	0,6818	91
1:40	0,97	0,6300	95

**Tabela 4.3.3:** Repetibilidade do sistema numa mesma diluição lote 01IFA0605

01IFA0605 Diluição	Coefficiente de Variação <10%	Dosagem de Endotoxina em EU/mL	Recuperação (%)
1:40	1,02	0,6557	177
1:40	0,77	0,4888	166
1:40	0,80	0,7259	160
1:40	2,30	0,5212	188
1:40	2,23	0,5063	156
1:40	0,25	0,5962	146
1:40	2,1	0,5755	153
1:40	0,29	0,5515	189
1:40	9,17	0,5349	164
1:40	1,51	0,6254	159
1:40	1,77	0,8593	153
1:40	2,12	0,4919	136

**Tabela 4.3.4:** Repetibilidade do sistema numa mesma diluição lote 01IFA0702

01IFA0702 Diluição	Coefficiente de Variação <10%	Dosagem de Endotoxina em EU/mL	Recuperação (%)
1:40	1,01	0,6421	120
1:40	0,62	0,5831	120
1:40	1,51	0,5251	128
1:40	1,11	0,6815	155
1:40	3,57	0,6741	117
1:40	2,51	0,5393	112
1:40	3,98	0,6329	109
1:40	1,19	0,5852	125
1:40	1,96	0,6047	99
1:40	1,54	0,6167	104
1:40	2,80	0,7366	108
1:40	1,29	0,6689	130

O teste de repetibilidade foi confirmado por 10 a 12 repetições do ensaio por amostra e os resultados das dosagens nas tabelas 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.4 expressam a média de 03 medidas. Os coeficientes de variação da concentração de endotoxinas calculados se mantiveram abaixo de 10% e as recuperações satisfatórias, obedecendo ao intervalo pré-estabelecido de 50 a 200% pelo FDA, USP e Farmacopéia Européia.

#### **4.1.4 Análise através de medidas de tendência central e variação (média, amplitude, desvio-padrão e coeficiente de variação)**

De acordo com os dados observados nas tabelas 4.3, foi possível calcular a média, amplitude, desvio-padrão e coeficiente de variação (CV) das amostras de IFA de acordo com a tabela 4.4.

A média (aritmética) foi calculada pela fórmula  $\frac{\sum x}{n}$ .

Onde  $\sum x$  representa a soma de todos os valores encontrados e “n” o número total de valores obtidos.

O desvio-padrão de um conjunto de valores amostrais é uma medida de variação dos valores em relação à média e é calculado pela fórmula:

$$\text{Desvio padrão} = \sqrt{\frac{\sum (x - \text{média})^2}{[n]}}$$

O coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo é calculado utilizando a fórmula:

$$CV = \frac{\text{Desvio-Padrão} \times 100}{\text{Média}}$$

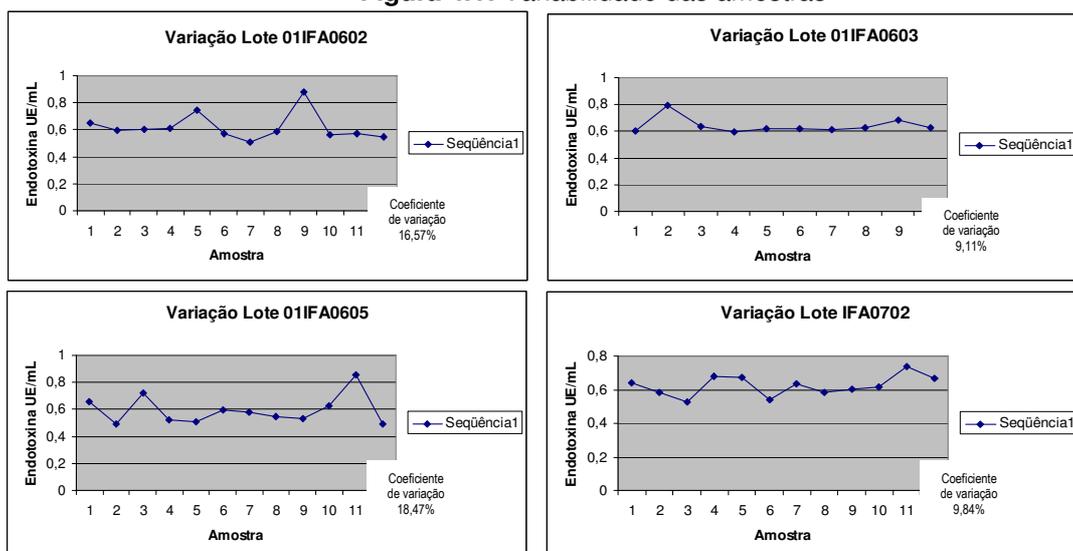
**Tabela 4.4:** Análise estatística dos resultados

Lote de IFA	Média	Amplitude	Desvio-Padrão	Coefficiente de Variação
01IFA0602	0,6193	<b>0,3783</b>	<b>0,1026</b>	<b>16,57%</b>
01IFA0603	0,6412	0,1983	0,0584	9,11%
01IFA0605	0,5944	<b>0,3705</b>	<b>0,1098</b>	<b>18,47%</b>
01IFA0702	0,6242	0,2145	0,0614	9,84%

Quando os valores encontrados na amostragem se dispersam (variam) mais uns dos outros, percebe-se que o desvio-padrão e coeficiente de variação (CV) sofrem um aumento, como é o caso dos lotes 01IFA0602 e 01IFA0605. Para produtos biológicos, a ANVISA e USP aceitam um CV abaixo de 20% para as amostras. Porém, nos experimentos de validação do produto acabado para o método cinético-cromogênico, foi adotado um CV máximo de 10%.

O conjunto de dados da figura 4.1 expressa a variabilidade encontrada nos lotes 01IFA0602 e 01IFA0605 em comparação com o lote 01IFA0603 que apresentou o menor coeficiente de variação 9,11%.

**Figura 4.1:** Variabilidade das amostras



Seqüência 1: variação.

Em termos de amplitude, o desvio-padrão equivale a “aproximadamente” 1/4 da mesma, o que significa dizer que esta expressão é uma estimativa razoável para o

desvio, quando conhecemos os valores máximos e mínimos. Conhecendo o desvio-padrão podemos utilizá-los para entender melhor os dados, da seguinte maneira:

- mínimo  $\approx$  média  $- 2x$  desvio-padrão
- máximo  $\approx$  média  $+ 2x$  desvio-padrão

Através dos experimentos de pré-validação, pôde-se traçar o perfil de compatibilidade da matéria-prima com o método de LAL cinético-cromogênico na diluição de 1:40, que foi confirmada nos ensaios de repetibilidade do método - precisão. Embora os resultados denotem certo grau de variação e desvio-padrão ( $<0,5$ ), quando analisados estatisticamente, não impactam no método, pois o coeficiente de variação não excedeu a 20%.

A diluição de 1:40 pode ser considerada candidata a validações futuras com o produto IFA para o método em questão, caso seja incluído o “controle de processo” deste insumo em Bio-Manguinhos. Porém, precisam ser realizados mais experimentos de precisão intermediária para finalizar a validação, conforme resolução 899/2003 da ANVISA.

Os níveis de endotoxinas nas IFAs testadas na tabela 4.2 encontram-se dentro das especificações da Farmacopéia Européia ( $<100\text{UE/mg}$ ), estando desta forma, aprovadas no teste de LAL cinético-cromogênico.

#### **4.2 Validação pelo Método Gel-Clot para produto acabado – 3 MUI**

As amostras foram preparadas conforme descrito no manual do fabricante e em materiais e métodos. Embora semiquantitativo, o método gel-clot detecta uma faixa de endotoxinas com sensibilidade de 0,125 EU/mL, expressa resultados binários - positivo (+) ou negativo (-) - sendo, portanto, factível a validação do produto após a demonstração de que o método seja adequado para a análise proposta. Resultados com alto grau de confiança e segurança podem ser alcançados dentro das especificações do produto e com comprovação documental, sendo então capaz de ser internalizado como um ensaio de rotina para o controle de qualidade do produto.

#### 4.2.1 Teste para confirmação da sensibilidade ( $\lambda$ ) e precisão intermediária entre analistas 1 e 2

A sensibilidade do reagente LAL é de extrema importância neste método, pois dela dependerá o cálculo dos valores estimados nas amostras, sendo, então, necessária sua confirmação nos ensaios de validação e rotina.

Para a confirmação da sensibilidade do reagente LAL, foi utilizada uma curva-padrão de endotoxina com 04 pontos, em quadruplicata, como descrito em materiais e métodos. Os dados mostrados nas tabelas 4.5 e 4.6 apresentam o resultado das mesmas amostras ensaiadas por dois analistas, num mesmo dia:

**Tabela 4.5:** Teste para confirmação de  $\lambda$  analista 1

Concentração	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
0,25 EU/mL - $2\lambda$	+	+	+	+
0,125 EU/mL - $\lambda$	+	+	+	+
0,06 EU/mL - $\lambda/2$	-	-	-	-
0,03 EU/mL - $\lambda/4$	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-

**Tabela 4.6:** Teste para confirmação de  $\lambda$  Analista 2

Concentração	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
0,25 EU/mL - $2\lambda$	+	+	+	+
0,125 EU/mL - $\lambda$	+	+	+	+
0,06 EU/mL - $\lambda/2$	-	-	-	-
0,03 EU/mL - $\lambda/4$	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-

Todo o ensaio foi conduzido em banho-maria controlado e monitorado por termômetro calibrado. Após uma hora de incubação, os tubos foram vertidos a uma inclinação de  $180^{\circ}$ .

Ambos os analistas foram qualificados, visto que, no teste para confirmação da sensibilidade do reagente LAL, a menor concentração da solução padrão (0,03UE/mL) apresentou resultado negativo em todas as replicatas. O ponto final da reação foi a concentração de 0,125UE/mL, confirmando a sensibilidade do reagente LAL utilizado, conforme as instruções do fabricante. Os controles positivo e negativo apresentaram resultados satisfatórios.

#### 4.2.2 Teste para Fatores de Interferência e Precisão

A máxima diluição válida (MDV) para alfainterferona 3MUI foi calculada conforme descrito em "Materiais e Métodos", sendo, portanto, 17,144. Para fins desta validação a

amostra foi testada pura e nas seguintes diluições: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 (todas abaixo do valor de MDV), a tabela 4.7 apresenta os dados do analista 1.

Neste ensaio os dados comprovaram que, através dos experimentos de interferência e curvas de amostras, a diluição mais segura do produto sem que haja inibição no controle positivo do mesmo (Spike), pôde ser determinada e estabelecida. Desta forma, a diluição eleita será validada para a rotina do controle de qualidade, de modo a não inibir qualquer endotoxina presente. A avaliação da repetibilidade do método e a precisão intermediária foi determinada pelos resultados dos analistas 1 e 2.

➤ **Analista 1:**

**Tabela 4.7:** Verificação da interferência e precisão - analista 1, dia 01

Produto/Lote	Validade	Diluição	Frasco 01	Frasco 02	Frasco 03
			Amostra/ Amostra + Spike	Amostra/ Amostra + Spike	Amostra/ Amostra + Spike
<b>04UBIA008Z</b>	Nov/2007	Pura	+ / +	+ / +	+ / +
		1:2	+ / +	+ / +	+ / +
		1:4	+ / +	+ / +	+ / +
		1:8	+ / +	+ / +	+ / +
		1:16	+ / +	+ / +	+ / +
<b>079BIA009Z</b>	Set/2010	Pura	- / +	- / +	- / +
		1:2	- / +	- / +	- / +
		1:4	- / +	- / +	- / +
		1:8	- / +	- / +	- / +
		1:16	- / +	- / +	- / +
<b>076BIA003Z</b>	Jun/2010	Pura	- / +	- / +	- / +
		1:2	- / +	- / +	- / +
		1:4	- / +	- / +	- / +
		1:8	- / +	- / +	- / +
		1:16	- / +	- / +	- / +
<b>074BIA002Z</b>	Abr/2010	Pura	- / +	- / +	- / +
		1:2	- / +	- / +	- / +
		1:4	- / +	- / +	- / +
		1:8	- / +	- / +	- / +
		1:16	- / +	- / +	- / +

Da tabela acima, pôde-se concluir que o lote 04UBIA008Z (lote expirado) apresentou níveis altos de endotoxinas, diferenciando bem dos demais, não se observando, portanto, uma diluição ideal para validação neste lote, pois as repetições e seus Spikes apresentaram positividade em todas as diluições realizadas. Desafiar o método com um lote expirado chamou nossa atenção nos trabalhos de validação, principalmente pelos resultados adquiridos, possibilitando uma análise crítica dos mesmos, em função dos prazos de validade, etc. Já nos demais lotes testados, não foram verificados nenhum tipo de inibição pelo produto, sugerindo fortemente que

qualquer uma destas diluições (1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) poderiam ser validadas e utilizadas nos ensaios de rotina, desde que não excedam ao MDV.

Quando se divide o resultado “EU/mL” pela concentração “mg/mL”, obtém-se o resultado final expresso em unidades de endotoxina por miligrama de produto, conforme a especificação da farmacopéia europeia (< 100UE/mg). Neste caso, a concentração de IFN 3 MUI é 0,02143 mg/mL. A tabela 4.8 expressa o cálculo das concentrações de endotoxina.

**Tabela 4.8:** Perfil de endotoxina nos lotes de produto acabado

<b>Lote</b>	<b>Resultado da leitura ao verter os tubos</b>	<b>Sensibilidade UE/mL</b>	<b>Concentração de endotoxina UE/mg</b>
<b>04UBIA008Z</b>	<b>Positivou em 1:16</b>	<b>0,125</b>	<b>&gt; 93,33</b>
079BIA009Z	Negativou pura	0,125	< 5,83
076BIA003Z	Negativou pura	0,125	< 5,83
074BIA002Z	Negativou pura	0,125	< 5,83

Mesmo com os resultados encontrados para o lote 04UBIA008Z, a validação não foi comprometida. Os demais resultados foram satisfatórios, serão discutidos e comparados com os resultados da validação do método cinético-cromogênico.

➤ **Analista 2:**

A precisão intermediária expressa as variações dentro de um laboratório, que podem ocorrer por analistas diferentes, métodos diferentes, dias diferentes (RDC 899, 2003), para uma mesma amostra ou padrão. Nesta validação, a precisão intermediária foi avaliada entre dois analistas (1 e 2) e os resultados do analista 2 podem ser observados na tabela 4.9 para os seguintes lotes 076BIA003Z e 074BIA002Z.

**Tabela 4.9:** Verificação da interferência e precisão - analista 2 dia 02

Produto/Lote	Validade	Diluição	Frasco 01	Frasco 02	Frasco 03
			Amostra/ Amostra + Spike	Amostra/ Amostra + Spike	Amostra/ Amostra + Spike
076BIA003Z	Jun/2010	Pura	- / +	- / +	- / +
		1:2	- / +	- / +	- / +
		1:4	- / +	- / +	- / +
		1:8	- / +	- / +	- / +
		1:16	- / +	- / +	- / +
074BIA002Z	Abr/2010	Pura	- / +	- / +	- / +
		1:2	- / +	- / +	- / +
		1:4	- / +	- / +	- / +
		1:8	- / +	- / +	- / +
		1:16	- / +	- / +	- / +

Quando os dados são comparados por analistas diferentes para um mesmo lote, como demonstrados nas tabelas 4.7 e 4.9, verificou-se a equivalência dos mesmos. Ao avaliar a precisão intermediária entre os analistas, não há necessidade de se avaliar a precisão com todos os lotes processados pelo analista 1. Segundo resolução 899/2003 da ANVISA, um único lote é suficiente para verificar a precisão entre analistas, porém, em nossos ensaios de validação, foram selecionados dois lotes, 076BIA003Z e 074BIA002Z para reforçar nossa avaliação.

#### 4.2.3 Sensibilidade e Validação

A partir dos dados obtidos no teste para avaliação da interferência, foi escolhida a diluição de 1:8, por demonstrar resultados satisfatórios e confiáveis na quantificação da amostra e estar abaixo da MDV, além de ser uma diluição média entre a amostra pura e a maior diluição testada (1:16). Foram construídas curvas-padrões de endotoxina diluídas com as amostras de produto acabado 3 MUI para a confirmação da sensibilidade e validação da diluição 1:8 nos ensaios de rotina do controle de qualidade do produto. As tabelas 4.10 e 4.11 mostram as curvas feitas com as amostras pelos analistas 1 e 2.

**Tabela 4.10:** Curva de amostras produto acabado 3 MUI – analista 1

Diluição	076BIA003Z 1:8				076BIA002Z 1:8				079BIA009Z 1:8			
0,25 UE/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,125 UE/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,06 UE/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,03 UE/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabela 4.11:** Curva de amostras de produto acabado 3 MUI – analista 2

Diluição	076BIA003Z 1:8				076BIA002Z 1:8			
0,25 UE/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
0,125 UE/mL	+	+	+	+	+	+	+	+
0,06 UE/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
0,03 UE/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-	-	-	-	-

Todos os dados coletados foram submetidos à análise do Laboratório de Metrologia e Validação (LAMEV) de Bio-Manguinhos e fazem parte do relatório de validação pelo método gel clot para o produto alfainterferona 2b humana recombinante 3MUI.

Não foram observados desvios e não conformidades, que impactem negativamente na validação do método. O protocolo de validação encontra-se no anexo 1.

O método foi validado na diluição de 1:8 que poderá ser utilizado nos ensaios de rotina do controle de qualidade do produto acabado, pela metodologia do gel-clot.

### **4.3 Validação pelo Método Cinético-Cromogênico para o Biofármaco alfainterferona 2b humano recombinante 3 MUI e 10 MUI**

A validação pelo método cinético-cromogênico proporciona ao controle de qualidade de Bio-Manguinhos um avanço considerável na área de métodos quantitativos bioquímicos, pois o método possui uma sensibilidade de 0,005 EU/mL, garantindo desta forma uma faixa de quantificação ampla e segura para o biofármaco alfainterferona 2b humana recombinante, além da metodologia possuir um programa apropriado que traduz e calcula os resultados dos padrões e amostras, constituindo uma ferramenta importante na liberação dos resultados com esta metodologia. A avaliação do desempenho foi verificada através dos itens linearidade, exatidão, repetibilidade do método, precisão intermediária variando dia e analista e repetibilidade do sistema.

#### **4.3.1 Teste de Linearidade**

O teste de linearidade avalia os dados da curva-padrão, os coeficientes de correlação da curva, a inclinação da mesma e a interseção com o eixo Y. Para garantir que os resultados encontrados nas amostras sejam confiáveis, todos os parâmetros de linearidade precisam ser atendidos. A curva-padrão neste método constitui uma

regressão linear simples definida pela função  $Y = -ax + b$ , onde “a” é a inclinação da curva e “b” a interseção com o eixo Y, sendo, portanto, decrescente, pois a concentração de endotoxinas é inversamente proporcional ao tempo de reação, ou seja, quanto maior a concentração, menor o tempo de reação. A tabela 4.12 exibe os resultados obtidos no teste de linearidade a partir de 03 curvas-padrões com cinco pontos (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005), onde o ponto 0.005 constitui a sensibilidade do método ( $\lambda$ ). Para a validação em 10 MUI, foi utilizada a mesma curva, porém sem o primeiro ponto (50 EU/mL), porém a sensibilidade foi mantida.

**Tabela 4.12:** Resultados dos testes de linearidade

<b>3MUI</b>	<b>Concentração Nominal (UE/mL)</b>	<b>Nº Curva</b>	<b>Média dos Valores de Endotoxina</b>	<b>Desvio Padrão (tempo de reação)</b>	<b>Coefficiente de Variação (%)</b>
1	50	1	> 34,8528	2,88	0,91
		2	> 36,2855	4,86	1,59
		3	> 35,9544	8,76	1,68
2	5	1	6,3445	8,10	1,65
		2	6,0974	8,91	1,84
		3	6,7772	9,99	1,39
3	0,5	1	0,7109	14,22	1,66
		2	0,7099	12,81	1,52
		3	0,6695	15,12	1,36
4	0,05	1	0,0513	39,20	2,33
		2	0,0493	21,52	1,29
		3	0,0419	14,25	0,76
5	0,005	1	< 0,0039	18,37	0,56
		2	< 0,0040	179,80	5,64
		3	< 0,0046	27,30	0,95
<b>10 MUI</b>	<b>Concentração Nominal (UE/mL)</b>	<b>Nº Curva</b>	<b>Média dos Valores de Endotoxina</b>	<b>Desvio Padrão (tempo de reação)</b>	<b>Coefficiente de Variação (%)</b>
1	5	1	5,0709	6,89	1,27
		2	5,1032	8,27	1,46
		3	5,0541	9,53	1,69
2	0,5	1	0,5451	6,04	0,62
		2	0,5537	14,48	1,43
		3	0,5666	13,74	1,41
3	0,05	1	0,0403	16,58	0,86
		2	0,0383	8,75	0,43
		3	0,0377	10,69	0,55
4	0,005	1	< 0,0056	60,29	1,86
		2	< 0,0058	16,05	0,48
		3	< 0,0058	226,58	7,33

Cada resultado apresentado na tabela acima representa a média de três orifícios da placa, pois cada ponto da curva-padrão foi testado em triplicata. A partir dos dados obtidos com as três curvas foram avaliados os parâmetros de linearidade, conforme a tabela 4.13.

**Tabela 4.13:** Resultados de linearidade emitidos pelo software ENDOSCAN

Parâmetros de Avaliação	Reta 1	Reta 2	Reta 3	Média
Coeficiente de Correlação(r)	- 0,9965	- 0,9971	- 0,9969	<b>- 0,9968</b>
Coeficiente Angular (a)	- 0,2558	- 0,2577	- 0,1897	<b>- 0,2344</b>
Coeficiente Linear (b)	2,8956	2,8864	3,0127	<b>2,9315</b>
S <sub>y/x</sub> ERRO PADRÃO e CV%	0,03936	0,03589	0,02716	<b>0,03414</b>
ICb INTERVALO DE CONFIANÇA COEFICIENTE ANGULAR	2,86611 a 2,92507	2,85941 a 2,91317	2,99228 a 3,03297	<b>2,90593 a 2,95707</b>
S <sub>a</sub> e S <sub>b</sub> DESVIO PADRÃO DE A E B	0,00823 e 0,01245	0,00750 e 0,01135	0,00568 e 0,00859	<b>0,00714 e 0,01079</b>

De acordo com os dados do teste de linearidade, foi calculada a média das três retas obtidas em 3MUI e 10 MUI. O coeficiente de correlação médio das curvas apresentou valor absoluto maior que 0,98. O valor da inclinação média (coeficiente angular) da curva estava dentro do intervalo de -0.3 a -0.1, assim como a interseção (coeficiente linear) dentro do intervalo de +2.5 a +3.5. A faixa de leitura da curva-padrão obedeceu ao critério de 2-3 log e o intervalo de confiança do coeficiente angular não contém o zero, ou seja, não há presença de erro sistemático. Os dados mostram que os parâmetros foram todos atendidos para o item linearidade tanto para as apresentações do produto acabado de 3 MUI e 10 MUI.

#### 4.3.2 Teste de Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (RDC 899,2003). Em nossos ensaios de validação, a exatidão foi avaliada através do controle positivo do produto, ou seja, da concentração de endotoxina aditada nas amostras (concentração teórica) e a concentração recuperada pelo método (concentração média experimental). É calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (RDC 899, 2003). Através da seguinte fórmula, o programa calcula a exatidão em percentual:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

Nos ensaios de validação, as amostras de 3MUI foram diluídas 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80 e para 10MUI, 1:80, 1:100, 1:160 e 1:200, aditadas com uma concentração fixa de 5UE/mL de endotoxinas. A tabela 4.14 mostra os dados do teste de exatidão.

**Tabela 4.14:** Resultados do teste de exatidão

<b>3MUI</b>	<b>Diluição/conc.</b>	<b>Coefficiente de Variação (%)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
076BIA003Z Spike	1:10 5	4,09	37
076BIA003Z Spike	1:20 5	0,0	53
076BIA003Z Spike	1:40 5	0,0	69
076BIA003Z Spike	1:80 5	0,0	100
079BIA005A Spike	1:10 5	0,00	28
079BIA005A Spike	1:20 5	3,28	35
079BIA005A Spike	1:40 5	0,00	28
079BIA005A Spike	1:80 5	0,00	68
04UBIA008Z Spike	1:10 5	2,33	47
04UBIA008Z Spike	1:20 5	2,65	69
04UBIA008Z Spike	1:40 5	2,18	83
04UBIA008Z Spike	1:80 5	1,68	106
079BIA009Z Spike	1:10 5	1,08	45
079BIA009Z Spike	1:20 5	0,14	61
079BIA009Z Spike	1:40 5	2,62	81
079BIA009Z Spike	1:80 5	0,0	112
<b>10 MUI</b>	<b>Diluição/conc.</b>	<b>Coefficiente de Variação (%)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
04UBIC001Z spike	1:80 5	0,00	85
04UBIC001Z spike	1:100 5	13,41	101
04UBIC001Z spike	1:160 5	0,00	98
04UBIC001Z spike	1:200 5	0,82	102
052BIC001Z spike	1:80 5	0,65	85
052BIC001Z spike	1:100 5	1,18	100
052BIC001Z spike	1:160 5	13,65	105
052BIC001Z spike	1:200 5	0,00	119
066BIC001Z spike	1:80 5	0,00	88
066BIC001Z spike	1:100 5	0,00	96
066BIC001Z spike	1:160 5	0,23	108
066BIC001Z spike	1:200 5	0,00	110

Os resultados exibem a diluição de 1:80 em 3MUI e 1:100 em 10MUI como as que expressam a melhor exatidão, ou seja, a recuperação mais próxima de 100% da concentração de endotoxina aditada no controle positivo do produto, com exceção do lote 079BIA005A, que apresentou um grau de inibição maior que os demais lotes testados.

Também se observa que nem todos os lotes (exceto lote 04UBIA008Z) puderam ser dosados pelo método, uma vez que os valores de endotoxinas se apresentaram mais

baixos que a sensibilidade do método, mesmo o software corrigindo pela diluição. Por esta razão, encontramos valores precedidos do sinal “<”. Os valores dosados para o lote 04UBIA008Z confirmaram os resultados obtidos com o método gel clot, ou seja, acima das especificações. Mas vale ressaltar que se trata de um lote com data de validade expirada, o que não se pode levar em consideração para fins de liberação, apenas para dados de estudo de validação. Embora os lotes 04UBIC001Z e 052BIC001Z tenham apresentado coeficientes de variação acima de 10%, não invalidam o ensaio, pois a resolução 899/2003 da ANVISA preconiza < 20% para as amostras.

### 4.3.3 Teste de Repetibilidade do Método

A repetibilidade do método representa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. É verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, concentrações: baixa, média e alta, em triplicata. As tabelas 4.15 e 4.16 mostram a repetibilidade do método com os lotes testados em 4 concentrações diferentes.

**Tabela 4.15:** Repetibilidade do Método em 3MUI

3MUI	Lote: 076BIA003Z (EU/mL)	Lote: 079BIA005A (EU/mL)	Lote: 04UBIA008Z (EU/mL)	Lote: 079BIA009Z (EU/mL)
1:10	< 0,5	< 0,5	14,8973	< 0,05
	< 0,5	< 0,5	14,7248	< 0,05
	< 0,5	< 0,5	14,1067	< 0,05
1:20	< 1	< 1	13,7871	< 0,1
	< 1	< 1	13,4046	< 0,1
	< 1	< 1	12,9211	< 0,1
1:40	< 2	< 2	14,5127	< 0,15
	< 2	< 2	14,1985	< 0,16
	< 2	< 2	13,7765	< 0,16
1:80	< 4	< 4	14,8462	< 0,4
	< 4	< 4	14,7670	< 0,4
	< 4	< 4	14,2894	< 0,4

**Tabela 4.16:** Repetibilidade do Método em 10MUI

10MUI	Lote: 04UBIC001Z (EU/mL)	Lote: 052BIC001Z (EU/mL)	Lote: 066BIC001Z (EU/mL)
1:80	< 0,4	< 0,4	< 0,4
	< 0,4	< 0,4	< 0,4
	< 0,4	< 0,4	< 0,4
1:100	< 0,43	< 0,5	< 0,5
	< 0,58	< 0,49	< 0,5
	< 0,58	< 0,5	< 0,5
1:160	< 0,8	< 0,7	< 0,8
	< 0,8	< 0,95	< 0,8
	< 0,8	< 0,95	< 0,8
1:200	< 1	< 1	< 1
	< 1	< 1	< 1
	< 1	< 1	< 1

Com base nestes resultados, conclui-se que, com exceção do lote *04UBIA008Z*, todos apresentaram resultados abaixo da especificação. A variação que se percebe nos valores estimados se deve a correção pela diluição feita pelo programa, porém, o conteúdo é sempre o mesmo (menor que a sensibilidade x a diluição), conferindo repetibilidade. Com relação ao lote expirado (*04UBIA008Z*), observa-se uma repetibilidade satisfatória, mesmo em diferentes diluições. Embora a repetibilidade do método tenha sido realizada em diluições diferentes do produto, poderá ser mais bem discutido o item precisão intermediária variando dia e repetibilidade do sistema, onde se avalia a repetibilidade numa mesma diluição para as mesmas amostras.

#### 4.3.4 Precisão Intermediária variando dia

Para efeitos desta validação, foi avaliada a precisão intermediária do método “variando o dia por um mesmo analista” para a apresentação 3 MUI, pois este ensaio para a apresentação 10 MUI foi invalidado devido a problemas no equipamento na ocasião do ensaio. Porém, os demais testes de validação para esta apresentação foram concluídos. Os resultados de 3 MUI se encontram na tabela 4.17. Foram analisadas três medidas de endotoxinas em dias diferentes para um mesmo lote. Cada medida é o resultado médio de uma triplicata e seu coeficiente de variação também foi evidenciado.

**Tabela 4.17:** Dados de Precisão Intermediária variando dia

Analista Ricardo Brum			Lote: 04UBIA008Z			Data: 25/07/2008			
Nº	Replicata 1			Replicata 2			Replicata 3		
	Valor	Média	CV(%)	Valor	Média	CV(%)	Valor	Média	CV(%)
1	16,8822	16,6629	0,94	17,3493	17,2495	0,49	16,5964	16,5209	0,48
2	16,5867			17,1416			16,5553		
3	15,5199			17,2578			16,4113		
Analista Ricardo Brum			Lote: 04UBIA008Z			Data: 30/07/2008			
Nº	Replicata 1			Replicata 2			Replicata 3		
	Valor	Média	CV(%)	Valor	Média	CV(%)	Valor	Média	CV(%)
1	17,5188	17,1782	1,98	15,8066	15,7992	1,22	15,8437	15,4058	2,41
2	17,3013			16,0312			15,4371		
3	16,7147			15,5597			14,9367		

A partir destes dados conclui-se que a precisão intermediária variando o dia foi alcançada, o que se pode perceber claramente através das médias, desvio-padrão e desvio-padrão relativo expostos na tabela 4.18.

**Tabela 4.18:** Estatística da Precisão Intermediária variando dia para 3 MUI

Parâmetros de	Dia 1	Dia 2	Conclusão
Média	16,7001	16,1278	OK
Desvio Padrão	0,557	0,871	OK
Desvio Padrão Relativo	3,3349	5,4002	OK

Com base nos valores calculados de média, desvio-padrão e desvio-padrão relativo, o teste de precisão intermediária variando o dia foi alcançado de modo satisfatório para a apresentação de 3 MUI, uma vez que os dados expressam um desvio-padrão relativo menor que 10%.

#### 4.3.5 Precisão Intermediária variando analistas

Nesta validação foi avaliada a precisão intermediária com a variação de 03 analistas em 3 MUI e 02 analistas em 10 MUI. As tabelas 4.19 e 4.20 exibem a comparação entre os analistas. Foram utilizadas as mesmas amostras de um pool do lote 076BIA003Z e 052BIC001Z, respectivamente.

**Tabela 4.19:** Precisão intermediária entre analistas 1,2 e 3 para 3MUI

Replicatas	Analista 1: Ricardo Brum	Analista 2: Joyce Modesto	Analista 3: Daniel Guedes
01	< 0,4	< 0,4	< 0,4
02	< 0,4	< 0,4	< 0,4
03	< 0,4	< 0,4	< 0,4
04	< 0,4	< 0,4	< 0,4
05	< 0,4	< 0,4	< 0,4
06	< 0,4	< 0,4	< 0,4
07	< 0,4	< 0,4	< 0,4
08	< 0,4	< 0,4	< 0,4
09	< 0,4	< 0,4	< 0,4
10	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Média	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Desvio-padrão	0,0	0,0	0,0
Desvio-padrão relativo	0,0	0,0	0,0

**Tabela 4.20:** Precisão intermediária entre analistas 1 e 2 para 10MUI

Replicatas	Analista 1: Daniel Guedes	Analista 2: Ana Cristina
01	< 0,5	< 0,5
02	< 0,5	< 0,5
03	< 0,5	< 0,5
04	< 0,5	< 0,5
05	< 0,5	< 0,5
06	< 0,5	< 0,5
07	< 0,5	< 0,5
08	< 0,5	< 0,5
09	< 0,5	< 0,5
10	< 0,5	< 0,5
Média	< 0,5	< 0,5
Desvio-padrão	0,0	0,0
Desvio-padrão relativo	0,0	0,0

Analisando estes resultados nas 10 repetições, conclui-se que não houve variação entre os analistas com relação aos valores de endotoxinas, sendo, portanto, equivalentes entre si. Vale ressaltar também que se trata de dois lotes aprovados, com quantidades de endotoxinas inferiores a sensibilidade, mas corrigidos pela diluição. Todas as recuperações do controle positivo do produto (spike) feito pelos analistas se encontram dentro do intervalo estabelecido pelo FDA e farmacopéias (50-200%).

#### 4.3.6 Repetibilidade do Sistema

Realizar o teste de repetibilidade do sistema significa desafiar o método através do sistema operacional utilizado no ensaio, como softwares, leitoras, etc, com 01 lote específico ensaiado pelo menos 10 vezes na diluição de trabalho, pelo mesmo analista. As tabelas 4.21, 4.22, 4.23 e 4.24 evidenciam os resultados deste teste para 3MUI e 10MUI.

Tabela 4.21: Repetibilidade do Sistema lote 076BIA003Z

Nº	Concentração\Diluição: 80X			Nº	Concentração\Diluição: 80X		
	Valor	Média	CV(%)		Valor	Média	CV(%)
1	<0,4	<0,4	0,0	6	<0,4	<0,4	0,0
	<0,4						
	<0,4						
2	<0,4	<0,4	0,0	7	<0,4	<0,4	0,0
	<0,4						
	<0,4						
3	<0,4	<0,4	0,0	8	<0,4	<0,4	0,0
	<0,4						
	<0,4						
4	<0,4	<0,4	0,0	9	<0,4	<0,4	0,0
	<0,4						
	<0,4						
5	<0,4	<0,4	0,0	10	<0,4	<0,4	0,0
	<0,4						
	<0,4						

Tabela 4.22: Repetibilidade do Sistema lote 04UBIA008Z

No	Concentração\Diluição: 80X			No	Concentração\Diluição: 80X		
	Valor	Média	CV(%)		Valor	Média	CV(%)
1	14,3318	14,3388	0,74	6	13,0328	12,9937	0,37
	14,2129						
	14,4718						
2	13,4433	13,2754	0,94	7	14,0834	13,9937	0,58
	13,2366						
	13,1465						
3	13,1918	13,1957	0,04	8	13,6289	13,6625	0,41
	13,1918						
	13,2037						
4	14,9903	15,0187	0,62	9	15,3714	15,0301	2,10
	14,9218						
	15,1441						
5	15,0467	14,9798	0,33	10	15,8437	15,4058	2,41
	14,9296						
	14,9631						

Tabela 4.23: Repetibilidade do Sistema lote 04UBIC001Z

Nº	Concentração\Diluição: 1:100			Nº	Concentração\Diluição: 1:100		
	Valor	Média	CV(%)		Valor	Média	CV(%)
1	< 0,5	< 0,5	1,29	6	< 0,51	< 0,5	3,09
	< 0,5						
	< 0,49						
2	< 0,52	< 0,5	3,11	7	< 0,52	< 0,5	4,74
	< 0,49						
	< 0,48						
3	< 0,51	< 0,5	0,84	8	< 0,5	< 0,5	0,74
	< 0,49						
	< 0,50						
4	< 0,45	< 0,52	9,61	9	< 0,46	< 0,5	5,23
	< 0,57						
	< 0,53						
5	< 0,44	< 0,5	8,84	10	< 0,51	< 0,5	2,38
	< 0,53						
	< 0,53						

**Tabela 4.24:** Repetibilidade do Sistema lote 066BIC001Z

Nº	Concentração\Diluição: 1:100			Nº	Concentração\Diluição: 1:100		
	Valor	Média	CV(%)		Valor	Média	CV(%)
1	< 0,5	< 0,5	0,00	6	< 0,53	< 0,5	9,43
	< 0,5						
	< 0,5						
2	< 0,5	< 0,5	1,48	7	< 0,5	< 0,5	0,00
	< 0,5						
	< 0,49						
3	< 0,5	< 0,5	0,00	8	< 0,5	< 0,5	0,68
	< 0,5						
	< 0,5						
4	< 0,51	< 0,5	3,20	9	< 0,51	< 0,5	2,72
	< 0,51						
	< 0,48						
5	< 0,5	< 0,5	0,00	10	< 0,49	< 0,5	1,94
	< 0,5						
	< 0,5						

Para o lote *076BIA003Z* não foram observados desvio-padrão e desvio-padrão relativo, pois não houve variação nos resultados. Já no lote *04UBIA008Z* foram observados um desvio-padrão de 0.3376 e desvio-padrão relativo de 2.4% (<10%), o que significa dizer que até mesmo no lote com índices mais elevados de endotoxinas, a repetibilidade do sistema foi alcançada. Para os lotes *04UBIC001Z* e *066BIC001Z*, os desvios-padrões relativos das triplicatas se encontram abaixo de 10% e todas as médias não sofreram variação.

As dez repetições realizadas conferem ao sistema repetibilidade, uniformidade e segurança, tanto para a apresentação de 3 MUI quanto 10MUI.

#### 4.3.7 Teste de Pirogênio *in vivo*

Todos os lotes de alfainterferona 2b humana recombinante 3 MUI e 10 MUI foram testados pelo método de pirogênio em coelhos pelo setor de controle biológico (SEBIO) e apresentaram resultados satisfatórios, inclusive o lote *04UBIA008Z*, que apresentou quantidades elevadas de pirogênio (endotoxina), evidenciada pelos métodos gel clot e cinético, fortalecendo a idéia de que os métodos *in vitro* são mais sensíveis e capazes de detectar quantidades mínimas. Vale ressaltar que na época do ensaio de pirogênio, o referido lote ainda estava dentro do prazo de validade.

Avaliar a contaminação pirogênica apenas pela resposta febril apresenta limitações que devem ser questionadas e averiguadas, levando as empresas e órgãos reguladores buscarem cada vez mais alternativas para o controle de qualidade de produtos injetáveis, além das questões bioéticas que envolvem animais de experimentação. Ensaio alternativo ao método de detecção do pirogênio total *in vivo* e

ao LAL estão sendo desenvolvidos *in vitro* através do cultivo de linhagens celulares monocíticas (Monomac-6 e THP-1), baseados na ligação do LPS a moléculas de superfície como CD14 e TLK4 dos monócitos ativados e liberação de citocinas. Este método está em fase de desenvolvimento e em vias de ser reconhecido pelas agências regulatórias. O Instituto Nacional de Controle em Qualidade de Saúde (INCQS – Fiocruz) já possui profissionais envolvidos nestas pesquisas.

## 5- CONCLUSÃO

De acordo com todos os resultados apresentados neste trabalho podemos concluir que o ensaio de Limulus Amebocyte Lysate (LAL), pelos métodos de gel-clot e cinético-cromogênico, apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios de validação para o biofármaco alfainterferona 2b humana recombinante.

Nos ensaios de inibição/potencialização não foram observados níveis de interferentes significativos e as amostras de interferon puderam ser validadas em diluições abaixo dos valores da Máxima Diluição Válida (MDV). Os controles positivos do produto foram totalmente recuperados nestas diluições. Para o método cinético-cromogênico na apresentação do biofármaco de 3MUI, com MDV 1:3888, foi validada a diluição de 1:80, e 10MUI, com MDV 1:12962, foi validada a diluição de 1:100. Para o método gel-clot, com MDV 1:17, na apresentação de 3MUI, foi validada a diluição de 1:8. No perfil de compatibilidade do ingrediente farmacêutico ativo, também não foram observados interferentes na diluição de 1:40 para o método cinético-cromogênico, o que se pode explicar pelo grau de purificação do produto, ou seja, as técnicas cromatográficas empregadas durante a manufatura foram suficientes na eliminação de endotoxinas, característica da etapa de biorreação.

A validação foi conduzida em 04 lotes de interferon para a apresentação 3MUI e 03 lotes para a apresentação 10MUI. Os parâmetros estabelecidos pelas farmacopéias (européia e americana) e FDA foram atendidos. Resultados satisfatórios foram obtidos para os critérios descritos na resolução 899/2003, da ANVISA, como linearidade da curva-padrão, exatidão e precisão, para o ensaio quantitativo cinético-cromogênico. Tanto o desvio-padrão quanto o desvio-padrão relativo das amostras e padrão atenderam aos critérios estabelecidos nos protocolos de validação. Já o método gel-clot, embora semiquantitativo, atendeu aos requisitos para a validação qualitativa, possuindo resultados binários, que permitem estimar um resultado por faixa de aceitação.

Quase todos os lotes de interferon utilizados na validação 3MUI e 10MUI apresentaram níveis baixos de endotoxinas, com exceção do *04UBIA008Z*, que serviu de lote-controle durante a validação, pois sua dosagem foi confirmada nos testes de repetibilidade do método e do sistema.

O método de LAL, embora detecte apenas as endotoxinas, oriundas de bactérias gram negativas, mostrou-se sensível e capaz de ser incorporado na rotina do controle de qualidade de Bio-Manguinhos para este produto.

As endotoxinas hoje são responsáveis pela maior incidência de contaminação pirogênica em produtos injetáveis, o que faz do método LAL uma ferramenta analítica potente nos laboratórios de controle de processo e controle de qualidade. Já o teste em coelhos possui sensibilidade questionável e variável, além das questões éticas envolvendo animais em experimentação, variabilidade biológica, sujeito a interferências que podem ser ocasionadas pelo estresse do animal e alterações ambientais como umidade, temperatura, etc, que podem servir de fatores para a geração de resultados falso-negativos ou falso-positivos.

Todos os lotes de interferon utilizados neste trabalho foram testados e aprovados pelo método de pirogênio *in vivo*, realizado pelo Setor de Controle Biológico, responsável pela atividade e liberação atual do produto, ou seja, ausência de alteração de temperatura nos animais de laboratório (coelhos), inclusive para o lote 04UBIA008Z, que apresentou positividade tanto no Gel Clot quanto no Cinético-Cromogênico. Estes dados sugerem que somente o teste de pirogênio *in vivo* não garante um controle seguro para produtos parenterais desta natureza.

Através de parceria com o Laboratório de Metrologia e Validação (LAMEV), pôde ser concluída com sucesso a validação dos métodos gel-clot para o produto alfainterferona na apresentação de 3MUI e cinético-cromogênico para alfainterferona nas apresentações de 3MUI e 10 MUI.

O trabalho de validação nesta área será continuado pelo SETBI. A validação do ensaio de LAL pelo método gel-clot para o biofármaco alfainterferona 2b humana recombinante 10 MUI e a finalização da validação do método cinético-cromogênico para o Ingrediente Farmacêutico Ativo (concentrado protéico), são metas para o primeiro semestre de 2009.

Em breve, o grande desafio para o controle de qualidade, está no estabelecimento de parcerias com o INCQS e outros laboratórios afins para aprimoramento de técnica *in vitro*, a partir de cultura de células monocíticas estabelecidas (linhagens Monomac-6 e THP-1), para detecção de pirogênio total, através da expressão de citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 mensuradas por ELISA, visando à redução de experimentos com animais e padronização de um método capaz de detectar qualquer tipo de pirogênio, oriundos não somente de bactérias gram negativas, mas de outras fontes, como fungos, bactérias gram positivas, vírus, etc.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Resolução 899. Brasília:2003;1-12

Al-Hasso S & Auburn WA. **Interferons: An Overview** [on line] EUA; 2007. [capturado em 31 de maio de 2007]. Disponível em:  
[http://www.uspharmacist.com/oldformat.asp?url=newlook/files/Feat/interferons.htm&pub\\_id=8&article\\_id=731](http://www.uspharmacist.com/oldformat.asp?url=newlook/files/Feat/interferons.htm&pub_id=8&article_id=731)

Arduino MJ & Favero MS. **Microbiologic Aspects of Hemodialysis In: Water Quality for Dialysis**. Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI),1998; 23-9.

Bang, FB. **A bacterial disease of *Limulus polyphemus***. Bull. Johns Hopkins Hosp, 1956; 98:325.

Bergstrom J et al. **“Elevated Serum C-Reactive Protein Is a Strong Predictor of Increased Mortality and Low Serum Albumin in Hemodialysis Patients”**. J. Am. Soc. Nephrol 1995; 6:573.

**Biofármacos – Bio-Manguinhos** [on line] [capturado em 03/02/2009]. Disponível em:  
[www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=248](http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=248)

BioPharm. **The BioPharm Guide to Biopharmaceutical Development**. Supplement to BioPharm. 2<sup>nd</sup> ed, 2002.

Cardoso LS et al. **Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis**. Microbial Cell Factories, 2007; 6:1-6.

Chuan L; Robinson D. K. **Industrial choices for protein production by large-scale cell culture**. Current Opinion in Biotechnology, 2001; 12:195-201.

Cooper, JF. **Validation of Bacterial Endotoxin Test Methods**. Charles River Laboratories. Endosafe Products and Services, 2003; 1-4.

Darnell J, Lodish H, Baltimore D. **Molecular Cell Biology**. 2<sup>a</sup> ed. New York. Scientific American Books; 1990.

Dinarello CA. **Interlekin-1 and its biologically related cytokines**. Adv. Immunol. 1989; 44: 153-205.

Emerging Biopharmaceutical Enterprises and European Federation of Pharmaceutical and Associations. **Creating New Biotechnological solutions to Healthcare Challenges**, 2004.

**Endosafe Times. In Vitro Pirogen Test (IPT). v.9. No 2. June 2002**. [on line] [capturado em 22/11/2008]. Disponível em: [www.crl.com](http://www.crl.com)

**Estrutura do Interferon alfa** [on line]. [capturado em 15/12/2008]. Disponível em: <http://www.flamel.com>.

**Estrutura do LPS de *H. pilory*** [on line] [capturado em 16/12/2008]. Disponível em: <http://www.nuigalway.ie/microbiology/mbl/lps.htm>

European Pharmacopean. **Test for Bacterial Endotoxins (LAL Test)**, Appendix XIV C, 2006.

**Evolução do LAL** [on line]. [capturado em 18/06/2008]. Disponível em: <http://www.ocean.udel.edu/horseshoecrab/research/lal.html>

Falconi, V.C –**TQC Controle da Qualidade Total**. 8<sup>a</sup> ed. Belo Horizonte. Editora Escola de Engenharia da UFMG. 1992.

Favero M, Arduino MJ et al. **A prospective study of pirogenic reactions in Hemodialysis patients using bicarbonate dialysis fluids filtered to remove bacteria and endotoxin**. J. Am. Soc. Nephrol, 1992; 3: 1001-7.

Federación Latinoamericana de la Industria Farmacêutica (FLAIF). **Biofármacos**, 2006.

Food and Drug Administration. **Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use**. U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center of Biologics Evaluation and Research, 1997.

Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, “**Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test as an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products and Medical Devices**”, 1987.

Geier DA & Geier MR. **Clinical Implications of Endotoxin Concentrations in Vaccines**. The Annals of Pharmacotherapy, **2002**; 36:776.

**Gen-Probe Inc.** [on line]. [Capturado em 21 de março de 2007]. Disponível em: [http://www.gen-probe.com/prod\\_serv/std\\_pace.asp](http://www.gen-probe.com/prod_serv/std_pace.asp)

Grandics P. **Pirogênios em Produtos para uso Parenteral**. Pharmaceutical Technology, 2000:12-6.

Graves PR, Haystead T. **Molecular Biologist's guide to proteomics**. Micro Mol Biol Rev, 2002; 66:39-63.

Harding GB, Klein E, Pass T and Million C. **Endotoxin and bacterial contamination of dialysis center water and dialysate: a cross sectional survey**. The International Journal of Artificial Organs, 1990; 3: 39-43.

**Hepatite C** [on line]. [capturado em 24/11/2008]. Disponível em: <http://www.minhavidade.com.br/MostraMateriaSaude.vxlpub?codMateria=1543>

Huszár G et al. **Detection of Pyrogens in IgG Preparations**. The International Association for Biologicals, 2002; 77-82

**In Vitro Pyrogen Test (IPT)** [on line] [capturado em 10/09/2008]. Disponível em: [www.crl.com](http://www.crl.com)

Júnior NP, Bon EPS, Ferrara MA. **Tecnologia de Bioprocessos. Séries em Biotecnologia**. Escola de Química/UFRJ, 2008; 1: 1-62.

Kelly JL, O'Sullivan C, O'Riordain M, O'Riordain D, Lyons A, Doherty J et al. **Is Circulating Endotoxin the Trigger for the Systemic Inflammatory Response Syndrome Seen After Injury?** Annals of Surgery, 1997; 225: 530-41.

Levin, J. and Bang, FB. **The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood**. Bull. Johns Hopkins Hosp, 1964; 115:265.

Levin, J. and Bang, FB. **Clottable protein in *Limulus*: it's localization and kinetics of coagulation by endotoxin**. Thromb. Diath. Haemorrh, 1968; 19:186.

Mahiout A. **Production of Endotoxin and Its Related Subfragments in Contaminated Bicarbonate Dialysate**. J. Am. Soc. Nephrol, 1991; 2:337.

**Método Gel Clot.** [on line] [capturado em 03/02/2009]. Disponível em: [www.bge.com.tw/LAL/LAL/lalproducts.htm](http://www.bge.com.tw/LAL/LAL/lalproducts.htm)

McHutchison John G et al. **Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C.** The New England Journal of Medicine, 1998; 21:339.

Morales RP. **Ensayo del lisado de amebocitos del Limulus (LAL).** Revista Cubana de Farmacologia, Artigos de Revisão, 2004; 38:1-8.

Morrison DC, Dinarello CA, Munford RS, Natanson C, Danner R, Pollack M et al. **Current Status of Bacterial Endotoxins.** ASM News, 1994; 60: 479-484.

Mosaabadi JM et al. **Improving purification of recombinant human interferon  $\gamma$  expressed in *Escherichia coli*; effect of removal of impurity on the process yield.** Protein Expression & Purification, 2006; 51:147.

Mothershed EA & Whitney AM. **Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and Future considerations for the clinical laboratory.** Clinica Chimica Acta, 2006; 363: 206-220.

Old LJ. **Tumor Necrosis Factor.** Sci Am. May, 1988; 258: 59-75.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA. **Microbiology.** 3<sup>a</sup> ed. Chicago: WM. C. Brown Publishers, 1996.

Presgrave OAF. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de Pirogênio em coelhos no controle da Qualidade de produtos injetáveis.** [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz:2003.

**Reagente LAL – Charles River Laboratories.** [on line] [capturado em 03/02/2009]. Disponível em: [www.criver.com/.../kineticChromogenicLAL.aspx](http://www.criver.com/.../kineticChromogenicLAL.aspx)

Roche. **Biofármacos** [online]. Brasil; 2007. [capturado em 30 de maio de 2007] Disponível em: <http://www.roche.com.br/NR/rdonlyres/27273F4A-1D0B-4FE4-9DD2-8951FB89EE6E/6488/medicamentosbiologicos1.pdf>

Ruiz L. et al. **Long-term stabilization of recombinant human interferon  $\alpha$  2b in aqueous solutions without serum albumin.** International Journal of Pharmaceutics, Havana, 2003; 264: 57.

- Samuel CE. **Antiviral Actions of Interferons**. Clinical Microbiology Reviews, 2001; 14:778-809.
- Siciliano RF; Boulos M. **Hepatitis C: Tratamento revisitado**. Arquivos de Gastroenterologia, 2004; 41:1-2.
- Silveira RL et al. **Comparative Evaluation of Pyrogens Tests in Pharmaceutical products**. Brazilian Journal of Microbiology, 2004; 35:48.
- Sharma SK. **Review: "Endotoxin Detection and Elimination in Biotechnology"**. Biotechnol. Appl. Biochem, 1986; 8: 5-22
- Solum, NO. **Some characteristics of the Clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells**. Thromb. Diath. Haemorrh, 1970; 23:170.
- Solum, NO. **The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and no-clotted forms of the molecule**. Thromb. Res, 1973; 2:55.
- Taktak YS. **Assay of Pyrogens by Interleukin-6 Release from Monocytic Cell Lines**. J. Pharm. Pharmacol, 1990; 43: 578-82.
- The European Association for Bio-Industries (EuropaBio). **Biological and Biosimilar Medicines**. 2005.
- Walsh G, Wiley J and Sons. **Biopharmaceuticals**. 2<sup>a</sup> ed., USA. Biochemistry and Biotechnology, 2007.
- Watkins K. J. **Fighting the clock**. Chemical & Engineering News, 2002; 27:34.
- Weary M; Pearson F. **A Manufacturer's Guide to Depyrogenation**. Biopharm. 1988; 22:29.
- Werner R. G. **Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals**. Journal of Biotechnology, 2004; 113:171-182.
- Williams KL . **Contamination Control in Parenteral Manufacturing**. New York. Microbial, 2004.

Williams, KL. **Endotoxins. Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation.** 3<sup>rd</sup> ed. Indianapolis. Informa Healthcare, 2007.

Young NS, Levin J and Prendergast RA. **An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism.** J. Clin. Invest, 1972: 51:1790.

## 7 - ANEXOS

## ANEXO 1



## CERTIFICATE OF ANALYSIS

**VIAL CONTENTS:** Endosafe® Control Standard Endotoxin is prepared from *E. coli* strain 055:B5. Each vial contains 10 ng of purified Lipopolysaccharide, freeze dried in a stabilized matrix.

**RSE/CSE RATIO:** The potency of this standard in Endotoxin units, (EU) has been determined to be 5 EU/ng by the method described in Appendix C (***Gel-clot Technique***) of the GUIDELINE ON VALIDATION OF THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE TEST AS AN END PRODUCT ENDOTOXIN TEST FOR HUMAN AND ANIMAL PARENTERAL DRUGS, BIOLOGICAL PRODUCTS, AND MEDICAL DEVICES, published by the U.S. Food and Drug Administration

CSE Lot: EX72972 LAL Reagent Lot: X4321L RSE Lot: EC-6-3

RSE/CSE Ratio: 5 EU/ng Vial contents: 50 EU/vial

Geometric Mean Sensitivity with RSE: 0.125 EU/mL

**IS/CSE RATIO:** The Expert Committee on Biological Standardization of WHO has assigned a potency of the IS as 10,000 IU per vial of IS, so that 1 IU = 1 EU. The potency of this endotoxin standard in International (Endotoxin) Units, IU, has been designated as 5 IU/ng.

**DIRECTIONS FOR USE:** Reconstitute the lyophilized material with 2.5 mL of LAL reagent grade water to obtain 20 EU/mL or 20 IU/mL. Vortex mix vigorously for at least 5 minutes after rehydration, and for at least 1 minute immediately prior to each use.

**STORAGE:** Store rehydrated material at 2-8°C for up to 4 weeks. Store lyophilized material at controlled room temperature or refrigerated as preferred. Diluted endotoxin should not be stored except under validated conditions.

**CAUTION: DO NOT FREEZE ENDOTOXIN SOLUTIONS**

Signature: Cynthia Black Date: 19 May 2008  
Cynthia Black, Technical Service

CA-GC10-01

## ANEXO 2



## CERTIFICATE OF ANALYSIS

**VIAL CONTENTS:** Endosafe<sup>®</sup> Control Standard Endotoxin is prepared from *E. coli* strain 055:B5. Each vial contains 10 ng of purified Lipopolysaccharide, freeze dried in a stabilized matrix.

**RSE/CSE RATIO:** The potency of this standard in Endotoxin units, (EU) has been determined to be 8 EU/ng by the method described in Appendix C (***Kinetic Technique***) of the GUIDELINE ON VALIDATION OF THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE TEST AS AN END PRODUCT ENDOTOXIN TEST FOR HUMAN AND ANIMAL PARENTERAL DRUGS, BIOLOGICAL PRODUCTS, AND MEDICAL DEVICES, published by the U.S. Food and Drug Administration.

CSE Lot: EX72972 LAL Reagent Lot: W1042E RSE Lot: EC-6-3

RSE/CSE Ratio: 8 EU/ng Vial contents: 80 EU/vial

**IS/CSE RATIO:** The Expert Committee on Biological Standardization of WHO has assigned a potency of the IS as 10,000 IU per vial of IS, so that 1 IU = 1 EU. The potency of this endotoxin standard in International (Endotoxin) Units, IU, has been designated as 8 IU/ng.

**DIRECTIONS FOR USE:** Reconstitute the lyophilized material with 1.8 mL of LAL reagent grade water to obtain 50 EU/mL or 50 IU/mL. Vortex mix vigorously for at least 5 minutes after rehydration, and for at least 1 minute immediately prior to each use.

**STORAGE:** Store rehydrated material at 2-8°C for up to 4 weeks. Store lyophilized material at controlled room temperature or refrigerated as preferred. Diluted endotoxin should not be stored except under validated conditions.

**CAUTION: DO NOT FREEZE ENDOTOXIN SOLUTIONS**

Signature: Cynthia Black Date: 11 Dec 2007  
Cynthia Black, Technical Service

## ANEXO 3

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

**VIAL CONTENTS:** Endosafe<sup>®</sup> Control Standard Endotoxin is prepared from  $\beta$ -D-glucan and contains 10 ng of purified Lipopolysaccharide, freeze dried in a stabilized matrix.

**RSE/CSE RATIO:** The potency of this standard in Endotoxin units, (EU) has been determined to be 5 EU/ng by the method described in Appendix C (*Kinetic Technique*) of the *UNIT OF THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE TEST AS AN END PRODUCT ENDOTOXIN STANDARD FOR ANIMAL PARENTERAL DRUGS, BIOLOGICAL PRODUCTS, AND MEDICAL DEVICES*, Food and Drug Administration.

CSE Lot: EX72972 LAL Reagent Lot: Y4152E RSE Lot: ED-6-3

RSE/CSE Ratio: 5 EU/ng Vial contents: 50 EU/vial

**IS/CSE RATIO:** The Expert Committee on Biological Standardization of WHO has set 10,000 IU per vial of IS, so that 1 IU = 1 EU. The potency of this endotoxin standard in International Units, IU, has been designated as 6 IU/ng.

**DIRECTIONS FOR USE:** Reconstitute the lyophilized material with 1.2 mL of water to obtain 50 EU/mL or 50 IU/mL. Vortex mix vigorously for at least 5 minutes after rehy; immediately prior to each use.

**STORAGE:** Store rehydrated material at 2-8°C for up to 4 weeks. Store lyo; at room temperature or refrigerated as preferred. Diluted endotoxin should not be stored at room temperature.

## ANEXO 4

<b>PROCOLO DE VALIDAÇÃO</b>
-----------------------------

<b>TÍTULO: VALIDAÇÃO DO TESTE DE LAL PELO MÉTODO CINÉTICO-CROMOGÊNICO PARA DETERMINAÇÃO DE ENDOTOXINA NO BIOFÁRMACO ALFAINTERFERONA 2B HUMANA RECOMBINANTE 3MUI E 10 MUI</b>	<b>UO ELABORADORA: SEVAN</b>
	<b>NÚMERO: 3313</b>

**1- ALTERAÇÕES**

Revisão	Data	Alterações
00	06/01/2009	Emissão inicial.

**2- OBJETIVOS**

Este documento estabelece o protocolo para executar a validação pelo método de LAL cinético-cromogênico para detecção de endotoxinas bacterianas no biofármaco Alfainterferona 2b Humana Recombinante (apresentações 3MUI e 10 MUI), no laboratório de controle de qualidade de Biomanguinhos.

**3- CAMPO DE APLICAÇÃO**

Este protocolo, que foi elaborado conforme o DI 1223 – Validação de Métodos Analíticos, define os procedimentos de ensaio, referências e critérios de aceitação para comprovar que o método cinético-cromogênico para determinação de endotoxina em Alfainterferona 2b Humana Recombinante está sendo executado de forma eficaz e reprodutível.

A revalidação é necessária dependendo das modificações sofridas no método tais como: de ambiente, de equipamento, dos padrões do método (troca do fornecedor ou término do padrão utilizado). A validação inicial deve ser composta de no mínimo três lotes. Havendo necessidade de revalidação por mudança no método devem-se utilizar três lotes, e por mudança de fornecedor apenas um lote.

Todos os equipamentos e instrumentos utilizados nesta validação deverão ser qualificados ou, apenas, calibrados de acordo com as necessidades.

**4- RESPONSABILIDADES****4.1 – Da Seção de Validação Analítica (SEVAN)**

Atender o Plano Mestre de Validação.

Atender o cronograma acertado com o cliente.

Elaborar o protocolo e relatório de validação e passar para o cliente.

Atender a solicitação de alteração do protocolo conforme a necessidade do cliente.

Assegurar que os dados foram cuidadosamente analisados, registrados em formulários aprovados, datados e assinados.

Informar qualquer não-conformidade.

Elaborar plano de repetição dos ensaios.

Esclarecer qualquer dúvida.

Elaborar a documentação de validação.

Relatar ao DEGAQ qualquer desvio ao especificado.

#### **4.2- Das UO Clientes desta Validação**

Assegurar que os dados de controle dos insumos utilizados foram cuidadosamente registrados em formulários aprovados, datados e assinados.

Providenciar pessoal devidamente treinado para a execução da validação.

Garantir que os técnicos envolvidos estão qualificados.

Assegurar que os procedimentos sejam realizados corretamente segundo as IT's específicas.

Assegurar que todo o material envolvido na validação do método seja identificado de modo que estas informações possam ser registradas no protocolo de validação.

Providenciar todo material necessário à validação do método.

Garantir que os equipamentos e instrumentos que participam da validação do método estão certificados e/ou qualificados.

#### **4.3 – Do departamento de Garantia da Qualidade (DEGAQ)**

Controlar o protocolo.

Atender ao Plano Mestre de Validação (PMV).

Proceder ao Tratamento das Não-Conformidades quando qualquer desvio for relatado.

### **5- PRÉ-REQUISITOS**

#### **5.1– Documentação técnica**

Manual de Validação.

Plano Mestre de Validação.

IT ou POP Específico do Método

POP de Validação de Métodos Analíticos.

POP de Estatística Aplicada a Validação de Métodos Analíticos.

Memoriais de Ensaio.

Planilhas Validadas

Certificados de Qualificação / Calibração dos Equipamentos / Instrumentos envolvidos

#### **5.2– Equipamentos e instrumentos utilizados**

Micropipetas, micropipeta repetidora, leitor de microplacas associado ao software específico de leitura, geladeira com temperatura monitorada.

#### **5.3– Reagentes**

Reagente de LAL Endochrome-k licenciado e qualificado;

Certificado do fornecedor de CSE contendo a razão RSE/CSE em EU/ng e a combinação de lotes de LAL e CSE em EU/ng utilizados no teste;

Água de diluição com certificado de apirogenicidade.

## 6- PROCEDIMENTO DE QUALIFICAÇÃO DE INSTALAÇÃO

### 6.1- Princípio

A determinação de endotoxinas bacterianas em produtos biofarmacêuticos requer especial atenção, já que estes são produzidos para uso humano, como as drogas parenterais, pois podem gerar processos febris, choque séptico e até mesmo a morte.

O lisado de amebócitos de *Limulus* é um extrato aquoso das células sanguíneas (amebócitos) do caranguejo ferradura, *Limulus polyphemus*. Na presença de endotoxinas, certos fatores no LAL são ativados em uma cascata de reações que resultam na formação de um gel, aumentando a turbidez e o desenvolvimento de uma coloração amarelada (cinético-cromogênico). Em todas as versões do ensaio de LAL (gel clot, turbidimétrico e cromogênico), a concentração de endotoxinas será sempre inversamente proporcional ao tempo de reação, ou seja, quanto maior a concentração de endotoxinas, menor o tempo de reação.

O teste de LAL quando é utilizado de acordo com as diretrizes do FDA, pode complementar o teste de pirogênios da Farmacopéia Americana, para o controle de produto final de drogas injetáveis para uso humano, drogas injetáveis para uso animal e dispositivos médicos.

Notas: a) Para que o laboratório possa se considerar qualificado no teste de LAL para determinação de endotoxina, todos os analistas devem estar qualificados e também os reagentes devem estar qualificados;

b) Utiliza-se o mesmo teste para a qualificação de ambos, reagentes e analistas;

c) Novos analistas devem ser qualificados com reagentes previamente qualificados.

d) É necessária a realização de uma curva padrão de endotoxinas para todo ensaio. A sensibilidade ( $\lambda$ ) refere-se ao último ponto da curva padrão, onde se observa os parâmetros descritos nas farmacopéias americana e europeia.

### 6.2 – Procedimento de Validação

#### 6.2.1 – Aspectos gerais

- Identificar quais técnicos irão participar da validação;
- Verificar se todos os insumos e equipamentos utilizados nesta validação estão dentro do prazo de validade/calibração;
- Verificar se os técnicos realizam o processo de acordo com IT ou protocolos específicos;
- Observar e relatar todas as não-conformidades ocorridas durante os testes.

Para garantir a precisão ou validade das técnicas cromogênicas, os testes preparatórios são conduzidos para verificar que os critérios para a curva padrão são válidos e que as amostras não inibem ou aumentam a reação. A revalidação para o método é necessária quando as condições do ensaio são modificadas.

## 6.2.2 - Verificação dos Critérios para a Curva padrão

Usando uma solução padrão estoque de endotoxina, deve-se preparar não menos que três diluições para compor uma curva padrão. O ensaio deve ser realizado em triplicata para cada ponto da curva padrão, amostras, amostras propositalmente contaminadas (spike) e controle negativo, de acordo com as instruções do fabricante de LAL. O valor absoluto do coeficiente de correlação da curva,  $|r|$ , deve ser maior ou igual a 0,98 para uma faixa de concentrações de endotoxinas indicadas pelo fabricante do reagente LAL.

## 6.2.3 – Teste para verificação dos fatores de interferência para as técnicas fotométricas – Determinação da Especificidade do Método

Deve-se selecionar uma concentração de endotoxinas mais próxima do ponto médio da curva padrão. Preparar as seguintes soluções A, B, C e D como mostrado na tabela a seguir. Testar no mínimo em duplicatas as soluções de acordo com as instruções do reagente LAL utilizado (volume da amostra e reagente LAL, razão do volume da amostra para o reagente LAL, tempo de incubação, etc).

**Tabela I – Preparação das soluções para testes de Inibição/Crescimento**

Solução	Concentração de Endotoxina	Solução na qual a endotoxina é adicionada	Número de Replicatas
A <sup>a</sup>	Nenhuma	amostra	Não menos que 02
B <sup>b</sup>	Concentração média da curva padrão (spike)	amostra	Não menos que 02
C <sup>c</sup>	Curva padrão com pelo menos 03 pontos (a concentração mais baixa representa a sensibilidade $\lambda$ )	Água apirogênica	Não menos que 02
D <sup>d</sup>	Nenhuma	Água apirogênica	Não menos que 02

a Solução A: solução teste, deve ser diluída sem exceder o MVD

b Solução B: Solução teste na mesma diluição da solução A, com concentração conhecida de endotoxina (spike)

c Solução C: Curva padrão de endotoxina com pelo menos três concentrações

d Solução D: água de diluição (apirogênica)

Deve-se calcular a recuperação média da endotoxina adicionada (spike) pela concentração de endotoxina na amostra (se houver) na amostra que foi contaminada. Além do mais, para ser considerado livre de fatores de interferência sobre as condições do teste, a concentração quantificada de endotoxina adicionada como spike na amostra deve estar dentro de uma faixa de **50 a 200%** de recuperação, após a subtração de endotoxina detectada menos a endotoxina adicionada.

Quando os valores de recuperação de endotoxinas estiverem fora das faixas especificadas, os fatores de interferência devem ser removidos. A eficiência do tratamento é verificada pela repetição do teste para fatores de interferência.

### **6.3 – Critérios de Aceitação da Validação**

- Os resultados da série de controle C devem atender os requisitos de validação descritos na tabela de parâmetros de validação e especificações;
- A recuperação da endotoxina, calculados da concentração encontrada na solução B após subtração da concentração de endotoxina encontrada na solução A deve estar entre 50 e 200%;
- O resultado da série de controle negativo D não deve exceder ao limite de endotoxina ditado pela curva ( $\lambda$ ).

#### **6.3.1 – Precisão**

- Avaliar a precisão em três níveis: repetibilidade do método, precisão intermediária – variando dia e analista, repetibilidade do sistema.

#### **6.3.2 - Repetibilidade do Método**

- Preparar três diluições de cada amostra;
- Preparar três replicatas de cada amostra;
- Fazer três lotes individuais;
- Anotar os resultados em anexo.

#### **6.3.3 – Precisão Intermediária – variando dia e analista**

- Preparar no mínimo três replicatas de cada amostra;
- Fazer um lote individual; em dias diferentes e com analistas diferentes;
- Anotar os resultados em anexo;
- Estudar a equivalência das médias.

#### **6.3.4 - Repetibilidade do Sistema**

- Do mesmo lote utilizado para o teste de precisão intermediária, adotar uma única concentração e fazer 12 replicatas da mesma.
- Anotar os resultados em anexo

## 6.4 – Parâmetros da Validação e Suas Especificações

Parâmetro	Especificação
Coeficiente de correlação da curva-padrão  R	-1 a -0,98
Inclinação da curva-padrão (slope)  a	-0,3 a -0,1 (1)
y-interseção da curva padrão  b	+2,5 a +3,5
% de recuperação do controle positivo do produto	50 a 200%
% do coeficiente de variação das replicatas	Até 10% (para valores superiores ao $\lambda$ )
Faixa de leitura da curva-padrão (range)	2-3 log

(1) Mais severo que o Guideline do FDA (-1,0 a -0,1)

## 6.5 – Documentação

- Os resultados devem ser emitidos na revisão vigente do relatório de validação analítica do teste de LAL pelo método de cinético-cromogênico para determinação de endotoxina em Alfainterferona 2b Humana Recombinante 3 MUI e 10 MUI, que fica arquivado no LAMEV indexado por produto validado.

- O responsável pela UO recebe um certificado de validação do método, válido até que haja uma modificação no método.

## 7- RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUIDAS

SETBI, SEVAN.

## 8- ANEXOS

**A-** Fórmulas de cálculos

## ANEXO A (do ANEXO 4)

### Fórmulas de cálculos

Fórmula de cálculos

1 - Limite de endotoxina – EL

- **Valor máximo de endotoxina permitido (K)**
- Parenteral – 5,0 EU/kg
- Intrathecal – 0,2 EU/kg
- **Dose humana máxima/kg/hora (M)**

$$EL = \frac{K}{M} = \frac{5,0EU / kg}{M} = \frac{350EU}{dosagem}$$

2 - Concentração mínima válida – MVC

- **Menor concentração da amostra que pode ser testada com a requerida sensibilidade**
- **Usar quando o EL for expresso em unidades ou gramas**

$$MVC = \frac{(\lambda)(M)}{K} = \frac{\lambda}{EL}$$

3 - Diluição máxima válida

- **Maior diluição permitida que pode ser testada com a requerida sensibilidade**
- **Usar quando o EL for expresso em EU/mL**

$$MVD = \frac{(EL)(potência)}{\lambda} = \frac{EL}{\lambda} \text{ ou } \frac{Potência}{MVC}$$

## ANEXO 5

<b>PROCOLO DE VALIDAÇÃO</b>
-----------------------------

<b>TÍTULO: VALIDAÇÃO DO TESTE DE LAL PELO MÉTODO GEL-CLOT PARA DETERMINAÇÃO DE ENDOTOXINA NO BIOFÁRMACO ALFAINTERFERONA 2B HUMANA RECOMBINANTE 3MUI E 10 MUI</b>	<b>UO ELABORADORA: SEVAN</b>
	<b>NÚMERO: 3314</b>

**1- ALTERAÇÕES**

Revisão	Data	Alterações
00	07/01/2009	Emissão inicial.

**2- OBJETIVOS**

Assegurar que o método analítico Gel-Clot, para determinação de endotoxina no biofármaco alfainterferona 2b humana recombinante 3MUI e 10MUI, realizado em Bio-Manguinhos pelo Laboratório de Controle de Qualidade, está desempenhando sua função adequadamente.

**3- CAMPO DE APLICAÇÃO**

Este protocolo, que foi elaborado conforme o DI 1223 – Validação de Métodos Analíticos, define os procedimentos de ensaio, referências e critérios de aceitação para comprovar que o método de Gel-Clot para determinação de endotoxina no biofármaco alfainterferona 2b humana recombinante 3MUI e 10MUI está sendo executado de forma eficaz e reprodutível.

A revalidação é necessária dependendo das modificações sofridas no método tais como: de ambiente, de equipamento, dos padrões do método (troca do fornecedor ou término do padrão utilizado). A validação inicial deve ser composta no mínimo de 3 lotes. Havendo necessidade de revalidação por mudança no método deve-se utilizar 3 lotes, e por mudança de fornecedor apenas 1 lote.

Todos os equipamentos e instrumentos utilizados nesta validação deverão ser qualificados ou, apenas, calibrados de acordo com as necessidades.

**4- RESPONSABILIDADES****4.1- Da Seção de Validação Analítica (SEVAN)**

Atender o Plano Mestre de Validação.

Atender o cronograma acertado com o cliente.

Elaborar o protocolo e relatório de validação e passar para o cliente.

Atender a solicitação de alteração do protocolo conforme a necessidade do cliente.

Assegurar que os dados foram cuidadosamente analisados, registrados em formulários aprovados, datados e assinados.

Informar qualquer não-conformidade.

Elaborar plano de repetição dos ensaios.

Esclarecer qualquer dúvida.

Elaborar a documentação de validação.

Relatar ao DEGAQ qualquer desvio ao especificado.

#### **4.2- Das UO Clientes desta Validação**

Assegurar que os dados de controle dos insumos utilizados foram cuidadosamente registrados em formulários aprovados, datados e assinados.

Providenciar pessoal devidamente treinado para a execução da validação.

Garantir que os técnicos envolvidos estão qualificados.

Assegurar que os procedimentos sejam realizados corretamente segundo as IT's específicas.

Assegurar que todo o material envolvido na validação do método seja identificado de modo que estas informações possam ser registradas no protocolo de validação.

Providenciar todo material necessário à validação do método.

Garantir que os equipamentos e instrumentos que participam da validação do método estejam certificados e/ou qualificados.

#### **4.3- Do departamento de Garantia da Qualidade (DEGAQ)**

Controlar o protocolo.

Atender ao Plano Mestre de Validação.

Proceder ao Tratamento das Não-Conformidades quando qualquer desvio for relatado.

### **5- PRÉ-REQUISITOS**

#### **5.1- Documentação técnica**

Manual de Validação.

Plano Mestre de Validação.

IT ou POP Específico do Método

POP de Validação de Métodos Analíticos.

POP de Estatística Aplicada a Validação de Métodos Analíticos.

Memoriais de Ensaio.

Planilhas Validadas

Certificados de Qualificação / Calibração dos Equipamentos / Instrumentos envolvidos

#### **5.2- Equipamentos e Instrumentos Utilizados**

Banho-maria, micropipetas, termômetros, pHmêtro, geladeira com temperatura monitorada, forno de despirogenização.

#### **5.3- Reagentes**

Reagente de LAL licenciado e qualificado;

Certificado do fornecedor de CSE contendo a razão RSE/CSE em EU/ng e a combinação de lotes de LAL e CSE em EU/ng utilizados no teste;

### **6- PROCEDIMENTO DE QUALIFICAÇÃO DE INSTALAÇÃO**

#### **6.1- Testes de Qualificação – Confirmação da Sensibilidade do Reagente de LAL – Limite de Detecção do Método**

O teste baseia-se na realização de uma curva padrão de CSE ( $2\lambda$  a  $1/4\lambda$ ) em quadruplicata com um controle negativo de água;

Notas:

- Para que o laboratório possa se considerar qualificado no teste de LAL para determinação de endotoxina, todos os analistas devem estar qualificados e também os reagentes devem estar qualificados;
- Utiliza-se o mesmo teste para a qualificação de ambos, reagentes e analistas;
- Novos analistas devem ser qualificados com reagentes previamente qualificados.
- A qualificação de reagentes é requerida toda vez que um novo lote de LAL e/ou CSE for usado no laboratório.

Para que a qualificação seja considerada válida a amostra  $2\lambda$  deve gelificar e a amostra  $1/4\lambda$  não deve gelificar, assim como o controle negativo de água em todas as replicatas.

## 6.2- Procedimento de Validação

### 6.2.1- Aspectos gerais

Identificar quais técnicos irão participar da validação;

Verificar se todos os insumos e equipamentos utilizados nesta validação estão dentro do prazo de validade/calibração;

Verificar se os técnicos realizam o processo de acordo com IT ou protocolos específicos;

Observar e relatar todas as não-conformidades ocorridas durante os testes.

### 6.2.2 -Teste para Fatores de Interferência - Determinação da Especificidade do Método

**Tabela I – Preparação das soluções para testes de interferência**

Solução	Concentração de Endotoxina / Solução na qual a endotoxina será adicionada	Diluyente	Fator de diluição	Concentração inicial de Endotoxina	Número de Replicatas
A <sup>a</sup>	Não / amostra	-	-	-	4
B <sup>b</sup>	$2\lambda$ / amostra	amostra	1	$2\lambda$	4
			2	$1\lambda$	4
			4	$0,5\lambda$	4
			8	$0,25\lambda$	4
C <sup>c</sup>	$2\lambda$ / água apirogênica	Água apirogênica	1	$2\lambda$	2
			2	$1\lambda$	2
			4	$0,5\lambda$	2
			8	$0,25\lambda$	2
D <sup>d</sup>	Não / água apirogênica	-	-	-	2

a Solução A: solução da amostra em teste livre de endotoxinas detectáveis.

b Solução B: teste para interferência.

c Solução C: controle para sensibilidade de LAL.

d Solução D: controle negativo da água apirogênica.

Para a realização do teste de interferência é necessário que se calcule o limite de endotoxina (EL) do produto, a concentração mínima válida (MVC) ou a diluição máxima válida (MVD) (fórmulas em anexo);

Preparar várias diluições entre a amostra não diluída e o MVC ou MVD calculado;

Analisar estas diluições com o controle negativo do produto e o controle positivo do produto para determinar não interferência ou concentração/diluição compatível com o teste;

Selecionar uma concentração ou diluição do produto em que o controle negativo do produto não gelifique e que o controle positivo do produto forme gel;

Usar esta concentração/diluição para a fase de validação ou curva de produto;

A fase de validação requer 3 lotes de produto acabado, com uma diluição compatível determinada conforme descrito acima. Usar esta solução para fazer a série de diluição padrão ( $2\lambda$  -  $1/4\lambda$ ) conforme especificado na tabela I;

Estas curvas de produto são feitas em quadruplicata com a série controle positivo em água realizadas no mínimo em duplicata. Ambas as curvas devem confirmar o  $\lambda$ ;

Realizar nesta etapa a medida de pH da amostra + LAL (em partes iguais);

Se não for necessário o ajuste de pH, ou seja, o valor de pH da amostra + LAL ficar entre 6,8 e 7,5, conclui-se no protocolo de validação que não será requerido na rotina de análise deste produto, que sejam feitas medidas de pH. Caso contrário, se o ajuste de pH for parte da preparação da amostra, então medidas de pH são requeridas durante os testes de rotina deste produto.

### 6.3- Critérios de Aceitação da Validação

A série controle positiva em água deve confirmar Lambda;

A série controle positiva em produto deve confirmar Lambda;

Tanto o controle negativo em água quanto os controles de amostra não devem formar gel;

Se a sensibilidade do LAL determinada na presença da amostra sob teste da solução B da tabela I for  $\leq 2\lambda$  e  $\geq 1/4\lambda$ , a amostra não contém nenhum fator que interfira sobre as condições experimentais usadas;

Se este resultado não for alcançado, a solução examinada interfere com o teste. Caso isto ocorra, repetir o teste com uma maior diluição da amostra, que, no entanto ainda deverá ser menor que o MVD. O uso de um LAL mais sensível permite uma maior diluição da amostra, o que pode contribuir para a eliminação da interferência.

### 6.4- Parâmetros da Validação e Suas Especificações

Nº	Parâmetros de Avaliação	Conclusão
1	Limite de detecção	0,125EU/mL
2	Equivalência entre analistas e lotes	Conforme
3	Especificidade	Cálculo da máxima diluição válida Teste de fatores de interferência na técnica: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Não haver interferentes na análise até o valor da máxima diluição válida.</li> </ul>

## **6.5- Documentação**

Os resultados devem ser emitidos na revisão vigente do relatório de validação analítica do teste de LAL pelo método de Gel-Clot para determinação de endotoxina, que fica arquivado no LAMEV indexado por produto validado.

O responsável pela UO recebe um certificado de validação do método, válido até que haja uma modificação no método.

## **7- RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUIDAS**

SETBI, SEVAN.

## **8- ANEXOS**

**A- Fórmulas de cálculos (idêntica ao Anexo 4).**