

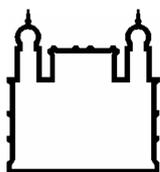
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INSTALADA PARA A PRODUÇÃO E
CERTIFICAÇÃO DE CÉLULAS ANIMAIS**

RODRIGO MARTINS BRETAS

Rio de Janeiro

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

RODRIGO MARTINS BRETAS

Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais

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

**RIO DE JANEIRO
2011**

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B755

Bretas, Rodrigo Martins. .

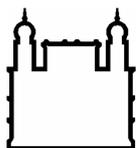
Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais / Rodrigo Martins Bretas . – Rio de Janeiro, 2011
xiv, 154 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia em Imunobiológicos, 2011.
Bibliografia: f. 123-134

1.Substrato celular. 2.Caracterização. 3. Boas práticas. I. Título.

CDD 571.6

Trabalho realizado na Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, sob a orientação do Dr. Marcos da Silva Freire e da Prof^a. Dr^a. Luciane Pinto Gaspar.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

RODRIGO MARTINS BRETAS

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INSTALADA PARA A PRODUÇÃO E
CERTIFICAÇÃO DE CÉLULAS ANIMAIS**

Orientadores: Dr. Marcos da Silva Freire
Prof^a. Dr^a. Luciane Pinto Gaspar

Dissertação aprovada em 29 de junho de 2011

Examinadores:

Dr. Rodrigo Coelho Ventura Pinto
Bio-Manguinhos/Fiocruz/Presidente

Prof. Dr. Gustavo Conde Menezes
Inmetro

Prof. Dr. Marco Antônio Stephano
USP

Rio de Janeiro
2011

AGRADECIMENTOS

À Fiocruz e Bio-Manguinhos pela oportunidade de cursar este Mestrado Profissionalizante, de grande importância em minha formação profissional.

À toda equipe do MPTI: Zaíra, Andrea, Dra. Sheila e Michele, todos os professores e colaboradores.

Ao Dr. Marcos Freire e à Dra. Luciane Gaspar, pela orientação brilhante a fim de gerar esta dissertação.

A todos os cientistas que participaram da pesquisa qualitativa, por sua contribuição direta no desenvolvimento do presente trabalho.

À Anvisa, em especial à minha gerente Laura Castanheira e coordenador Marcelo Moreira, por apoiarem e possibilitarem minha participação no curso.

Aos meus pais, Sílvio e Paulina Bretas, e toda a família, pela estrutura e apoio incondicionais, sempre.

Aos meus amigos da Anvisa, representados por Gustavo Santos e Márcia Scariot, pelas discussões sobre regulação e Boas Práticas.

Aos meus amigos do MPTI, representados por Janaína Duque, pela convivência enriquecedora e troca de experiências.

E a todos que auxiliaram direta ou indiretamente na conclusão desta pesquisa.

“A sorte favorece a mente bem preparada”.
(Louis Pasteur)

**“Toda reforma interior e toda mudança
para melhor dependem exclusivamente da
aplicação do nosso próprio esforço”.**
(Immanuel Kant)

ÍNDICE

Lista de abreviaturas e siglas.....	ix
Lista de tabelas.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1 Introdução.....	1
1.1 Aspectos históricos da cultura de células animais e produção de biológicos.....	1
1.1.1 Culturas primárias.....	2
1.1.2 Culturas de células diplóides.....	5
1.1.3 Linhagens contínuas.....	7
1.1.3.1 Células modificadas geneticamente.....	10
1.1.4 Outros sistemas de expressão.....	12
1.1.5 Produtos biológicos.....	14
1.1.6 Aplicações adicionais.....	15
1.2 Bancos de células.....	16
1.2.1 Coleções de referência mundial.....	18
1.2.2 Células Vero.....	21
1.2.3 Células CHO.....	22
1.2.4 Células MRC-5.....	24
1.3 Caracterização de bancos celulares.....	25
1.3.1 Tipos de testes utilizados para a caracterização de bancos de células.....	25
1.3.1.1 Identidade da cultura.....	26
1.3.1.2 Segurança relativa a contaminantes e resíduos.....	26
1.3.1.3 Estabilidade das características celulares.....	27
1.4 Regulamentação internacional e nacional.....	28
1.4.1 Registro de medicamentos biológicos no Brasil.....	30
1.4.2 Boas Práticas.....	32
1.4.2.1 Boas Práticas de Fabricação.....	33
1.4.2.2 Boas Práticas de Laboratório e Acreditação.....	40
1.4.2.3 Boas Práticas em Cultura de Células.....	43
1.4.2.4 Biossegurança.....	46
2 Objetivos.....	51
2.1 Objetivo geral.....	51
2.2 Objetivos específicos.....	51
3 Metodologia.....	52

3.1	Investigação sobre a capacidade instalada no país.....	52
3.1.1	Questionário.....	53
3.1.2	Aspectos éticos.....	54
3.2	Produtos biológicos registrados.....	55
3.3	Análise da regulamentação.....	56
4	Resultados e Discussão.....	58
4.1	Retorno dos questionários.....	58
4.1.1	Cenário nacional.....	58
4.1.1.1	Banco de Células do Rio de Janeiro.....	59
4.1.1.2	Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.....	60
4.1.1.3	Farmacore Biotecnologia Ltda.....	61
4.1.1.4	Fundação Ezequiel Dias.....	61
4.1.1.5	Instituto Adolfo Lutz.....	63
4.1.1.6	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos.....	64
4.1.1.7	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.....	66
4.1.1.8	Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares.....	67
4.1.1.9	Universidade de Brasília.....	68
4.1.1.10	Universidade de São Paulo.....	68
4.1.1.11	Centros pesquisados por meio eletrônico.....	70
4.1.1.12	Avaliação dos resultados nacionais.....	73
4.1.2	Cenário internacional.....	73
4.1.2.1	<i>BioReliance Limited</i>	74
4.1.2.2	<i>Charles River</i>	74
4.1.2.3	<i>Covance</i>	75
4.1.2.4	<i>Genibet Biopharmaceuticals</i>	75
4.1.2.5	Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica.....	76
4.1.2.6	<i>Invitrogen</i>	76
4.1.2.7	<i>Lonza</i>	76
4.1.2.8	<i>Perkin Elmer</i>	76
4.1.2.9	<i>Sigma-Aldrich</i>	77
4.2	Produtos biológicos registrados.....	78
4.3	Testes de caracterização.....	80
4.3.1	Identidade das culturas.....	80
4.3.1.1	Determinação da espécie de origem.....	81
4.3.1.2	Análises genéticas.....	82
4.3.1.3	Outras abordagens.....	82
4.3.1.4	Células modificadas geneticamente.....	83
4.3.1.5	Programa de testes.....	84
4.3.2	Segurança.....	86
4.3.2.1	Importância de avaliar a pureza de cultivos celulares.....	86
4.3.2.2	Vírus.....	90
4.3.2.3	Bactérias e fungos.....	99
4.3.2.4	Micoplasma.....	100

4.3.2.5 Prions.....	102
4.3.2.6 Tumorigenicidade e oncogenicidade.....	103
4.3.2.7 Validação da redução de contaminantes.....	106
4.3.3 Estabilidade.....	108
4.3.4 Certificação de células de interesse para Bio-Manguinhos.....	111
4.4 Aplicação das Boas Práticas.....	114
4.4.1 Áreas limpas.....	114
4.4.2 Produção de biológicos.....	115
4.4.3 Produção de insumos.....	116
4.4.4 Métodos analíticos e laboratórios para certificação de bancos.....	117
4.5 Lacunas na regulamentação e proposta de guia.....	118
4.6 Boas Práticas Regulatórias.....	119
5 Conclusões.....	122
Referências Bibliográficas.....	123
Anexos.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC – “*American Type Culture Collection*” – Coleção Americana de Culturas
- BCM – Banco de Células Mestre
- BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro
- BCT – Banco de Células de Trabalho
- BIO-MANGUINHOS – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
- BPC – Boas Práticas Clínicas
- BPCC – Boas Práticas em Cultura de Células
- BPF – Boas Práticas de Fabricação
- BPL – Boas Práticas de Laboratório
- CIBIO – Comissão Interna de Biossegurança
- CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
- CP – Consulta Pública
- CQ – Controle de Qualidade
- CTNBIO – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- DSMZ – “*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*” – Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas Celulares
- ECCAC – “*European Collection of Animal Cell Cultures*” – Coleção Européia de Culturas de Células Animais
- EMA – “*European Medicines Agency*” – Agência Européia de Medicamentos
- GQ – Garantia da Qualidade
- FDA – “*Food and Drug Administration*” – Administração de Alimentos e Medicamentos
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- HEMOBRÁS – Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia
- HLA – “*Human Leukocyte Antigen*” – Antígeno de Leucócito Humano
- IAL – Instituto Adolfo Lutz
- IB – Instituto Butantan
- ICH – “*The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*” – Conferência Internacional sobre a

Harmonização dos Requerimentos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano

IN – Instrução Normativa

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IPT – Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo

LECC – Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares

MCT – Ministério da Ciência e Tecnologia

MS – Ministério da Saúde

NAT – “*Nucleic Acid Testing*” – Teste de Ácido Nucléico

NB – Nível de Biossegurança

OECD – “*Organisation for Economic Co-operation and Development*” – Organização pela Cooperação Econômica e Desenvolvimento

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – “*Polimerase Chain Reaction*” - Reação em Cadeia da Polimerase

PERT – “*Product-enhanced reverse transcriptase*” – Transcriptase Reversa intensificada pelo Produto

PNI – Programa Nacional de Imunizações

POP – Procedimento Operacional Padrão

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE - Resolução

RFLP – “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” – polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição

SPF – “*Specific Pathogen Free*” – livre de patógeno específico

TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFSCAR – Universidade Federal de São Carlos

UNB – Universidade de Brasília

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

VISA – Vigilância Sanitária

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Regulamentação nacional consultada.....	57
Tabela 4.1 – Relação de células e atividades realizadas pela Cristália.....	60
Tabela 4.2 – Relação de células e atividades realizadas pela Funed.....	62
Tabela 4.3 – Relação de testes de caracterização realizados pelo IAL.....	63
Tabela 4.4 – Relação de células e atividades realizadas com biológicos em Bio-Manguinhos.....	65
Tabela 4.5 – Relação de testes de pureza realizados por Bio-Manguinhos.....	65
Tabela 4.6 – Relação de células usadas para testes de vacinas pelo INCQS.....	67
Tabela 4.7 – Relação de células e produtos em desenvolvimento pela UnB.....	68
Tabela 4.8 – Relação de células usadas pela USP.....	69
Tabela 4.9 – Possíveis parcerias de Bio-Manguinhos para testes de certificação.....	69
Tabela 4.10 – Resumo das atividades realizadas com cultivos celulares e <i>status</i> regulatório dos centros nacionais investigados.....	70
Tabela 4.11 – Resumo das atividades realizadas com cultivos celulares e <i>status</i> regulatório dos centros internacionais investigados.....	77
Tabela 4.12 – Exemplos de vacinas obtidas em células Vero e MRC-5 registradas no Brasil.....	78
Tabela 4.13 – Exemplos de biofármacos obtidos em células CHO registrados no Brasil.....	79
Tabela 4.14 – Diferenças entre os métodos da OMS e FDA para testes em camundongos adultos.....	93
Tabela 4.15 – Diferenças entre os métodos da OMS e FDA para testes em camundongos neonatos.....	94
Tabela 4.16 – Diferenças entre os métodos da OMS e FDA para testes em ovos embrionados.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Perfil dos participantes da pesquisa por natureza pública ou privada.....	58
Figura 4.2 – Perfil dos participantes da pesquisa por área de atuação.....	59

RESUMO

A cultura de células animais tem sido usada como ferramenta em diversas áreas das ciências biológicas, desde a pesquisa básica até as aplicações em medicina. Como plataforma tecnológica, substratos celulares são úteis, em especial quando armazenados na forma de bancos, para a produção de inúmeros produtos biológicos, dentre os quais figuram as proteínas recombinantes de interesse terapêutico e vacinas virais para uso humano. A caracterização ou certificação de tais bancos está baseada na determinação de seus aspectos de identidade, pureza e estabilidade.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade instalada no país para o estabelecimento e certificação de células animais, em especial as de mamíferos, visando à produção de medicamentos biológicos. Para tal, foram investigados os centros nacionais que atuam com pesquisa, desenvolvimento, controle e produção usando bancos de células. Cientistas de tais centros foram procurados para preencher um questionário a fim de estabelecer o perfil e capacidades presentes no país. Paralelamente, foi realizado levantamento e análise de toda regulamentação, nacional e internacional, relacionada à geração e certificação de substratos celulares usados com fins industriais.

A comparação entre o cenário nacional e o internacional revelou que a maioria dos centros no país atua na pesquisa e desenvolvimento de biológicos; alguns desenvolvem atividades de testes de controle; e apenas dois produzem biofármacos ou vacinas. Os centros buscam adequação a regulações para que suas atividades sejam reconhecidamente aderentes a um sistema de qualidade; vários destes são potenciais parceiros para Bio-Manguinhos. Em contraste, a maioria das empresas identificadas no exterior já desenvolve bancos de células animais em conformidade às Boas Práticas de Fabricação.

Foi identificada uma lacuna regulatória nacional com relação aos temas específicos levantados na pesquisa. Neste sentido, o trabalho culmina com uma proposta inicial de guia para orientar o setor produtivo quanto ao estabelecimento e certificação de bancos de células. A geração dos substratos celulares deve ser realizada em conformidade às Boas Práticas de Fabricação, em especial no que tange a aspectos como classificação de salas limpas, validações e qualificações; tal adesão deve ser verificada por inspeção por parte de Autoridade Sanitária. De forma similar, os testes para determinação do perfil de segurança devem seguir métodos validados, quando aplicável, realizados por laboratórios aderentes a um sistema de qualidade; tal fato deve ser verificado pelo cumprimento das Boas Práticas de Laboratório ou acreditação por uma Autoridade Nacional.

A geração de bancos de células em condições certificadas, bem como sua caracterização por métodos válidos e aceitos, confere os atributos de autenticidade, pureza e estabilidade a esses substratos, o que irá implicar na produção de medicamentos biológicos de qualidade, eficazes e seguros.

Palavras-chave: substrato celular, caracterização, Boas Práticas.

ABSTRACT

Animal cell culture has been used as a tool in several fields within biology, from basic research to medical applications. As a technological platform, cell substrates are useful, especially when stored as banks, for the production of many biologicals such as recombinant proteins of therapeutic interest and viral vaccines for human use. The characterization or certification of such banks is based on the determination of their identity, purity and stability features.

The present work aimed to assess the installed capacity in the country for establishing and certifying animal cells, especially the ones from mammals, for the production of biologicals. Thus, national centers dealing with research, development, control and production were investigated. Their scientists were requested to fill in a questionnaire in order to draw the profile and capacities present in the country. In parallel, all regulation, national and international, was searched and analyzed, regarding generation and certification of cell substrates used for industrial purposes.

The comparison between national and international scenarios showed that most national centers are involved with biologicals research and development; some act in testing and control; and only two produce biomedicines or vaccines. Centers seek adequacy to regulations so that their activities be acknowledged as compliant to a quality system; several of such centers are potential partners to Bio-Manguinhos. In contrast, most international companies identified already develop animal cell banks according to Good Manufacturing Practices.

A national regulatory gap was identified regarding specific topics raised in the research. This way, the work culminates with an initial draft version of a guideline to orient the productive sector in establishing and certifying cell banks. Such banks must be generated in conformity to Good Manufacturing Practices, especially in aspects as classification of clean rooms, validations and qualifications; such compliance must be verified by the Health Authority. Similarly, tests to determine the safety profile must follow validated methods, when applicable, performed by laboratories which comply to a quality system; this must be verified by fulfillment of Good Laboratory Practices or accreditation by a National Authority.

Generation of cell banks under certified conditions, as well as their characterization by valid and accepted methods, grants the attributes of authenticity, purity and stability to these substrates, which will implicate in the production of biologicals with quality, efficacy and safety.

Key words: cell substrate, characterization, Good Practices.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos do cultivo de células animais e produção de biológicos

Muitos dos eventos importantes ao longo do desenvolvimento da biotecnologia, em sua aplicação na área de saúde humana, foram protagonizados pelos avanços do cultivo de células e tecidos em laboratório (Augusto e Oliveira, 2001), configurando-se como uma das áreas capazes de conectar a pesquisa fundamental à exploração industrial (Freshney, 2003).

A tentativa de manter tecidos vivos *in vitro* remonta a 1885, quando o embriologista Roux conseguiu fazer com que células embrionárias de galinha, expostas a solução salina morna, sobrevivessem por alguns dias. No entanto, o nascimento da cultura de tecidos como técnica e ciência ocorreu em 1907, quando Ross Harrison retirou cirurgicamente um fragmento, ou explante, do tecido nervoso de um embrião de sapo, e o manteve com vida pelo método da “gota suspensa”, em contato com linfa coagulada, a qual fornecia sustentação e nutrientes apropriados ao crescimento celular (Unchern, 1999).

Em 1916, os pesquisadores Rous e Jones introduziram o uso da tripsina, uma protease inespecífica, para degradar o material extracelular e desta forma dissociar as células do tecido original (ou outra matriz à qual estejam aderidas), bem como umas das outras. Assim, foi possível isolar um tecido primário sólido, tratá-lo com a referida enzima (ou “tripsinizá-lo”) e obter células aderentes individualizadas. As células assim obtidas, mas também aquelas que já originalmente não necessitam de adesão a uma matriz (como as sanguíneas), podem ser semeadas em um frasco ou suporte em laboratório, e gerar uma cultura de células *in vitro* (Unchern 1999, Freshney 2010).

Em 1927, com a possibilidade de manter células por períodos maiores em laboratório, Carrel e Rivera conseguiram produzir a primeira vacina viral, a vaccínia. Em 1949, Enders e cols. cresceram poliovírus pela primeira vez, em culturas de células embrionárias humanas. O ensaio de formação de placas foi estabelecido em 1952, por Dulbecco, para detectar a presença de vírus animais em monocamadas confluentes (Unchern 1999, Augusto e Oliveira 2001).

A pesquisa sobre vacinas virais durante a 2ª Guerra Mundial (1939-45) foi uma das grandes incentivadoras ao desenvolvimento do cultivo de células animais, especialmente para a poliomielite. A vacina inativada para a pólio, conhecida internacionalmente como Salk, foi produzida em grandes quantidades usando células primárias de rim de macaco em 1954, e registrada nos EUA em 1955. A vacina atenuada (viva), conhecida como Sabin, foi licenciada em 1962 (Alves *et al.*, 2008).

Na década de 1950, o uso de cultivos celulares, enquanto técnica de laboratório estabelecida fortemente, foi um passo fundamental para a área da virologia, e ambas passaram a se desenvolver de forma conjunta e retroalimentada. O cultivo de vírus passou a não ser restrito ao uso de ovos embrionados, e hoje é possível ampliar a quantidade de partículas virais para fins de experimentos de bancada, ou em larga escala dentro de biorreatores para produzir vacinas virais. Este tipo de produto biológico é basicamente produzido ao se promover a infecção de células por vírus em um biorreator; desta forma, as partículas virais se multiplicam, são coletadas, alternativamente mortas (para gerar as vacinas inativadas) e formuladas para uso humano (Carvalho Mello *et al.*, 2008).

O presente trabalho está focado na produção e certificação de células animais usadas como material de partida ou plataforma tecnológica na produção de medicamentos biológicos, em especial as linhagens Vero, CHO e MRC-5, derivadas de mamíferos. Células como estas vêm sendo usadas ao longo de décadas em diversas áreas das ciências biológicas, desde a pesquisa básica até a produção de medicamentos para uso humano.

1.1.1 Culturas primárias

Estas culturas são obtidas diretamente a partir de determinados órgãos ou tecidos animais, pela homogeneização e tratamento enzimático (OMS, 1998). O protocolo pode ser iniciado pela dissecação de um tecido, seguida por tratamento com tripsina ou outra enzima, como a colagenase, a fim de degradar o tecido conjuntivo. Pode-se cortar finamente um tecido, de modo a se obter um explante primário a ser subdividido. Ao fim, são geradas células individualizadas e destacadas umas das outras e de sua matriz extracelular, que podem ser acondicionadas em garrafas de cultura ou biorreatores (Léo *et al.*, 2008).

As culturas primárias podem ser oriundas de tecido não-tumoral (“normal”) ou tumoral. Células não-tumorais mantêm suas características diplóides, são dependentes de aderência (ou ancoragem) a um suporte a fim de se acomodarem e dividirem. Elas apresentam

inibição por contato e limitação do crescimento em alta densidade, isto é, reduzem sua proliferação quando alcançam a confluência dentro de um recipiente de cultura, em razão dos sinais trocados nos contatos célula-célula. Têm vida finita e não são tumorigênicas, isto é, não formam tumores ou nódulos quando injetadas em animais imunodeficientes (Augusto e Oliveira, 2001). Suas necessidades nutricionais são complexas, frequentemente requerendo meios enriquecidos e suplementação, em geral com soro fetal bovino (Coecke *et al.*, 2005). Já as células independentes de ancoragem crescem em suspensão, como algumas células sanguíneas e tumorais, e também podem gerar culturas primárias, sendo necessário apenas sua coleta e transferência para um recipiente com meio (Freshney, 2010).

Dependentes ou não de adesão, as culturas primárias representam o cenário mais próximo daquele encontrado *in vivo*, com tipos celulares heterogêneos e em diferentes estágios de diferenciação, com suas características metabólicas preservadas e ampla sensibilidade a diferentes vírus (Coecke *et al.*, 2005). Além disso, é mantida certa arquitetura tecidual – ponderando-se que, diferentemente do arranjo tridimensional em um tecido, células mantidas *in vitro* podem crescer como culturas em suspensão; ou sobre uma superfície sobre a qual os tipos celulares aderentes podem crescer e se dividir (Alves *et al.*, 2008).

As referidas culturas, por definição, não sofrem repiques subsequentes, também chamados de subcultivos ou passagens. Tais termos se referem às operações com enzimas, descolamento mecânico ou diluições (para células em suspensão) em que se retiram as células de um suporte original para inoculação em outro(s), geralmente visando promover a multiplicação e aumento de densidade dessa biomassa (Almeida, 2009).

Alternativamente, algumas células de culturas primárias conseguem proliferar por algumas passagens, gerando “culturas de passagens iniciais” (Coecke *et al.* 2005, OMS 2010). Estas culturas em série, ou subculturas, não podem mais ser consideradas primárias, tampouco são mantidas por maior tempo como linhagens, mas ainda retêm algumas características do tecido original. Podem ser empregadas para detectar a presença viral em amostras, especialmente em espécimes citopatogênicos; e ainda para permitir a replicação dos vírus da rubéola, sarampo e poliomielite no processo de fabricação de vacinas virais inativadas (Alves *et al.*, 2008).

Um problema que frequentemente limitava a manutenção das culturas primárias era a contaminação por fungos e bactérias. Quando presentes nos meios empregados, ricos em nutrientes, estes microorganismos crescem em uma taxa bem maior que aquela exibida por células animais, depletam os componentes da solução, secretam metabólitos tóxicos e

culminam por causar a morte da cultura. No entanto, estas adversidades foram reduzidas graças a alguns avanços importantes, como a aplicação de técnica asséptica pelo cirurgião Alexis Carrel em 1913; a adição de antibióticos aos meios de cultura em 1940, como penicilina e estreptomicina; e o uso de cabines de fluxo laminar nos anos 70, as quais filtram o ar de entrada e geram uma atmosfera estéril para as manipulações (Unchern, 1999).

Exemplos atuais de vacinas produzidas em culturas primárias incluem pólio em células de rim de macaco, encefalite japonesa em células de rim de *hamster* e vacina contra sarampo e caxumba em fibroblastos de embrião de galinha (Almeida, 2009).

Apesar da facilidade de crescimento em meio básico suplementado e de sua sensibilidade a uma amplitude de vírus, existem algumas desvantagens na cultura de células primárias. A contaminação por agentes adventícios é frequente, especialmente por vírus oriundos do animal doador do tecido, bem como por bactérias – e esta obriga o operador a adicionar antibióticos ao meio de cultura. Há variação na qualidade e sensibilidade das culturas; e a cultura exibe curta vida em laboratório, não podendo ser estocada na forma de banco celular nem caracterizada de forma extensiva – são consideradas, portanto, células ou culturas de produção (OMS, 1998; 2010). Com o tempo, por não sofrerem mais as interações originais de um tecido, as células *in vitro* perdem a polaridade característica de seu fenótipo, tornando-se mais arredondadas (Léo *et al.*, 2008).

Culturas primárias podem posteriormente dar origem a dois tipos de linhagens de células: aquelas com características diplóides e as linhagens contínuas (Alves *et al.*, 2008). Para que tal ocorra, é necessário que haja um aumento do número total de células ao longo de várias gerações, levando à predominância de um tipo celular com alta capacidade proliferativa e que, portanto, atinja certo grau de homogeneidade nesta população celular (Freshney, 2010).

Com relação à certificação de culturas em passagens iniciais, são necessárias abordagens diferentes daquelas usadas para linhagens diplóides ou contínuas, pois o foco recai sobre os cuidados iniciais e o histórico de desenvolvimento. Um lote, para fins produtivos, deve ser considerado como a cultura derivada de um ou mais animais que foram sujeitos a processo comum de retirada do tecido, desagregação e processamento, e estes procedimentos devem ser reprodutíveis. O material biológico deve ser originado de animais saudáveis, preferencialmente livres de patógenos específicos, conforme as condições de criação e avaliação veterinária e laboratorial. É necessário que haja rastreabilidade até estes animais de origem, suas condições de criação e procriação, cuidados e intervenções, anestesia e reagentes utilizados na obtenção da cultura primária. Devem ser fornecidas informações

sobre os procedimentos para isolar células a partir dos tecidos, estabelecer e manter as culturas primárias; e o programa de testes de segurança deve levar em consideração a origem do animal e do tecido, podendo ser conduzida de forma concomitante à produção, a fim de detectar agentes contaminantes como vírus (ICH 1997a, OMS 2010).

1.1.2 Culturas de células diplóides

Após sucessivos repiques de uma cultura primária inicialmente heterogênea, surge uma linhagem mais homogênea, com maior velocidade de crescimento e que, portanto, passa a predominar em cultura. Estas células podem dar origem a uma linhagem diplóide, composta por células que mantêm algum grau de diferenciação, exibindo características de seu tecido de origem. Elas são “normais (não-tumorigênicas) e têm vida finita (Augusto e Oliveira, 2001); têm ainda os cromossomos pareados, e são estruturalmente idênticas às células que lhes deram origem (ICH, 1997). Com relação à citogenética, estas células apresentam cariótipo com o padrão esperado ou próximo a este (FDA, 2010).

A partir dos anos 50, houve grande crescimento da área de cultivos celulares, com o estabelecimento de diversas linhagens e aprofundamento dos aspectos da biologia celular. A grande atenção dada aos meios de cultura levou à criação de formulações definidas (Unchern 1999, Freshney 2010), ou seja, meios com componentes químicos selecionados, como hormônios, vitaminas, fatores de crescimento, dentre muitas outras substâncias. O uso de tais meios é cada vez mais importante, pois facilita o controle de qualidade e dispensa o uso de materiais derivados de animais. O soro fetal bovino, por exemplo, é amplamente usado para suplementar um meio de cultivo basal, porém pode conter diversos contaminantes, inclusive micoplasmas e príons (Moraes *et al.* 2008, FDA 2010).

Exemplos de linhagens diplóides incluem MRC-5, de origem humana, e FRhL-2, de macaco rhesus (OMS, 1998). A WI-38 também é derivada de tecido humano, e foi a primeira desta classe, estabelecida em 1961/62 por Hayflick e Moorhead a partir de pulmão embrionário humano. Ela é usada na produção de vacinas humanas como caxumba (Augusto e Oliveira, 2001), e sobrevive por cerca de 50 gerações, como geralmente ocorre com linhagens diplóides humanas (Léo *et al.*, 2008). Até o fim de sua vida em laboratório, não exhibe as contaminações virais presentes em células primárias de macacos, o que representa uma grande vantagem. Tais células foram adotadas como base para produção de vacinas

virais de uso humano, incluindo pólio (Alves *et al.*, 2008), raiva e rubéola entre 1964-1969 (Freshney, 2010).

A substituição de culturas de células primárias por outras de células diplóides se baseava nas vantagens percebidas neste modelo. Culturas diplóides podem ser estocadas em um sistema de banco de células (OMS, 2010), o qual pode ser congelado ou criopreservado (em tanques com nitrogênio líquido ou frízeres ultrafrios), a fim de armazenar uma fonte homogênea e estável de células. Este procedimento pode ser realizado com o auxílio de substâncias protetoras como DMSO e glicerol; e deve evitar injúrias, que podem causar danos funcionais e morfológicos nas células. A temperaturas de -196°C , ainda podem ocorrer formação de radicais livres e danos macromoleculares devido às radiações ionizantes (Alves *et al.*, 2008).

A segurança das linhagens diplóides é outra vantagem em seu uso, e esteve associada a fatores como a ausência de contaminações microbiológicas e baixo índice de aparecimento de células tumorais. Isto era atestado pelo seu cariótipo com padrão esperado, expectativa limitada de vida em laboratório e pela não formação de tumores em animais imunossuprimidos. Desta forma, inicialmente a segurança do produto era garantida pela realização de testes para agentes adventícios, cariologia e tumorigenicidade lote-a-lote para a liberação da vacina. No entanto, foi consentido que o teste para o potencial tumorigênico seria melhor aplicado apenas no momento de uma extensiva caracterização do banco de células mestre, bem como das células após o processo de fabricação, para linhagens diplóides e contínuas (OMS, 2010). De fato, o uso deste tipo de cultivo se provou seguro ao longo do tempo, mas sua aplicabilidade na indústria é limitada devido aos seus maiores requerimentos nutricionais, bem como à dificuldade de cultivo em biorreatores de alta escala produtiva (OMS, 1998).

Durante a confecção da presente dissertação, foi identificada uma diferença no que tange à nomenclatura de células diplóides. O documento mais recente da agência sanitária americana, a Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration* ou FDA), publicado em 2010, considera o termo “cepa” (do inglês *strain*) para este tipo de cultura, uma vez que sua definição para “linhagem” subentende que as células foram originadas de uma cultura primária e sobreviveram pelas etapas de crise e senescência; logo, se aplicaria apenas às células imortais que formam linhagens contínuas. Seu guia anterior (FDA, 1993), no entanto, se referia a ambos os tipos de culturas como linhagens. Este trabalho adota o exposto nos documento sobre caracterização de substratos celulares da

Conferência Internacional sobre a Harmonização dos Requerimentos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (*The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* ou ICH (1997) e da Organização Mundial da Saúde (OMS 1998, 2010), que consideram linhagem como um tipo de população de células também originada de uma população primária, passível de ser estocada na forma de banco, incluindo as culturas diplóides.

Em certa idade *in vitro*, as células diplóides sofrem senescência, processo pelo qual param de se multiplicar e morrem, pois as poucas alterações genéticas que elas sofreram não as tornam tumorigênicas (imortalizadas). Como ocorrem alterações à medida que se aproximam deste estágio, elas devem ser usadas até um limite determinado em termos de número de duplicações populacionais, para que haja validade e segurança de seu uso em pesquisa e produção (ICH 1997, Coecke *et al.* 2005).

1.1.3 Linhagens contínuas

Desde o isolamento inicial de uma cultura primária, são exercidas várias pressões seletivas sobre as células. Predominam aquelas que conseguem migrar do explante de tecido, sobrevivem aos traumas causados pelos tratamentos enzimático e mecânico, aderem a um substrato de plástico, vidro ou em suspensão, apresentam maior capacidade proliferativa e se adaptam ao ambiente e ao meio de cultivo. Ao longo das passagens, se firma uma linhagem homogênea que, se for composta por células “normais” (exceto as progenitoras), irá, em algum momento, parar de proliferar e morrer. No entanto, é possível gerar linhagens de células com capacidade de driblar a senescência e se replicar aparentemente de forma indefinida (Freshney, 2010).

Antigamente denominadas “estabelecidas”, estas linhagens são compostas por células que, por algum dos motivos descritos abaixo, sofreram alterações em seu genoma que alteraram os estímulos relacionados ao controle do ciclo celular, e se tornaram imortais, tendo assim um período de vida virtualmente infinito quando mantidas em laboratório. Atualmente denominadas “transformadas” ou “contínuas”, tais culturas apresentam crescimento rápido e robusto (Augusto e Oliveira, 2001) e garantem um suprimento ilimitado de células. Elas exibem também alterações na morfologia (redução do tamanho, aderência e volume do citoplasma) e alta eficiência de clonagem (Léo *et al.*, 2008). Podem crescer aderidas ou não a um suporte, e podem ser obtidas, de acordo com Alves *et al.* (2008), pelas seguintes formas:

(a) subcultivo de uma população de células animais normais, que em dado momento podem espontaneamente sofrer uma transformação rara *in vitro* e se tornarem imortalizadas;

(b) subcultivo serial de células tumorais, que originalmente já apresentam o ciclo celular desregulado, logo não chegam à senescência;

(c) fusão com outro tipo celular imortalizado, como no caso dos hibridomas, em que um determinado clone de linfócito B é fundido a um mieloma, gerando uma célula nova com capacidade de replicar indefinidamente, secretando imunoglobulinas de uma só especificidade;

(d) transformação de uma linhagem normal com o auxílio de um vírus oncogênico, tal qual o Epstein-Barr ou um retrovírus;

(e) introdução, em seu genoma, de genes virais ou oncogenes capazes de evitar a senescência, como os genes E6 e E7 do papilomavírus humano;

(f) indução por agentes químicos carcinogênicos.

Hartung (2005) ainda aponta possibilidades adicionais:

(g) transfecção de genes como o E1 do adenovírus ou telomerase;

(h) isolamento a partir de animais transgênicos

Os primeiros cultivos de células humanas foram linhagens contínuas derivadas de tumores, que podiam ser prontamente cultivadas em laboratório, mas hoje englobam as células Vero e CHO, dentre muitas outras como os hibridomas (OMS 1998, Freshney 2010).

Em 1952, muitos testes da vacina contra a poliomielite foram efetuados em células HeLa, uma linhagem celular imortal isolada a partir de um câncer cervical humano muito agressivo, cujas células possuem grande capacidade proliferativa. No ano de 1954, estas células foram rejeitadas como substrato para a produção de uma vacina experimental de

adenovírus, em detrimento de culturas primárias, então consideradas “normais” (OMS, 2010). No entanto, células HeLa já foram parte de estudos para quimioterapia, clonagem, mapeamento genético e fertilização, dentre outros.

Em 1965, Ham introduziu um meio sem soro que suportava o crescimento de algumas células, tornando possível a clonagem de células de *hamster* chinês em tal ambiente. Nesta época também foi realizada a fusão entre duas células somáticas, uma humana e uma murina (derivada de camundongo), por Harris e Watkins, usando um vírus. A célula híbrida formada, ou “heterocarion”, abrigava o conteúdo citoplasmático e o material genético de ambas as progenitoras. Apenas em 1975 foi desenvolvida, por Kohler e Milstein, a tecnologia para obter hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (Augusto e Oliveira, 2001). Estas moléculas de alta especificidade são fundamentais para entender os epítomos de diversas substâncias antigênicas, e, devido à sua especificidade, são amplamente empregados em técnicas analíticas, kits de diagnóstico, tratamento contra vários tipos de doenças e como estratégia de purificação de moléculas (Freshney, 2010).

Atualmente há anticorpos monoclonais quiméricos, cuja sequência protéica contém aminoácidos murinos e humanos; há os humanizados, com maior proporção de sequência humana; e os humanos, com menor potencial de causar problemas relativos à imunogenicidade - portanto, com perfil de segurança melhor na terapêutica (Freshney, 2010).

Durante o ano de 1978, foi reconhecido que a produtividade de α -interferon (α -IFN) a partir de culturas primárias de linfócitos humanos não era satisfatória para a demanda. Neste contexto, foi proposto o uso de células Namalwa, uma linhagem contínua linfoblastóide humana, a fim de suprir a necessidade de IFN para pesquisa clínica. A preocupação inicial estava relacionada à presença do genoma do Epstein-Barr vírus integrado ao seu genoma; contudo, foi avaliado que, diferentemente dos vírus vacinais, o IFN não era um agente replicante, e que seu uso seria restrito à terapêutica, contrastando com as vacinas virais, às quais muito mais pessoas se exporiam em uma campanha de imunização em massa. Além disto, foi avaliado que as possíveis fontes de preocupação, como a presença de DNA com capacidade infectiva e as proteínas, teoricamente dotadas de capacidade oncogênica, poderiam ser eliminadas durante o processo de fabricação (OMS, 2010).

Uma validação de processo fabril bem executada, comprovando a redução de contaminantes ao longo de etapas como cromatografias, tratamento térmico e o uso de substâncias como β -propiolactona (capaz de inativar vírus e de destruir a atividade biológica do DNA) pode assegurar que o produto biológico final contenha níveis residuais de ácido

nucléico e proteínas da célula hospedeira (OMS, 2010), conforme discutido na seção 4.3.2.7. O produto foi finalmente licenciado em 1986 (Unchern 1999, Alves *et al.* 2008).

1.1.3.1 Células modificadas geneticamente

Em 1979 foi desenvolvida a primeira linhagem de célula geneticamente manipulada, possibilitando muitas pesquisas e o estudo da regulação da expressão gênica na década de 80, até culminar na produção de biofármacos, isto é, proteínas recombinantes sintetizadas a partir de organismos cultivados. Também foram estudados os oncogenes e os processos de malignidade e transformação; e em 1983, a regulação do ciclo celular, a imortalização de células com o vírus SV40, e o cultivo de pele reconstituída (Augusto e Oliveira 2001, Freshney 2010). Cada vez menos se usa a tecnologia de hibridomas, sendo preferível obter anticorpos monoclonais a partir de células engenheiradas para tal fim.

O início dos anos 80 também testemunhou o estabelecimento de linhagens murinas como NS0 e Sp2/0 (Almeida, 2009). Outro grande impulso foi a obtenção de roedores geneticamente puros, bem como a descoberta de que estes mamíferos são capazes de gerar linhagens contínuas e tumorais (Freshney, 2010).

O ativador de plasminogênio tecidual foi inicialmente produzido em 1984, a partir de células transfectadas de mamífero (CHO), e disponibilizado ao mercado em 1987. Em 1989, a eritropoetina recombinante entrou em pesquisa clínica. Em 1986, células Vero foram usadas para produção da vacina anti-rábica, e houve ampla geração de hibridomas para obtenção de novos anticorpos monoclonais (Unchern 1999, Alves *et al.* 2008).

Na década de 90, houve produção em escala industrial de células modificadas geneticamente para a produção de biofármacos, e diversos produtos recombinantes entraram em pesquisa clínica: antígeno de superfície da Hepatite B, fator VIII, glicoproteína 120 do HIV, *cluster* de diferenciação-4, fator de estimulação de colônia para granulócito, fator de crescimento epitelial, anticorpos monoclonais e interleucina-2 (Unchern 1999, Freshney 2010). Como exposto, o desenvolvimento da cultura de células foi muito impulsionado por áreas da pesquisa médica, como o estudo da neoplasia e a produção de vacinas virais (Freshney, 2010). O avanço na produção de proteínas recombinantes terapêuticas pelo cultivo de células se deve, ao menos parcialmente, à possibilidade de usar linhagens diplóides e imortalizadas caracterizadas, e a possibilidade de mantê-las preservadas por congelamento (Rodrigues e Moro, 2008).

Podem-se apontar algumas qualidades desejáveis ao selecionar uma linhagem que será transfectada para a expressão de proteínas recombinantes: a célula hospedeira deve apresentar facilidade à introdução do vetor de expressão e ter maquinaria para transcrever, traduzir, enovelar e processar a proteína de forma correta (Walsh, 2007). Para facilitar as etapas de purificação, é vantajoso usar uma linhagem que consiga crescer em meio de cultivo sem soro e que secrete a proteína para o meio extracelular. Quanto à etapa *upstream* do processo fabril (crescimento da massa celular e síntese da proteína recombinante), o tipo celular deve ser compatível e resistente ao sistema de cultivo empregado, como as tensões de cisalhamento e agressões mecânicas que geralmente decorrem da aeração, borbulhamento e agitação dentro de um biorreator, no exemplo de um processo com aeração de profundidade (Bollati-Fogolín e Comini, 2008).

A sequência de DNA contendo o gene de interesse, e adicionalmente os elementos regulatórios para a transcrição gênica (como promotores), é inserida em um vetor de expressão, como um plasmídeo. Em geral esta sequência exógena é incorporada nas células animais através de um dos métodos de transfecção, que incluem endocitose por co-precipitação com fosfato de cálcio, polímeros catiônicos ou lipossomas catiônicos. Além disto, o vetor pode ser introduzido pelo método físico da eletroporação, que induz microporos transientes na membrana plasmática (Shen *et al.* 2006, Bollati-Fogolín e Comini, 2008).

A fim de possibilitar a diferenciação e o isolamento das células que incorporaram os fragmentos genéticos, é interessante incluir no vetor uma sequência contendo um marcador de seleção. Esta sequência pode codificar uma proteína facilmente detectável (e cuja expressão, portanto, indique que o gene de interesse foi clonado com sucesso), como a proteína verde fluorescente ou a enzima luciferina (Shen *et al.* 2006, Bollati-Fogolín e Comini, 2008). Há ainda a possibilidade de usar marcadores como o gene da enzima diidrofolato redutase ou o da glutamina sintetase. As células contendo tais genes, ao serem expostas a meios específicos, sofrem uma pressão seletiva que leva à superexpressão das respectivas enzimas, junto com o biofármaco de interesse. Desta forma, se realiza amplificação da expressão protéica a fim de selecionar clones com grande produtividade específica (Butler, 2005).

A sequência de DNA introduzida na célula hospedeira pode ser expressa de forma transiente, modalidade na qual se replica de forma independente como um epissoma. Esta expressão dura até cerca de três dias, não requer marcadores de seleção e é útil para confirmar a integridade de um dado vetor. Já a expressão estável segue um protocolo mais demorado, mas pressupõe a integração do gene de interesse no genoma da célula hospedeira, por um

mecanismo de recombinação ilegítima. Desta forma, e com o uso de marcadores de seleção e/ou de amplificação, um biofármaco é produzido de forma ilimitada em grande escala (Bernard 2005, Bollati-Fogolín e Comini 2008).

A imortalidade das culturas contínuas as torna ideais para a formação de bancos celulares bem caracterizados e padronizados, capazes de entrarem na produção industrial de produtos biológicos em larga escala, e capazes de gerar de forma consistente proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais, vacinas e produtos para terapia gênica, requerendo apenas o crescimento com adição de meio de cultura suplementado ou definido (EMA, 2001).

No entanto, células imortalizadas podem ter características biológicas, bioquímicas, imunoquímicas (perda de marcadores do tecido original) e genéticas (instabilidade cromossômica) diferentes das células primárias e diplóides. A chance de serem tumorigênicas e conterem DNA que codifique proteínas oncogênicas gera novas preocupações quanto à segurança em relação aos demais tipos de culturas. As maiores preocupações com linhagens imortalizadas se referem à presença de vírus endógenos e tumorigenicidade (OMS, 2010), sendo esta última referente à transformação responsável pela imortalidade. Este fenômeno é acompanhado por alterações nas características morfológicas e de crescimento como: independência de ancoragem a um substrato ou capacidade de crescimento em meio semi-sólido, menor requerimento por soro, aneuploidia (número de cromossomos situado entre o diplóide e o tetraplóide) e heteroploidia (variações no número de cromossomos dentro de uma cultura), perda da inibição por contato e limitação do crescimento pela densidade de uma cultura. Tais pontos estão geralmente - porém não necessariamente - correlacionados a malignidades e tumorigenicidade (Freshney, 2010).

1.1.4 Outros sistemas de expressão

Muitos avanços na biotecnologia foram alcançados em sistemas de expressão envolvendo outros tipos de organismos, como a síntese do primeiro biofármaco, a insulina humana recombinante – que não é uma glicoproteína -, a partir do procarioto *E. coli*. Ela foi registrada nos EUA em 1982 para o tratamento de pacientes diabéticos, que até então contavam apenas com o produto extraído de porcos e bois (Augusto e Oliveira 2001, Butler 2005). Bactérias são apropriadas pelo seu rápido crescimento e alta produtividade, mas podem contaminar o meio com suas endotoxinas e exibem perfil diferente quanto às modificações nas proteínas sintetizadas.

Células de levedura são vantajosas por serem eucarióticas, possuem maquinário apropriado para uma série de modificações pós-traducionais e possibilitam muitas reações similares às que ocorrem em células de mamíferos, gerando produtos com perfil parecido, embora possa ocorrer hiperglicosilação antes da secreção protéica (Butler 2005, Almeida 2009). Outras reações incluem ainda processamento proteolítico, fosforilação e acetilação (ICH, 1995). No entanto, as proteínas sintetizadas em células de mamíferos, além de sofrerem tais modificações, também apresentam maior probabilidade de passarem por um correto processo de enovelamento e de serem secretadas para o meio extracelular, o que facilita as etapas de purificação (ou “*downstream*”) do biofármaco (OMS, 1991).

A fermentação dos microorganismos tem semelhanças ao cultivo de células animais no que diz respeito às técnicas de manipulação, esterilização, quantificação, controle de qualidade, ampliação de escala e formação de produtos (Augusto e Oliveira, 2001). Contudo, as células animais requerem condições especiais de cultivo, dada sua fragilidade mecânica quando expostas a manipulações e turbilhões em biorreatores (tensões de cisalhamento). Seus requerimentos nutricionais e de sinalizações são mais complexos, exigindo meios de cultivo diferenciados; elas podem necessitar de um suporte especial a fim de sobreviverem e proliferarem; e seu crescimento é mais lento (Léo *et al.*, 2008).

As células de insetos apresentam crescente interesse científico. Trata-se de células de animais invertebrados, em oposição àquelas derivadas de mamíferos como macacos, roedores e humanos. Elas possibilitam diversos alvos de estudo, como suas bases moleculares de desenvolvimento, e podem ser usadas em testes de toxicologia e virologia na área de agricultura e controle de pestes (Freshney, 2010). Quanto à aplicação industrial, constituem um dos sistemas de expressão usados atualmente para a produção, por exemplo, de uma vacina contra o papilomavírus humano¹, que têm como princípio ativo as partículas semelhantes a vírus (*Virus-Like Particles* ou *VLPs*). O processo fabril se apóia no uso de baculovírus como vetores para infectar células de insetos, que então passam a produzir as VLPs.

Há ainda pesquisa e/ou produção em outros tipos celulares, ao exemplo das células de aves, fungos filamentosos, plantas e até células germinais (Almeida 2009, OMS 2010).

¹ São usadas células da linhagem Hi-5 de *Trichoplusia ni*, conforme bula desta vacina disponível no endereço eletrônico da EMA.

1.1.5 Produtos biológicos

Os medicamentos biológicos são ferramentas de valor inestimável na prevenção e tratamento de inúmeras doenças que afetam o ser humano. Vacinas têm sido consideradas a melhor estratégia de combate às doenças infecciosas imunopreveníveis², e biofármacos são frequentemente produtos inovadores, que suprem demandas onde anteriormente não havia tratamento efetivo (Bradshaw, 2007).

A classe dos biológicos é definida e diferenciada dos medicamentos sintéticos em função de sua origem e pelas tecnologias de fabricação empregadas; além disto, estes medicamentos são muito complexos para serem caracterizados apenas por testes físico-químicos, e os métodos, processos e materiais nem sempre são reprodutíveis (Brasil, 2010b). Exemplos desta classe incluem, dentre outros, as vacinas, os biomedicamentos, anticorpos monoclonais e medicamentos contendo microorganismos vivos, atenuados ou mortos (Brasil, 2010c). Com a erradicação da varíola nos anos 70, novas e ambiciosas metas de combate a várias doenças surgiram e demonstram como a vacinação é uma área em constante crescimento. As iniciativas pós-varíola estão representadas pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) e Programas semelhantes em outros países, o Programa Ampliado de Imunizações da OMS e a meta de erradicação global da poliomielite (Hochman e Bhattacharya, 2011). A referida meta está prevista para se prolongar até o ano de 2015, e a Organização ainda investe em um programa para erradicação do sarampo, coordenando os programas de imunização do mundo através de suas representações regionais (Homma *et al.*, 2011). Os dados brasileiros publicados pelo PNI em 2003 revelam que a implementação de ações planejadas e sistematizadas, através de varreduras, campanhas, rotina e bloqueios, levou à erradicação da pólio em 1989 e controlou doenças como sarampo, tétano neonatal, a coqueluche e a difteria (Brasil, 2003e).

As vacinas disponíveis atualmente são derivadas de diversos processos fabris. Podem ser obtidas pelo crescimento de microorganismos patogênicos ao homem, como bactérias e vírus, que então sofrem inativação, atenuação ou fragmentação para gerar suas frações imunogênicas. Podem ser compostas por vírus replicados em ovos embrionados ou culturas de células; ou ainda por antígenos fabricados por processos biotecnológicos.

² Só no Brasil, as doenças preveníveis por vacinação foram eliminadas ou mantidas sob controle nos últimos 30 anos, conforme apontado no livro do Programa Nacional de Imunizações (Brasil, 2003e).

Os biofármacos são compostos pelas proteínas recombinantes terapêuticas, obtidas através da expressão de um gene de interesse em células transfectadas, e podem incluir citocinas, fatores de crescimento hematopoético e outros fatores de crescimento, hormônios, fatores sanguíneos, enzimas e anticorpos (Mellado e Castilho, 2008). Estas moléculas são obtidas através de técnicas de engenharia genética (ou tecnologia do DNA recombinante) a fim de expressar os polipeptídeos em sistemas celulares como bactérias, leveduras, células de mamíferos e de insetos (OMS, 1991).

1.1.6 Aplicações adicionais

Há muitas outras aplicações médicas dos conhecimentos envolvendo culturas de células e tecidos. Os exemplos incluem a investigação por anomalias genéticas em fetos, transplante de pele, medula e engenharia de tecidos; o projeto genoma, fertilização *in vitro*, bem como os ensaios toxicológicos e laboratoriais. Há ainda a pesquisa para o possível uso em terapia gênica e clonagem de animais (Freshney 2003, 2010).

Células cultivadas *in vitro* são usadas há muito tempo em toxicologia. O Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) é parte integrante da Comissão Européia e está envolvido no desenvolvimento e avaliação de testes que possam substituir, ou ao menos reduzir, o uso de animais de laboratório em pesquisas. Neste sentido, o Centro convoca seus países-membros a adotarem metodologias para avaliação de toxicidade que sejam confiáveis, como os ensaios em culturas de células adequadas para avaliar produtos biomédicos. De fato, os estudos toxicológicos podem ser realizados para fármacos, cosméticos, aditivos alimentares, pesticidas e produtos químicos industriais. Se não é possível eliminar o uso de cobaias nestes estudos, os testes *in vitro* podem ao menos ajudar no delineamento de experimentos *in vivo* mais racionais e direcionados (Léo *et al.*, 2008).

Outra aplicação está na realização de bioensaios. Os métodos físico-químicos são capazes de avaliar a estrutura de uma molécula protéica e a presença de impurezas (como produtos de degradação e agregados), mas os bioensaios são procedimentos analíticos funcionais que objetivam medir a atividade ou potência de um produto biológico. Este método *in vitro* ajuda a substituir o uso de animais de laboratório para a avaliação da potência de um determinado medicamento, como nos testes de controle de qualidade visando à liberação de lote. A determinação da atividade de um produto, a exemplo das citocinas, pode ser verificada

em função de uma resposta celular ou tecidual, como o estímulo ou inibição da proliferação, expressão de marcadores celulares ou enzimas, atividade antiviral ou toxidez.

Os bioensaios podem, como discutido, ser úteis para avaliar a consistência de um processo, pela atividade lote-a-lote do biofármaco; e para avaliar apenas moléculas funcionais, uma vez que proteínas desnaturadas não apresentam atividade biológica, mas seriam quantificadas por métodos físico-químicos que medem proteínas totais, como espectrofotometria no ultravioleta, *Lowry*, *Bradford* ou *Kjeldahl* (Etcheverrigaray e Kratje, 2008). Além dos exemplos acima, cultivos celulares podem ser usados em estudos de imunologia, especialmente em função dos anticorpos monoclonais (Freshney, 2010), mas também em farmacologia, genômica, proteômica e metabolômica (Coecke *et al.*, 2005). Fica visível, no entanto, que embora as células usadas para tais fins precisem ser autenticadas, a fim de gerar respostas confiáveis, elas não precisam passar por etapas exaustivas de caracterização, como é requerido para células de grau clínico destinadas ao uso na produção industrial de medicamentos, os quais serão administrados por via parenteral.

1.2 Bancos de células

Os conceitos adotados pela OMS e ICH estão quase integralmente harmonizados, e onde não há total equivalência entre os textos, há complementação das informações. Uma linhagem celular é apresentada como um tipo de população de células originada pelo subcultivo serial de uma população celular primária, e que pode ser usada para estabelecer um banco, com conteúdo uniforme e estocado em um contêiner apropriado, sob condições definidas de armazenamento - criopreservação, geralmente em nitrogênio líquido, mas também possível em frízeres ultrafrios.

Os diferentes cultivos podem ser criopreservados por tempo indefinido, a fim de não permanecerem se multiplicando *in vitro* quando desnecessário, o que poderia levar a alterações em sua viabilidade e aspectos funcionais devido à manutenção prolongada (subcultivos) em laboratório. Para lidar com isso, geralmente se armazenam linhagens pelo sistema de banco de células, como um estoque semente do material biológico (Léo *et al.*, 2008). Um sistema de bancos preservados, uniformes e caracterizados, fornece ao produtor um suprimento constante e homogêneo de células para a produção de medicamentos biológicos e biotecnológicos de forma consistente e contínua (ICH 1997, FDA 2010).

Células parentais são aquelas manipuladas para dar origem a um substrato celular, como CHO não transfectada e mieloma com linfócito B, que então são processados para gerar células CHO modificada geneticamente (contendo gene para produção de determinada proteína recombinante) e hibridomas, respectivamente. Estas células (ou clone selecionado delas) resultantes são consideradas uma semente celular, isto é, uma quantidade de células bem caracterizadas (animais ou de outra origem) obtidas a partir de um único tecido, célula ou clone selecionado, estocada sob condições definidas em alíquotas uniformes. Tal semente é subcultivada até alcançar densidade grande o suficiente para dar origem a frascos uniformes de um banco de células mestre ou BCM (ICH 1997, OMS 1998, 2010).

Ampolas de BCM são subcultivadas serialmente e expandidas, sob condições controladas de assepsia e com meio especificado, para formar ampolas do banco de células de trabalho (BCT), o qual então pode: (a) ser inoculado diretamente nos biorreatores para produção ou (b) dar origem a células (ou culturas) de produção, a serem adicionadas aos biorreatores. O BCT deve ser subcultivado até um limite máximo definido e finito de passagens na produção de biológicos - mesmo que composto por uma linhagem imortalizada. Quando suas ampolas se esgotam, o BCM é recomposto a partir de um clone inicial, de células do BCM ou mesmo do BCT, e deve passar pela mesma bateria de testes indicada à sua qualificação inicial, a menos que uma justificativa para proceder de forma diferente seja aprovada.

Os bancos mestre e de trabalho devem ser tratados da mesma forma durante a armazenagem e, uma vez que os recipientes sejam retirados do depósito, devem ser descartados. Dadas as particularidades quanto aos objetivos e usos práticos entre BCM, BCT e culturas de produção (se aplicável), pode haver diferenças com relação aos componentes dos meios de cultivo e das próprias condições de cultura para cada tipo de cultura (ICH, 1997). É altamente recomendável que frascos contendo bancos celulares sejam mantidos estocados em locais distintos, separados inclusive geograficamente, a fim de garantir a continuidade dos estoques caso haja acidente em algum dos sítios de operação (Etcheverrigaray e Kratje, 2008). Tais fatalidades podem decorrer de incêndios, erro humano durante a manipulação e quedas de energia – logo, o uso de geradores de energia e sistemas de enchimento automático para o nitrogênio líquido também é desejável (ICH, 1997).

Os bancos de células não podem ser interpretados literalmente como insumos em uma cadeia produtiva conforme discutido na seção sobre Boas Práticas de Fabricação; são mais

bem classificados como material biológico de partida ou uma plataforma tecnológica, dado que fornecem o substrato celular para produção de medicamentos biológicos.

Com relação aos aspectos regulatórios do estabelecimento de bancos, os fabricantes devem fornecer informações detalhadas sobre o tipo de sistema usado para gerar o banco, o tamanho deste, recipientes e sistemas de fechamento utilizados, material de identificação, rastreabilidade das ampolas estocadas, bem como os procedimentos, meio e agentes usados para a criopreservação.

Além do exposto, os requerimentos das Boas Práticas de Fabricação devem ser aplicados ao se estabelecer bancos de células, a fim de garantir a qualidade e reprodutibilidade dos resultados. Isso inclui evitar a contaminação cruzada, ao se impedir a manipulação de outros tipos celulares no mesmo local ou tempo; e também a contaminação por agentes adventícios possivelmente introduzidos com o uso de reagentes contaminados, por falhas na técnica asséptica, ou ainda pela manipulação por operadores doentes, que estiveram em contato recente com biotérios, com outros tipos celulares ou com microorganismos patogênicos (OMS 1998, 2010). Os princípios da técnica asséptica e das boas técnicas em microbiologia devem ser seguidos, conforme apontado na parte IV do guia de biossegurança da OMS (2004b).

1.2.1 Coleções de referência mundial

Linhagens autenticadas podem ser obtidas de bancos internacionais (Hay *et al.*, 2003), que são referência no nível global, e cujos produtos e serviços são frequentemente solicitados por cientistas – pesquisadores e produtores – de todos os países. Segue abaixo uma breve apresentação deles, com dados disponíveis em seus respectivos endereços eletrônicos; e na sequência uma descrição das células de interesse particular para Bio-Manguinhos.

A Coleção Americana de Culturas (*American Type Culture Collection* ou ATCC) possui creditações ISO 9001:2008 (relativa ao sistema de gerenciamento da qualidade), 17008:2005 (calibração e ensaios de controle de qualidade) e como produtor de material de referência. De interesse específico desta dissertação, a ATCC realiza os seguintes testes em culturas de células: identificação por viabilidade, morfologia e pureza; esterilidade e pureza relativas a micoplasma e outras contaminações; genotipagem pela reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* ou PCR); fenotipagem por isoenzimas e citometria de

fluxo. Outros serviços importantes são o armazenamento e comercialização dos vários tipos celulares disponíveis em seu catálogo.

O Depósito de Células de Coriell (*Coriell Cell Repositories*) está localizado em Camden, Nova Jersey (EUA), dentro do *Coriell Institute for Medical Research* (Instituto Coriell para Pesquisa Médica). Segundo informações disponibilizadas *on-line*, o Instituto fornece reagentes, DNA e culturas celulares relacionadas a diversas doenças. Os serviços oferecidos incluem cultivos, criopreservação, estabelecimento de linhagens e bancos, testes de micoplasma, citogenética e genotipagem.

A Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas Celulares (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* ou DSMZ) comercializa linhagens humanas, animais e de plantas, e ainda microorganismos e vírus vegetais. Possui culturas de CHO-K1, CHO-dhfr [-] e o clone Vero-B4, mas não possui MRC-5. Os serviços contam com assuntos de patente e depósito, bem como testes de identificação, mas apenas para procaríotos.

A Coleção Européia de Culturas de Células Animais (*European Collection of Animal Cell Cultures* ou ECACC) está localizada no Reino Unido e disponibiliza várias culturas, inclusive primárias. Os serviços incluem criopreservação (armazenamento), testes de micoplasma e esterilidade. A autenticação de culturas é realizada por análise de isoenzimas e DNA *profiling*.

O Japão possui três centros. O Banco de Recursos para Pesquisa Científica em Saúde (*Health Science Research Resources Bank* ou HSRRB) distribui as linhagens do *Japanese Cell Bank for Cancer Research* (Banco Japonês de Células para Pesquisa em Câncer), armazena linhagens celulares, tecidos humanos, clones de genes, embriões e espermatozóide animal e DNA de origem japonesa, disponíveis à indústria, Academia e ao governo. A coleção inclui Vero estabelecida no país e CHO-K1; os testes de controle de qualidade englobam viabilidade, contaminação microbiológica, isoenzimas, *Nested PCR*, DNA *profiling*, análise de cromossomos e vírus em células humanas.

A segunda instituição, Coleção Japonesa de Bio-recursos para Pesquisa (*Japanese Collection of Research Bioresources* ou JCRB), está vinculada ao Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar. Possui linhagens colecionadas e qualificadas, que são distribuídas através do HSRRB. Seu catálogo está disponível *on-line*.

O último centro japonês, Banco de Células do Centro de Bio-recursos de Riken (*Riken Bioresources Center Cell Bank*) está localizado na cidade de Tsukuba. Seu sistema de gerenciamento da qualidade possui certificação ISO 9001:2000 para a coleção, preservação e

distribuição de recursos biológicos. É realizada validação das linhagens por testes de micoplasma e análise de polimorfismos em células humanas.

Foram identificados, de forma complementar, outros três bancos de células no exterior. O Banco de Células da Austrália (*Cell Bank Australia*) possui linhagens desenvolvidas por cientistas australianos e neozelandeses, bem como algumas depositadas pela ECACC. Os serviços prestados incluem detecção de micoplasma por kit, PCR e coloração; e identidade por *STR profiling*.

A Coreia conta com o Banco de Linhagens Celulares da Coreia (*Korean Cell Line Bank* ou KCLB), o qual estabelece, caracteriza, mantém e distribui linhagens, conforme disposto em seu endereço eletrônico. Por fim, o Banco Nacional de Células do Iran (*National Cell Bank of Iran* ou NCBI) é uma organização sem fins lucrativos que fornece células e presta serviços aos pesquisadores desse país. De acordo com as informações em seu *site*, são realizados testes de controle de qualidade para contaminação microbiológica (incluindo micoplasma) e diversos métodos de autenticação, incluindo análise citogenética e tipificação de DNA por STR em células humanas, e isoenzimologia para verificação da espécie.

Adicionalmente, a Organização Mundial da Saúde ou OMS (*World Health Organization* ou WHO) possui bancos de células de referência, que são estoques criopreservados gerados a partir de um *pool* único e homogêneo de células, preparados sob condições definidas, e que foram submetidos a testes de caracterização. Um importante exemplo é o banco WHO Vero RCB 10-87, estabelecido em 1987, que pode ser fornecido sem taxas para produtores de biológicos. Há diversas vantagens em sua utilização, como a ausência de conflitos de propriedade intelectual, o longo histórico publicado e revisado sobre sua segurança e sua qualificação para a produção de vacinas. Além disso, a Organização também examinou o estabelecimento, em 2007, do banco de referência WHO MRC-5 RCB, destinado ao preparo de vacinas, obtido sob condições BPF e sujeito a controle de qualidade.

No entanto, as culturas da OMS devem ser usadas como sementes celulares, a partir das quais os produtores podem desenvolver seus BCMs. O comprador não fica isento de certificar extensivamente seu banco mestre, apenas este terá grande chance de corresponder às especificações definidas (OMS, 2010).

1.2.2 Células Vero

Esta foi a linhagem contínua mais usada para a produção de vacinas ao longo dos últimos vinte anos (OMS, 2010). Foi derivada de células epiteliais por transformação espontânea, após passagens seriais *in vitro*, de células normais extraídas dos rins de um macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) saudável. Ela foi isolada em 1962 (Augusto e Oliveira, 2001) e é considerada como nível 1 com relação à biossegurança.

Apesar das alterações metabólicas e funcionais que sofreu, células Vero ainda mantêm determinadas características de seu tecido originário. Mesmo assim, elas podem ser infectadas e replicar outros vírus que não aqueles com tropismo para o tecido renal, a exemplo dos vírus neurotróficos como poliomielite e raiva – logo constituem excelente plataforma tecnológica para produção das respectivas vacinas (Carvalho Mello *et al.*, 2008). Houve utilização extensiva também para ensaios com diversos vírus, dentre os quais o SV-40, rubéola, reovírus, e adenovírus, e ainda arbovírus (Doyle e Griffiths, 1999). Os usos ainda podem incluir a avaliação da citotoxicidade de biomateriais, detecção de toxinas, testes de eficácia, testes de meios e micoplasma, uso como substrato e como hospedeiro para transfecção (Alves *et al.*, 2008).

Estas células crescem com relativa rapidez e têm alto rendimento em termos de densidade celular, razão pela qual são muito usadas para a produção de vacinas atenuadas e inativadas (OMS, 1998), como aquelas contra a poliomielite inativada (“Salk”), raiva, influenza e varíola, produzidas hoje nesta plataforma tecnológica, e outras ainda estão em investigação, como uma vacina contra encefalite japonesa (Montagnon *et al.* 1999, Tauber *et al.* 2007).

O uso de células em vez de ovos embrionados como plataforma para a produção de vacinas apresenta importantes vantagens. A rapidez na produção é importante, pois poderia atender à urgência em uma possível pandemia. Além disto, são mantidas as propriedades antigênicas dos vírus; as endotoxinas são eliminadas; e há maior segurança pela ausência de antibióticos e proteínas do ovo, tal qual a ovalbumina (Kistner *et al.* 1999, 2007), responsável por reações adversas em indivíduos alérgicos.

Um BCM foi doado à OMS por um fabricante na passagem nº 134, e a cultura não exhibe perfil tumorigênico até a passagem 150. Estudos em dez laboratórios comprovaram que a cultura atendia aos requerimentos de esterilidade, agentes adventícios, tumorigenicidade, presença de transcriptase reversa e identidade. Atualmente o banco é estocado na ECACC

(Inglaterra) e ATCC (EUA), e, como mencionado na seção anterior, as ampolas são fornecidas gratuitamente a autoridades e produtores de biológicos para serem usadas, por exemplo, na produção de biológicos (OMS, 1998).

Mais tarde, a OMS publicou um adendo com mudanças significativas quanto às expectativas regulatórias e aos avanços científicos, reavaliando que seu banco não deveria mais ser considerado mestre, mas sim uma semente celular (OMS, 2005). Desta forma, os interessados devem adquirir ampolas para estabelecer seus próprios BCMs, realizar extensiva requalificação, contemplando ainda ensaios para transcriptase reversa (PERT) e quaisquer atualizações na pesquisa por agentes adventícios e testes de segurança. Adicionalmente, essa mudança na genealogia do banco de células Vero pode levar a investigações quanto ao número de passagens máximas (sua idade *in vitro*) permitida para o uso industrial, o que deve ser cuidadosamente estudado para cada processo a fim de caracterizar seu potencial tumorigênico.

1.2.3 Células CHO

Estas são células derivadas de ovário de *hamster* chinês (*Cricetulus griseus*) adulto, e por serem um sistema mamífero, possuem a capacidade de realizar modificações pós-traducionais (como a glicosilação) de proteínas, de forma semelhante ao padrão humano (OMS, 1998). Logo, são muito utilizadas para transfecção, expressão e produção em larga escala de glicoproteínas recombinantes de interesse terapêutico.

As células primárias de *C. griseus* são diplóides (22 cromossomos), e tal cariótipo serve como base para a nomenclatura, baseada em bandeamento, de todas as linhagens derivadas de CHO. A linhagem parental CHO-K1 foi isolada em 1957 por Puck e sua equipe (Léo *et al.*, 2008); tem cariótipo diplóide (Freshney, 2010) com 21 cromossomos, dos quais 9 são denominados “grupo Z” e apresentam deleções, inversões pericêntricas e translocações (Martinet *et al.*, 2007). São epiteliais, crescem aderidas a um substrato se houver suporte disponível, mas também são cultiváveis em suspensão (Augusto e Oliveira, 2001). Quando adaptadas para crescimento independente de ancoragem, elas perdem sua morfologia fibroblastóide e se tornam esféricas (Léo *et al.*, 2008).

A linhagem CHO é considerada segura, pois muitos dos principais vírus patológicos para humanos não conseguem se replicar nela, como o da pólio (Mellado e Castilho, 2008). Conseqüentemente, são classificadas como nível 1 de biossegurança, sendo suscetíveis a vírus

como Getah, estomatite vesicular (Indiana), e resistentes aos vírus *modoc* e “*Botton-Willow*”. Esta linhagem produz partículas virais defectivas, logo seus virions não são infectivos (FDA 2010, OMS 2010).

Com relação ao uso em biotecnologia, convém notar que alguns biofármacos apresentam estrutura simples, como a insulina humana recombinante, e são classicamente sintetizados em sistemas de expressão como células procarióticas da bactéria *E. coli*. Tais sistemas oferecem facilidade para a manipulação genética e o cultivo, e são satisfatórios quando não se requer um maquinário intracelular mais refinado (Butler, 2005).

No entanto, biofármacos mais complexos são moléculas protéicas que passam por diversas modificações pós-traducionais, em sua maioria caracterizadas pela adição de cadeias de açúcares (*N*-glicosilação e *O*-glicosilação), mas também por outras reações como glicação e hidroxilação. As glicosilações têm impacto direto na solubilidade (perfil farmacocinético), imunogenicidade, estabilidade estrutural e atividade biológica da proteína terapêutica, e ocorrem em organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi de células eucarióticas - incluindo fungos filamentosos, leveduras, células de plantas e de insetos. As células hospedeiras preferidas são as de mamíferos CHO e BHK (*baby hamster kidney* - derivada de rim de *hamster* neonato), em função de seu repertório enzimático (Butler 2005, 2008).

Dadas estas características, a linhagem CHO-K1 é muito utilizada em engenharia genética na obtenção de biofármacos como: alteplase, fator IX de coagulação recombinante, eritropoetina, interferon β , trastuzumabe, alemtuzumabe, bevacizumabe, omalizumabe, α -glucosidase ácida, laronidase, coriogonadotrofina α , agalsidase β , folitropina α e etanercepte (Augusto e Oliveira 2001, Walsh 2010).

Há ainda inúmeras outras linhagens derivadas de CHO disponíveis nos bancos de células. A linhagem CHO-DG44 foi gerada por mutagênese química e radiação gama. Com a deleção de ambos os alelos para o gene *dhfr*, estas células são apropriadas para a seleção de clones transfectados com uma sequência que contenha tal gene exógeno, e que, portanto, sobrevivam em um meio seletivo. A mesma sequência que contém o gene para sobrevivência das células pode codificar uma proteína de interesse (Martinet *et al*, 2007). As linhagens CHO-K1 e outra com genótipo DHFR-, tal qual o clone CHO.DUKX-B11, têm aplicação na expressão transiente e estável de proteínas recombinantes (Bollati-Fogolín e Comini, 2008).

1.2.4 Células MRC-5

Esta linhagem é derivada de fibroblastos humanos secundários (tecido normal) que sofreram entre 60 e 70 passagens antes de alcançar o estágio da senescência. Foi derivada de um tecido pulmonar saudável de um feto do sexo masculino de 14 semanas de gestação pelo pesquisador Jacobs (1970) em setembro de 1966. Tecidos embrionários ou fetais geralmente originam culturas mais fáceis de iniciar, que sobrevivem e proliferam melhor que as derivadas de tecidos adultos, em função de sua menor especialização e maior potencial proliferativo. Os fibroblastos de MRC-5 são derivados do mesoderma, que são mais fáceis de cultivar do que células epiteliais, neurais e endócrinas, e respondem a mitógenos presentes no plasma (Freshney, 2003).

Observações revelaram que células MRC-5 são capazes de sobreviver por 42-46 duplicações populacionais antes de reduzir sua taxa de multiplicação, conforme se observa com fibroblastos humanos. São células não-tumorigênicas, de vida finita, aderentes e susceptíveis à inibição por contato (Augusto e Oliveira 2001, Freshney 2010), e classificadas como nível 1 de biossegurança.

Células MRC-5 são as mais usadas entre as diplóides. Elas são suscetíveis à infecção por uma ampla variedade de vírus, tais como poliovírus-1, herpes simplex, estomatite vesicular, raiva, rubéola, varicela (catapora) e caxumba (Doyle e Griffiths, 1999). Desta forma, são muito usadas no estudo *in vitro* destes agentes (p.ex.: estudos de transfecção), bem como no desenvolvimento e produção de vacinas virais para uso humano (Augusto e Oliveira, 2001). É usada atualmente para fabricar as vacinas contra rubéola, varicela e poliomielite atenuada (*Sabin*). Podem ainda ser usadas em testes de eficácia, ensaios de toxicidade e estudos sobre o envelhecimento celular.

Uma desvantagem ao seu uso seria a alternativa muito viável de usar células CHO, Vero, MDCK, MDBK ou até HeLa para a produção de vacinas virais. Estas linhagens, apesar de transformadas, apresentam estabilidade genética por toda sua longa propagação *in vitro*. Atualmente, se desejável, é possível obter MRC-5 imortalizada pela transfecção com SV-40 (Carvalho Mello *et al.*, 2008).

1.3 Caracterização de bancos celulares

Os substratos celulares são as células usadas como plataforma tecnológica, visando à produção de biológicos como biofármacos e imunobiológicos (exemplo das vacinas) para uso humano (ICH 1999, FDA 2010, OMS 2010). É sabido que um aspecto crítico na avaliação destes substratos é sua relação custo/benefício para o uso industrial. Porém, como as autoridades públicas de saúde esperam usar produtos com o menor risco associado possível, tem havido pressão para fabricantes e reguladores aprimorarem as características de qualidade, segurança e eficácia destes produtos (OMS, 2009).

No âmbito nacional, tanto a Lei 6360/76 quanto a RDC 55/2010 indicam a necessidade de que os produtos passem por comprovação científica e análise, a fim serem reconhecidos como seguros e eficazes para o uso proposto, e que sejam demonstradas sua identidade, atividade, qualidade, pureza e inocuidade (Brasil 1976, 2010c).

A FDA (2010) define caracterização como a determinação das propriedades de um substrato ou de um banco celular. Já a qualificação seria a determinação da adequabilidade de um substrato celular para o uso na produção, baseado em sua caracterização. Freshney (2010) não cita aspectos de estabilidade, mas considera que a validação de uma linhagem seja a determinação da autenticidade, procedência e ausência de contaminação. Para a presente dissertação, é adotada a definição de caracterização da Agência Americana, como sinônimo de certificação, que condiz com o texto da OMS (2010) e se subdivide em três aspectos a serem avaliados nos substratos candidatos ao uso na fabricação de biológicos:

- identidade ou autenticidade, que incluem a determinação da natureza e origem de uma cultura, bem como todo seu histórico e procedência;
- segurança ou pureza, que investigam a presença de contaminantes de diversos tipos e os potenciais tumorigênico e oncogênico;
- estabilidade, que avalia a manutenção das características de uma dada célula ao longo de seu uso.

1.3.1 Tipos de testes utilizados para a caracterização de bancos de células

A certificação dos bancos deve considerar aspectos como identidade, contaminação e estabilidade. O BCM deve ser exaustivamente testado quanto às características de identidade e pureza; e a estabilidade das características ao longo do trabalho, uma vez para cada produto

a ser registrado. Apenas este banco deve passar pela bateria de testes se houver justificativa, por exemplo, quando ele for diretamente usado para a produção, como é o caso de alguns produtos com poucos lotes fabricados ao longo do ano, ou cujo BCM conta com poucas ampolas restantes. O BCT deve ser testado com relação aos contaminantes adventícios, a fim de identificar se estes foram introduzidos ao longo da cultura ou da manipulação (ICH 1997, Rodrigues e Moro 2008, OMS 2009).

1.3.1.1 Identidade da cultura

A contaminação cruzada entre linhagens celulares ocorre em altas taxas nos laboratórios e não pode ser ignorada. Os cientistas devem autenticar suas linhagens e os editores de revistas e demais publicações³ devem requerer a autenticação de linhagens antes da vinculação de artigos científicos (Freshney, 2003). A certificação e autenticação garantem que uma determinada linhagem seja confiável em termos de perfil de DNA e da espécie original livre de contaminações (Léo *et al.*, 2008), e isto garante segurança adicional em laboratórios que manipulam diversas linhagens (FDA, 2010).

A identificação inclui testes como cariotipagem, a análise do perfil de isoenzimas, características de crescimento, morfologia celular e marcadores genéticos, como DNA *fingerprinting* (Rodrigues e Moro, 2008). Os testes são abordados na seção 4.3.1.

1.3.1.2 Segurança relativa a contaminantes e resíduos

Deve ser considerada a possível contaminação por agentes infecciosos, dentre os quais estão os vírus endógenos e outros microorganismos contaminantes introduzidos inadvertidamente ao sistema, tais como bactérias, fungos, micoplasma e vírus exógenos. Todos os reagentes utilizados – incluindo soro e tripsina, a qual pode ser derivada de bois ou porcos - devem ser aprovados e livres de contaminantes microbianos e da espécie animal de origem. O ideal é que se testem estes e outros parâmetros, como efeito citopático e hemadsorção, tanto nos bancos celulares quanto no material obtido ao final do processo (sobrenadante, células ou o lisado destas) a fim de investigar a introdução de contaminantes

³ Tal exigência já é realidade para alguns editoriais como a revistas *Nature*, *Science* e *Cancer Research*, conforme disposto em seus *websites*.

durante a produção, bem como a expressão de vírus latentes (OMS, 1998). A presença de contaminantes deve ser pesquisada nos bancos mestre e de trabalho, e, neste sentido, deve-se pesar o impacto do uso de agentes seletivos e antibióticos devido à sua capacidade de mascarar a contaminação por organismos como bactérias e fungos (ICH, 1997).

Também há questões relacionadas às propriedades das células usadas como plataformas produtivas, como a presença de DNA e proteínas indutoras da proliferação de células imortalizadas, quanto ao seu potencial tumorigênico e oncogênico. Em especial após o advento da tecnologia do DNA recombinante, as sequências de nucleotídeos introduzidas na linhagem hospedeira também devem ser avaliadas (OMS, 1998), visto que os vetores de clonagem podem ser construídos com promotores e sequências virais.

A tumorigenicidade e oncogenicidade são classificadas por alguns autores (Rodrigues e Moro, 2008) como atributos de identidade da célula. No presente trabalho, contudo, estas características serão abordadas dentro do estudo sobre a segurança (ou pureza) das linhagens, para que possam ser incluídas na discussão sobre redução de impurezas, junto com os contaminantes adventícios.

Há preocupações ainda quanto à presença de substâncias sensibilizantes ao ser humano. Estas incluem proteínas como as derivadas de materiais animais (p.ex.: do soro fetal bovino), ou proteínas da célula hospedeira, que em geral possuem capacidade imunogênica; ou ainda os resíduos de antibióticos, como penicilina ou outros agentes β -lactâmicos (Etcheverrigaray e Kratje, 2008). Os testes relacionados à segurança de substratos celulares são expostos e discutidos na seção 4.3.2.

1.3.1.3 Estabilidade das características celulares

Os testes de estabilidade visam, basicamente, avaliar a manutenção das características de identidade de uma cultura celular durante sua estocagem e após uma campanha de fabricação.

Pode ocorrer redução gradual no número de cópias de um gene transfectado junto com um sistema de amplificação como DHFR ou GS, no decorrer de uma longa cultura, pois a remoção do agente de seleção reduz a pressão adaptativa exercida. Adicionalmente, um gene de interesse pode ser silenciado ao longo da cultura em função de seu local de integração no genoma hospedeiro, bem como devido ao relaxamento da heterocromatina (Butler, 2005).

Bancos mestres ou de trabalho de células diplóides e contínuas devem ser qualificados quando são descongelados, pela avaliação da viabilidade, fenótipo, sistema de expressão recombinante, características de crescimento e outro eventual atributo importante. Além disso, a estabilidade genética deve ser conferida no BCT e em células ao fim da produção, visando monitorar a expressão protéica e sua produtividade específica (OMS, 2010). Quando o processo pressupõe a lise celular, como na produção de vacinas virais em Vero e MRC-5, a alternativa é usar células-controle. Estas são células derivadas do banco (mestre ou de trabalho), separadas da produção e cultivadas em paralelo sob as mesmas condições (exposição a meios, reagentes), porém sem sofrerem a infecção pelo vírus. São usadas, assim, para simular o *status* de células que sofrem rompimento, bem como células de culturas primárias, ao fim de uma jornada de produção (FDA, 2010). A avaliação de estabilidade está descrita na seção 4.3.3.

1.4 Regulamentação internacional e nacional

Diversos documentos internacionais discorrem sobre os aspectos da certificação de bancos celulares, com o propósito da aplicação em biotecnologia na área de saúde humana, incluindo temas de qualidade, caracterização, segurança e questões regulatórias.

As discussões e pesquisas do presente trabalho inicialmente abordam as publicações da Organização Mundial da Saúde, que é a autoridade das Nações Unidas responsável pela direção e coordenação das ações e políticas em saúde no nível global. Seus documentos são mais globais, baseados no conhecimento científico disponível e na comunicação entre reguladores e indústria (OMS, 2009). O objetivo é assegurar procedimentos na produção e no controle para gerar medicamentos biológicos seguros e eficazes. Tais procedimentos podem ser descritos em guias, que são documentos gerais sobre certas questões de interesse, ou recomendações, que estabelecem especificações técnicas para determinados produtos. Todas estas orientações são acompanhadas da instrução para que os países, através de suas agências reguladoras e seus laboratórios de controle nacionais, adotem estes critérios como requisitos mínimos, preferencialmente na forma de monografias em suas farmacopéias ou como legislação, e implementem maiores requerimentos de acordo com suas necessidades, particularidades e experiências.

Dada a especificidade do tema, há ainda outros documentos produzidos pela Organização de grande interesse nesta dissertação, publicados no formato de uma série de

relatórios técnicos (*Technical Report Series* ou TRS) e de relatórios de reunião (OMS 1998, 2003, 2005, 2007, 2009). O documento intitulado TRS 878 (OMS, 1998) é o mais importante para este tema, e, até o fechamento do atual trabalho, uma revisão para ele estava em fase de consulta pública para atualização do seu aconselhamento científico (OMS, 2010).

Em seguida são analisados os guias organizados em tópicos do ICH, o qual reúne representantes das agências e indústria farmacêutica dos Estados Unidos da América, Europa e Japão, em discussões técnico-científicas visando harmonizar a interpretação e as exigências para o registro de produtos medicinais, dentre os quais estão inseridos os biológicos.

Os guias da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) são revisados na sequência. Eles apresentam maior detalhamento em assuntos como identificação e segurança viral dos bancos celulares a serem usados como plataformas tecnológicas. Alguns de seus guias estão integralmente harmonizados com o ICH, contendo os mesmos títulos e textos, mas ainda assim cada um dos países-membro europeus tem a liberdade de realizar adequações em função de sua própria legislação sanitária.

Seguindo a análise, os documentos do FDA são utilizados como fonte de informação quanto aos requerimentos mais detalhados para o estabelecimento de bancos de células com fins industriais. Os textos iniciais foram disponibilizados na forma de “pontos a considerar” (ou PTC, da sigla em inglês para *Points to Consider*), dentre os quais o primeiro relevante a esta dissertação foi um PTC sobre a caracterização de linhagens celulares usadas na produção de biológicos em geral, sejam vacinas, biofármacos ou outros (FDA, 1993). O texto não era definido como um guia ou regulação, mas apenas a representação do consenso da Agência Americana naquele momento. Mais tarde foi lançado um rascunho (“*draft version*”), e em fevereiro de 2010 foi publicada a versão final do novo guia, atualizando especificamente a caracterização dos substratos celulares e outros materiais biológicos (FDA, 2010) usados na fabricação de vacinas virais contra doenças infecciosas. Este documento apresenta o pensamento atual da Autoridade Sanitária Americana na forma de recomendações, mas abre espaço para o debate sobre diferentes abordagens, desde que haja justificativa científica e validação para tal.

É importante ressaltar que a Organização Mundial da Saúde é a autoridade de reconhecimento internacional, e as demais representações (ICH, EMA, FDA ou outra agência) são autoridades estrangeiras e regionais. Assim, havendo impasse entre o disposto por elas, o Brasil deve adotar a orientação da OMS – fato verificado acerca da aplicabilidade das BPF na geração de bancos celulares (discutido na seção 4.4).

A legislação brasileira apresenta diversas lacunas quanto à regulamentação para assuntos tão detalhados como a certificação de substratos celulares, com relação ao conteúdo das Resoluções da Diretoria Colegiada (RDCs) da Anvisa. São identificados poucos fabricantes nacionais na área de imunobiológicos como vacinas, dentre os quais se destacam o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos, dentro da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ) e o Instituto Butantan (IB), em São Paulo. Há ainda fabricação nacional de soros hiperimunes (também classificados como imunobiológicos) pelo IB, Fundação Ezequiel Dias (Funed, em Belo Horizonte), Instituto Vital Brasil (Rio de Janeiro) e Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, no Estado do Paraná (Bretas, 2009).

1.4.1 Registro de medicamentos biológicos no Brasil

A análise técnico-científica para o registro de biológicos é realizada pela Coordenação de Produtos Biológicos e Hemoterápicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), vinculada ao Ministério da Saúde (MS). A regulamentação dos produtos biológicos no Brasil foi inicialmente contemplada pela RDC 80 de 2003, a qual foi seguida pela RDC 315 (Brasil, 2005c).

Estas normas sempre adotaram como escopo os exemplos de biológicos citados no item 1.1.5, além de evidenciar a maior variabilidade no que concerne aos materiais de partida, processos fabris e métodos analíticos para essa classe de medicamento.

A RDC 315 vigorou até o segundo semestre de 2010 e trouxe novidades como a possibilidade de se produzir um princípio ativo em fábricas diferentes (desde que integrantes de um mesmo grupo farmacêutico ou dentro de uma transferência de tecnologia). O documento era focado no produto, seja na forma de princípio ativo, granel, em sua embalagem primária ou medicamento terminado, englobando quesitos de sua caracterização, produção, controle de qualidade, estabilidade, eficácia e segurança. Foram delineados parâmetros como a necessidade de que os fabricantes, inclusive do princípio ativo, possuíssem Certificado de Boas Práticas de Fabricação (CBPF), que é o documento legal, emitido pela Autoridade Sanitária competente do país de fabricação, atestando que determinada linha de produção de uma empresa cumpre com os requisitos de Boas Práticas de Fabricação (BPF) estabelecidos pela legislação vigente. No caso de produtos biológicos terminados, o CBPF se refere à linha de produção do produto biológico (princípio ativo, produto biológico a granel e produto biológico terminado). Para fins de conceituação, esta

norma considerava que “fabricação” são todas as operações que incluem a aquisição de materiais, todas as etapas de produção, controle de qualidade, liberação, estocagem, expedição e os controles relacionados.

Fica visível que esta RDC, apesar de se referir ao registro de biofármacos e vacinas, nada estabelecia com respeito aos bancos celulares utilizados como plataforma tecnológica de produção. Tampouco a norma válida nesta época para a inspeção de indústrias de medicamentos, RDC 210 (Brasil, 2003b), continha especificações para esses bancos. Quanto à inspeção sanitária, esta Resolução e o guia da OMS (1992) apenas definem que os bancos celulares, bem como os lotes semente, devem ser armazenados separados de outros materiais, e o acesso a eles deve ser restrito a pessoal autorizado.

Em 2010, a RDC para registro de biológicos entrou em consulta pública, e em 17/12/10 foi publicada a nova Resolução, RDC 55 (Brasil, 2010c). Foram mantidos quase todos os requisitos anteriores e a abrangência dos medicamentos, porém neste momento foram introduzidas inovações e possibilidades para o registro de biológicos no Brasil, dentre as quais se destacam:

- possibilidade de registro de produtos biológicos não-novos pela via da comparabilidade, inclusive com extrapolação das indicações terapêuticas, desde que cumpridas as exigências delineadas;
- previsão do registro de vacinas terapêuticas, além das classicamente conhecidas e usadas de forma profilática.

De especial interesse ao presente trabalho, a RDC 55/2010 adotou as orientações internacionais atualizadas e introduziu a necessidade de caracterização dos bancos celulares utilizados na fabricação de vacinas e biofármacos. O capítulo III/seção IV solicita os seguintes detalhamentos sobre a documentação de produção e controle de vacinas:

- ✓ descrição dos lotes de vírus e da linhagem celular, incluindo identificação, origem, caracterização, estabilidade, determinação de agentes estranhos/adventícios, controles, métodos utilizados na sua elaboração e frequência dos ensaios;
- ✓ descrição do sistema de banco de células (mestre e de trabalho), com identificação, certificados de análises, origem, caracterização, estabilidade, controles em processo, métodos empregados na sua elaboração, frequência dos testes e definição do número de passagens;

- ✓ demonstração de que as características das células se mant m inalteradas durante os passos empregados na produ o, bem como a determina o da idade celular máxima *in vitro*;
- ✓ descri o das características do doador original, tais como tecido/ rgo de origem, origem étnica e geográfica, idade, sexo e condi o fisiológica geral, para o caso de linhagens humanas;
- ✓ descri o das condi es do doador original e características gerais, tais como espécie, linhagem, tecido/ rgo, origem geográfica, idade e sexo, testes para agentes patogênicos e condi o fisiológica para linhagens derivadas de animais.

A se o V apresenta os seguintes requerimentos acerca da produ o e controle dos bancos celulares (mestre e de trabalho) usados na obten o de produtos biotecnológicos:

- ✓ descri o da cepa/linhagem hospedeira;
- ✓ sequência do gene, descri o do vetor, método de inser o do vetor, sele o de clones gerados e controle da expresso;
- ✓ estabilidade genética do vetor dentro da célula;
- ✓ determina o da idade celular máxima *in vitro*;
- ✓ descri o do sistema de banco de células;
- ✓ atividades de controle de qualidade, estabilidade e a frequência dos testes.

Na ausência de detalhamentos e monografias oficiais na Farmacopéia Brasileira, a RDC 37b (Brasil, 2009b) define que outras farmacopéias são reconhecidas e aceitas no país, incluindo a Alemã, Americana, Argentina, Britânica, Européia, Francesa, Internacional (da OMS), Japonesa, Mexicana e Portuguesa. Isto   importante para as especifica es e metodologias analíticas que muitos fabricantes internacionais adotam, e que não estão detalhadas no compêndio brasileiro.

1.4.2 Boas Práticas

  reconhecido que nenhum regime de testagem em bancos de células   capaz de detectar todos os contaminantes em potencial. Desta forma,   importante que se adotem princípios de preven o ao longo de seu estabelecimento para assegurar a ausência da

introdução de contaminantes e gerar uma fonte confiável de substrato celular (ICH, 1997). Tais princípios estão contidos nas Boas Práticas, que são vistas como as normas e técnicas necessárias à obtenção da qualidade em uma dada área de aplicação.

Esta seção apresenta informações quanto ao material disponível sobre os princípios das Boas Práticas em algumas áreas correlacionadas. É analisado e confrontado o envolvimento das Boas Práticas de Fabricação, de Laboratório e em Cultura de Células, dentre outros assuntos, no estabelecimento e caracterização de um banco celular.

1.4.2.1 Boas Práticas de Fabricação

Há muitos guias publicados a respeito das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos para orientar a indústria farmacêutica. A OMS tem documentos complementares em sua série de relatórios técnicos, sendo um deles mais generalista (2003), e o outro específico para os biológicos (1992). Dadas suas características peculiares, como a esterilidade, são indicados vários pontos importantes para a produção de biológicos, como a necessidade de usar testes farmacopéicos para a detecção de contaminantes microbiológicos; e o treinamento das pessoas envolvidas na fabricação, englobando áreas de conhecimento como BPF, bacteriologia, virologia, imunologia e química.

A prevenção de contaminações adventícias deve ser evitada a todo custo, garantindo que funcionários que tenham sido expostos a tecidos animais ou culturas de microorganismos não entrem em contato com áreas estéreis, exceto se forem seguidos procedimentos validados de descontaminação (OMS, 1992). Existe ainda a preocupação com a contaminação cruzada potencial quando há manipulação de outros tipos celulares no ambiente (ICH, 1997). Isto é investigado rotineiramente durante uma inspeção para certificação quanto às BPF, o que inclui auditar as plantas da fábrica, com as conexões entre seus sistemas de ar e os filtros alocados na entrada e saída dos mesmos, e os fluxos de pessoas e materiais pelos ambientes (Brasil 2003b, 2010b).

Dois outros tópicos importantes nestes documentos são a idéia de que a produção de biológicos – sem menção às atividades de desenvolvimento tecnológico, como o estabelecimento de bancos celulares - deve ser conduzida conforme as BPF; e que, a fim de minimizar o risco de contaminação, deve ser adotada técnica asséptica durante o processo, um cuidado que também está descrito nas Boas Práticas de Laboratório e em Cultura de Células.

A RDC 210 foi publicada pela Anvisa em 2003 considerando as recomendações da OMS para a certificação da qualidade de produtos farmacêuticos, mediante inspeções nas unidades fabris para concessão do Certificado de BPF. É exposto que durante uma inspeção se avaliam as instalações físicas, os processos produtivos, testes de controle de qualidade e sistemas de garantia da qualidade, e o certificado é emitido por linha de produção (forma farmacêutica), no caso de medicamentos sintéticos; ou por produto, no caso dos biológicos. A única referência que esse texto fazia aos bancos de células usados na fabricação de produtos biológicos se resumia aos cuidados em seu armazenamento e ao seu acesso apenas por parte de pessoas autorizadas (Brasil, 2003b).

Esta Resolução continha três partes. Iniciava-se com uma seção sobre Garantia da Qualidade (GQ), onde eram definidas as responsabilidades nos temas higiene, validação, auditorias internas, pessoal, edificação, equipamentos, materiais e documentação. A segunda parte continha um guia com orientações para implementar os princípios da GQ e BPF. Por fim, eram introduzidas diretrizes suplementares que dizem respeito a medicamentos estéreis, produtos biológicos e validações dentro da indústria.

A norma entrou em consulta pública no ano de 2009 e a revisão foi publicada em 2010, como a RDC 17 (Brasil, 2010b). Esta versão segue o disposto anteriormente, mas se adequou ao guia atual da OMS e traz algumas atualizações para o Brasil, especialmente com relação à classificação de salas limpas e a validação de sistemas informatizados.

A RDC apresenta a Garantia da Qualidade como uma ferramenta imprescindível para a aplicação da filosofia e da política da qualidade, sendo definida como a totalidade de ações sistemáticas e providências que têm por objetivo garantir que os medicamentos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos, podendo assim ser utilizados para os fins propostos. Portanto, a GQ incorpora as BPF e outros fatores, incluindo o projeto e o desenvolvimento de um produto. Um sistema apropriado de GQ, aplicado à fabricação de medicamentos, deve assegurar, dentre outras coisas, que os mesmos sejam projetados e desenvolvidos considerando a necessidade do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação, de Laboratório e Clínicas; assegura também que as operações de produção e controle estejam claramente especificadas por escrito; e que sejam realizados todos os controles nas matérias-primas, produtos intermediários, produtos a granel, bem como outros controles em processo, calibrações e validações.

As BPF são apresentadas como a parte da Garantia da Qualidade que asseguram que os produtos são consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade

apropriados para o uso pretendido. Uma das subdivisões das BPF são as boas práticas de produção, com os procedimentos operacionais padronizados e registros documentados. Esta parte do texto se dedica às operações de produção e à prevenção de contaminações; há inclusive uma parte dedicada à obtenção de produtos estéreis e aos processos de esterilização.

O cumprimento das BPF está dirigido primeiramente à redução dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica, os quais não podem ser detectados apenas com a realização de ensaios nos produtos terminados. Estes riscos são constituídos essencialmente por contaminação-cruzada (como a contaminação com outros tipos celulares, no caso de bancos mestre e de trabalho), contaminação por partículas (viáveis ou não) e troca ou mistura de produto.

Algumas determinações das BPF se referem a processos, modificações, infraestrutura e manutenção de registros constantes. Todos os processos de fabricação devem ser claramente definidos e sistematicamente revisados em função da experiência adquirida. Além disso, devem demonstrar capacidade de fabricar medicamentos, dentro dos padrões de qualidade exigidos, atendendo às respectivas especificações; as etapas críticas dos processos de fabricação e quaisquer modificações significativas devem ser sistematicamente validadas.

As áreas de produção devem ser providas de toda a infraestrutura necessária, com um quadro de funcionários qualificado e devidamente treinado; espaço e instalações adequadas; equipamentos e serviços adequados; materiais, recipientes e rótulos claros e corretos; procedimentos e instruções aprovadas pela GQ; armazenamento e transporte adequados.

Deve-se ainda manter registros detalhados referentes à fabricação e distribuição, que possibilitem o rastreamento completo de um lote, sejam arquivados de maneira organizada e de fácil acesso. Isto é vital para a tomada de ações caso haja alguma não-conformidade ou desvio de qualidade. Como o texto está direcionado aos medicamentos, alguns pontos adicionais são desenvolvidos sobre seu armazenamento, auditorias internas e a capacidade do fabricante em lidar com recolhimentos, reclamações e investigações sobre desvios de qualidade (Rodrigues e Moro, 2008).

Os produtos biológicos, como vacinas e proteínas recombinantes, são contemplados de forma diferenciada na Resolução. É destacado, em texto harmonizado com a OMS, que seus processos fabris exibem uma maior variabilidade intrínseca, sofrendo degradação e gerando subprodutos de forma não constante, o que torna mais crítica a adesão aos princípios das BPF. Em geral são preparações injetáveis, logo devem ser estéreis e apirogênicas, e normalmente fabricadas em salas limpas, que são áreas onde o número de partículas viáveis e não viáveis é

controlado por meio de filtros de alta eficiência (Rodrigues e Moro, 2008). Além disso, pode haver preocupações adicionais com relação à biossegurança e à manutenção de biotérios.

Outros temas que recebem atenção especial da norma são:

- procedimentos operacionais padrão (POPs);
- documentação: todos os métodos, especificações, informações, instruções, atividades, procedimentos e resultados devem ser registrados para fins de controle e rastreabilidade, o que é fundamental para assegurar a qualidade da produção;
- calibrações: aplicáveis à aferição de instrumentos de medida e equipamentos;
- validações: para o processo fabril, procedimentos de limpeza, sistemas computadorizados e metodologias analíticas; são parte fundamental das BPF e devem ser conduzidas de acordo com protocolos pré-definidos para gerar relatórios finais claros;
- qualificações: referentes às instalações, ao desempenho de equipamentos e sistemas, e à operação de sistemas e subsistemas.

As validações constituem assunto de maior importância. Os processos considerados críticos devem ser validados de forma concorrente, prospectiva e/ou retrospectiva, quando houver alterações na fórmula padrão ou um novo método de preparação for introduzido, bem como na utilização dos materiais e dos equipamentos diferentes, ou ainda quando houver alterações no processo. As BPF de biológicos incluem a validação do processo de fabricação para avaliar, principalmente, a redução de contaminantes como DNA e proteínas das células hospedeiras, agentes adventícios e vírus endógenos.

Outra subdivisão das BPF se refere às boas práticas de controle de qualidade (CQ), que incluem também os estudos de estabilidade. Este capítulo da RDC esclarece que o CQ é responsável pela amostragem, especificações, ensaios, procedimentos de liberação e monitoramento ambiental. É vital que tal setor seja independente do Departamento de Produção, mas que tenha acesso a ele. Suas exigências básicas se referem às instalações, treinamentos, procedimentos, qualificações e validações, documentação, testes e resultados, armazenamento de padrões analíticos e rotulagens. É dada atenção ainda para a qualificação dos fornecedores e para a execução e registro dos controles em processo - tópicos não obrigatoriamente vistoriados para acreditação ISO.

Frente a uma grande variabilidade e riscos de desvios de qualidade, a produção de biológicos e os métodos de controle de qualidade adotados devem ser altamente padronizados

em função da potencial contaminação por agentes adventícios, da relativa instabilidade de muitos ingredientes ativos e da variabilidade inerente das matérias primas⁴ e metodologias analíticas.

Quanto à atribuição para realização das inspeções nacionais, as Vigilâncias Sanitárias locais (VISAs estaduais ou municipais) são responsáveis pelas visitas a estabelecimentos de interesse sanitário, dependendo do nível de descentralização. O Estado do Rio de Janeiro, por exemplo, é descentralizado e a VISA Municipal é responsável pela inspeção em farmácias de manipulação sem produtos estéreis, drogarias, restaurantes e outros estabelecimentos; a VISA Estadual efetua as inspeções em indústrias e farmácias que manipulam produtos estéreis.

Em contraste, a Anvisa é responsável pelas inspeções sanitárias nas fábricas localizadas no exterior, e acompanha as nacionais quando há maior complexidade, ou a pedido da VISA local. No entanto, após processo de pré-qualificação pela OMS em 2008, foi adotado um procedimento pela Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Insumos, Medicamentos e Produtos (GGIMP/Anvisa) no qual, para a certificação de produtores nacionais de medicamentos biológicos (vacinas, soros, alergênicos, biofármacos), a equipe inspetora deve contar com representante(s) da VISA local, da Anvisa e do INCQS, este como o especialista na área de controle de qualidade.

Em alguns exemplos nos EUA e Europa, o desenvolvimento de BCMs e BCTs pode ser realizado por uma empresa especializada (terceirizada ou independente) ou ainda por um laboratório de pesquisa e desenvolvimento dentro de fábrica ou universidade. Tais locais devem igualmente ser inspecionados para certificação pela Autoridade Sanitária. A FDA, por exemplo, conduz inspeções de BPF pós-comercialização que se estendem aos BCMs e BCTs, quando aplicável, conforme seu programa de inspeções disponível *on-line*⁵; de forma similar, duas empresas contatadas no exterior, que desenvolvem bancos celulares (vide seção 4.1.2), afirmaram que são inspecionadas pelo FDA ou Autoridade Sanitária competente do país. Se os testes de caracterização de bancos forem realizados por outros laboratórios, estes devem ser auditados quanto às BPL e/ou acreditação, conforme discutido na seção 1.4.2.2.

A RDC 249 de 13/09/05 (Brasil, 2005b) estabelece as BPF para produtos intermediários e insumos farmacêuticos ativos. Ela é redigida com foco nas indústrias farmoquímicas, e chama atenção a pontos como: pessoal, instalações, equipamentos e

⁴ Estes são considerados pela OMS como desafios à padronização de biológicos, conforme descrição em sua página de biológicos na internet.

⁵ O Programa consta na página da FDA que contém informações regulatórias sobre produtos biológicos.

aparelhos, materiais de produção, recipientes, limpeza e desinfecção. Atualmente está em consulta pública (Brasil, 2010a) para se adequar a um relatório de 06/2010 emitido pela OMS.

Há uma proposta para uma nova Resolução, também em consulta pública (Brasil, 2009a), como complementação à RDC 249/2005, e que discorre especificamente sobre os insumos farmacêuticos ativos obtidos por culturas de células/fermentação. Este documento inédito no Brasil aborda as similaridades e diferenças entre o processo de fermentação clássica, que frequentemente produz substâncias de baixo peso molecular, tal qual vitaminas, antibióticos, aminoácidos e carboidratos; e processos biotecnológicos, que normalmente empregam organismos geneticamente modificados visando à obtenção de moléculas de alto peso molecular, como proteínas ou polipeptídeos. O texto reforça aspectos como o controle dos materiais de partida, controles em processo, pessoal, instalações e equipamentos. É dada atenção ao aspecto da biossegurança para evitar a contaminação do operador e do meio ambiente durante a manipulação de organismos patogênicos.

Com relação aos bancos celulares usados para produzir insumos ativos, esta proposta de RDC relembra os cuidados de manutenção, manipulação, estocagem e rastreabilidade; contudo, introduz os seguintes temas de interesse da presente dissertação:

- o fabricante deve garantir a identidade, pureza e viabilidade dos bancos;
- bancos de trabalho recém preparados devem ser qualificados através de caracterização e testes apropriados;
- a estabilidade dos bancos deve ser monitorada sob as condições de armazenamento definidas;
- deve haver controle e registro do número de passagens/repiques.

Em suma, a norma determina que a empresa deve caracterizar os bancos e qualificá-los para o uso pretendido, bem como validar o processo de fabricação, definindo a idade celular *in vitro* máxima a ser permitida para cada processo fabril.

Estes documentos foram formulados com base em um guia internacional (ICH, 2000) sobre as BPF para ingredientes farmacêuticos ativos. O documento não se dedica à biossegurança, em termos de saúde do trabalhador ou do meio ambiente, e esclarece que suas disposições não afetam a habilidade de cada Agência Reguladora de estabelecer requerimentos específicos a respeito dos insumos ativos. O texto engloba os ingredientes obtidos por processos de síntese química e também por fermentação, dentre outros, e exclui aqueles usados em vacinas.

O guia reconhece que as etapas iniciais, como a geração de substratos celulares (estabelecimento dos bancos mestre e de trabalho de células de mamíferos), podem estar sujeitas às BPF e devem passar por controles de processo apropriados, porém não as inclui no seu escopo. A atenção é dirigida às etapas subsequentes, desde a recuperação de uma ampola de células, passando pela manutenção do BCT, cultivo, isolamento e purificação, processamento e embalagem; o documento considera que estas são as etapas que normalmente apresentam requerimentos crescentes quanto às BPF.

No caso de medicamentos obtidos por síntese química, a guia não se aplica à etapa de produção dos materiais de partida do insumo ativo, mas somente aos passos seguintes, a saber: introdução dos materiais de partida do insumo ativo no processo, produção de intermediários, isolamento e purificação, processamento e embalagem.

Em seu guia Q5D sobre a derivação e caracterização de substratos celulares para obtenção de produtos biotecnológicos (ICH, 1997), são dispostas diversas recomendações sobre as informações a serem fornecidas quando do registro de um medicamento biológico. Este documento inclui células de microorganismos e linhagens animais, diplóides e contínuas, usadas para a produção de biofármacos e vacinas. As informações se referem à origem e histórico da linhagem, procedimentos, manutenção, testes e garantia da qualidade. Fica clara a posição do ICH em não considerar especificamente a necessidade de seguir as BPF durante a obtenção de bancos de células.

Outra área que se refere às BPF são as Boas Práticas Clínicas (BPC). Estas são um padrão que engloba o desenho, conduta, monitoramento, interrupção, auditorias, análise, comunicação e documentação para estudos clínicos, garantindo que eles sejam válidos em termos éticos e científicos, e que as propriedades farmacêuticas do produto em investigação sejam devidamente documentadas (OMS, 2004a). De acordo com as BPC, a OMS e a RDC 17/2010, as BPF devem ser seguidas pelos fabricantes em todos os momentos relacionados à produção, inclusive durante o desenvolvimento de medicamentos destinados ao uso em pesquisa com seres humanos.

Contudo, existe atualmente uma lacuna regulatória neste ponto, já que a Autoridade Sanitária não é obrigada a inspecionar um fabricante para certificar sua adesão às BPF durante o desenvolvimento. A RDC está focada nas atividades industriais propriamente ditas, e deixa escapar atividades em que as BPF devem ser aplicadas, como nas BPC e também no estabelecimento de bancos de células a serem usadas como substratos na produção.

1.4.2.2 Boas Práticas de Laboratório e Acreditação

A Gerência-Geral de Laboratórios de Saúde Pública (GGLAS/Anvisa) tem, dentre seus atuais objetivos, a regulamentação, o fortalecimento e a coordenação das redes e sistemas de laboratórios analíticos de interesse da Vigilância Sanitária, desta forma promovendo a Política Nacional de Gestão da Qualidade nos Laboratórios. Além disso, está rediscutindo a organização da Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS). Esta Rede e as suas normativas estão em processo de reformulação, e conseqüentemente a GGLAS suspendeu de forma temporária as atividades referentes à habilitação de laboratórios, não realizando vistorias para reconhecimento quanto às Boas Práticas Laboratoriais (BPL). As informações constantes na página dessa Gerência-Geral orientam os laboratórios analíticos, com interesse em serem incluídos ou continuarem na REBLAS, a buscar reconhecimento junto ao Inmetro.

As BPL são um conjunto de procedimentos aplicados aos processos laboratoriais que visam à obtenção da qualidade (Costa e Costa, 2009). Seu cumprimento fornece um padrão de auditoria internacional, relacionado aos processos organizacionais e às condições de planejamento, execução, monitoramento, documentação e relato correto dos estudos laboratoriais. A *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD ou Organização pela Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OCDE) possui uma série de documentos a respeito das BPL, que visam garantir que os resultados dos testes sejam confiáveis, válidos e de alta qualidade, com informações sobre os produtos em teste. O guia mais geral (OECD, 1998) explica que estas Boas Práticas estão focadas nos estudos não-clínicos de segurança, em termos de saúde humana e ambiental. As práticas científicas e gerenciais devem levar a testes com qualidade comparável, para que haja harmonização e aceitação mútua entre diferentes países.

A referida norma é aplicável ao registro de diversas categorias de produtos, dentre as quais figuram os medicamentos, inclusive substâncias de origem biológica e até organismos vivos. O texto determina os seguintes aspectos para a qualidade: organização e definição das responsabilidades (da gerência, investigador principal, equipe); existência de um programa de GQ; instalações adequadas a todas as operações realizadas; manutenção de aparelhos, equipamentos, materiais e reagentes; sistemas de testes físicos, químicos e biológicos; materiais de referência; POPs e documentação; planejamento, realização e relato do estudo; e retenção de amostras do material testado.

O reconhecimento BPL é, em suma, dado por área de conhecimento, para laboratórios que realizem estudos não-clínicos de segurança, visando ao registro de produtos. Sua aplicabilidade, no âmbito desta dissertação, seria dirigida apenas aos testes de caracterização relativos à pureza das culturas de células (agentes adventícios, vírus, tumorigenicidade, etc.). De forma similar, e conforme apontado por Doyle e Griffiths (1998), embora seus elementos (documentação, testes) sejam necessários, as BPL não são aplicáveis, por definição, ao estágio do estabelecimento de bancos celulares, mas sim as BPF.

Outra possibilidade de avaliação da qualidade nas análises laboratoriais é a acreditação de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 (ou simplesmente ISO 17025). Esta norma apresenta os requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio analíticos e calibração, incluindo amostragem, com métodos normalizados ou não (ABNT, 2005). Costa e Costa (2009) observam ainda que ela define um padrão internacional competitivo e unificado para atestar a competência dos laboratórios para tais atividades, e também para o desenvolvimento de novas metodologias. O texto incorpora aspectos das BPL, mas os assuntos não são equivalentes.

A acreditação é aplicável a todas as organizações que realizem ensaios e/ou calibrações, como um laboratório analítico que efetue testes de controle de qualidade em produtos já registrados (e não apenas para testes não-clínicos de segurança). São avaliadas a rotina laboratorial, o programa de monitoramento e sistema de gestão da qualidade. Ela é aplicada a calibrações e análises de produtos em geral, sendo emitida por tipo específico de ensaio (p.ex.: um método de ELISA para quantificar determinado antígeno em uma vacina), e não para a atuação do laboratório como um todo.

Esta norma ISO verifica diversos tópicos também vistoriados em inspeções de certificação BPF (tópico “boas práticas em controle de qualidade”, dentro da RDC 17/2010), como: POPs, programa de manutenção, calibrações, validações de métodos, definição de responsabilidades, treinamentos, documentação, rastreabilidade, auditorias e GQ com as políticas, sistema e manual da qualidade. Os requisitos de segurança não são cobertos em seu escopo, tal como ocorre nas inspeções sanitárias.

As prováveis diferenças entre uma avaliação ISO e inspeção BPF (avaliando laboratórios de CQ dentro de uma indústria) incluem:

- (a) maior tempo dedicado em uma avaliação para acreditação, comparada ao prazo (de geralmente um dia) que as inspeções sanitárias dedicam às boas práticas em controle de qualidade;
- (b) maior atenção que a ISO dedica à verificação dos padrões de referência, que devem ser fornecidos por organismos reconhecidos;
- (c) observações mais minuciosas sobre as incertezas das medições.

Adicionalmente, a análise comparativa das normas não esclareceu se a acreditação dedica tanta atenção aos tópicos “qualificação de fornecedores” (ou “aquisição de serviços e suprimentos”) e “qualificação de equipamentos” quanto se faz em uma inspeção para certificação BPF.

A acreditação quanto à ISO 17025 não é obrigatória, mas oferece vantagens ao interessado, como a conquista de novos mercados, aumento da confiança nos serviços analíticos prestados, bem como o aprimoramento das práticas e divulgação dos serviços com reconhecida competência técnica.

O Inmetro é o órgão nacional a quem compete o planejamento e execução das atividades de acreditação de laboratórios de calibração e de ensaios, de provedores de ensaios de proficiência, de organismos de certificação, inspeção, treinamento ou outros, necessários ao desenvolvimento da infra-estrutura de serviços tecnológicos no país. Ele é capaz de realizar avaliações nos laboratórios para fins de acreditação quanto à norma ISO 17025:2005⁶. De acordo com as informações disponíveis em seu endereço eletrônico, o Instituto também responde pelo monitoramento da conformidade aos princípios das BPL.

Atualmente, há uma Consulta Pública (CP nº 15 de 23/03/11) para RDC da GGLAS, contendo norma específica a entrar no arcabouço jurídico da Anvisa. O texto proposto dispõe sobre a REBLAS, que pode ser composta por laboratórios públicos e privados, que devem prestar serviços analíticos com qualidade, confiabilidade, segurança e rastreabilidade, sob coordenação da GGLAS. A proposta de norma define que, para fins de habilitação (bem como renovação e ampliação do escopo) junto à Anvisa, os laboratórios deverão solicitar, junto ao Inmetro, acreditação ISO para determinado(s) ensaios(s) ou reconhecimento BPL (documentos da OCDE) para determinada área de especialidade (Brasil, 2011).

⁶ As normas ISO foram criadas pela *International Standardization Organization* a fim de estabelecer uma linguagem comum entre fornecedores e clientes, com vistas à garantia da qualidade. A ISO 9001:2000, por exemplo, certifica a existência de um sistema de qualidade e pode servir como diferencial competitivo, mas não atesta a capacidade técnica

De interesse desta dissertação, fica o conceito de que um laboratório analítico, responsável pelos testes de caracterização de substratos celulares, deve passar por algum tipo de auditoria por autoridade. Seriam aceitáveis, então, a acreditação para ensaios específicos e/ou o reconhecimento BPL, especialmente aplicável aos testes de segurança. Por fim, e caso tal laboratório esteja inserido em uma indústria, ele poderia ser auditado quanto às boas práticas em controle de qualidade durante uma inspeção sanitária para certificação quanto às BPF.

1.4.2.3 Boas Práticas em Cultura de Células

O Conselho Europeu para Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) publicou o relatório de uma força de trabalho (Hartung *et al.*, 2002) com os anseios e debates de diversos cientistas envolvidos com cultivo de células animais, tanto humanas quanto de outros mamíferos e de insetos. As discussões foram centradas no estabelecimento das Boas Práticas em Culturas de Células (BPCC), definidas como os padrões mínimos em culturas de células e tecidos. Seus princípios são análogos àqueles das BPL, mas que nem sempre podem ser implementados de forma integral na pesquisa básica (incluindo estudos *in vitro*, pesquisa e desenvolvimento), por razões de custo e falta de flexibilidade. Nesta reunião foi trabalhada a idéia de que um guia de aceitação internacional deveria ser produzido, visando garantir a reprodutibilidade, confiança, credibilidade e aceitação dos resultados produzidos em diferentes laboratórios.

Em 2005, foi publicado o guia (Coecke *et al.*, 2005) relativo às BPCC, pormenorizando os aspectos rotineiros do trabalho em um laboratório de cultivos celulares, e considerando os riscos na adoção de procedimentos com pouco controle e subótimos no preparo de células para uso diário. Essas Boas Práticas se consolidam como uma importante ferramenta para evitar a identificação errônea de linhagens celulares; e o documento destaca o esforço para que um trabalho seja reprodutível e válido, especialmente quando se desenvolve uma nova linhagem celular. Os pontos importantes e os princípios operacionais são:

- (a) Entendimento do sistema *in vitro* e dos fatores relevantes que podem afetá-lo: este item destaca a necessidade de certificação da linhagem celular (identidade, pureza e estabilidade ou integridade funcional). É dada atenção às características da célula, como a origem e histórico de seu desenvolvimento; e às peculiaridades do cultivo e

manutenção, o que engloba o controle de materiais (inclusive os de partida) e procedimentos para manutenção, meios e suplementos, adição de antibióticos, superfície de adesão (para células dependentes de ancoragem), temperatura, pH, atmosfera, subcultivo, criopreservação e contaminação microbiológica ou cruzada e equipamentos utilizados. Todos estes aspectos são comentados também pela OMS (2010) e contemplados nas BPF, com a rastreabilidade e qualidade dos insumos, demonstrada por meio de testagens apropriadas.

- (b) Geração de relatórios com qualidade para publicação dos resultados: as BPCC estão muito interessadas na publicação de artigos científicos, tal qual ocorre nos laboratórios de pesquisa; as BPF, pelo contrário, não se dedicam a este assunto, inclusive porque muitos itens inspecionados configuram segredos industriais.
- (c) Garantia da Qualidade para o trabalho realizado: este tema está amplamente explorado nas demais Boas Práticas abordadas (de laboratório e de fabricação).
- (d) Qualidade de instrumentos, materiais e equipamentos como vidrarias, micropipetas, refrigeradores, estufas e demais integrantes de um laboratório para fins de cultivo de tecidos, cabines de fluxo laminar, técnica asséptica e qualidade do ar: estes pontos são equivalentes aos requerimentos das BPF quanto a calibrações, qualificações e uso de POPs, especialmente no âmbito de operações estéreis. As Boas Práticas em Cultura de Células só não citam as validações de processo de fabricação, de limpeza nem de métodos analíticos.
- (e) Documentação: registros de forma escrita, desde a compra de materiais e insumos, procedimentos, testes de qualidade e resultados (inclusive os dados brutos de análises) e racional do trabalho desenvolvido, a fim de permitir rastreabilidade e repetibilidade das operações: todas estas questões são fundamentais também dentro das BPF e BPL, e são alvo de investigação durante uma inspeção sanitária.
- (f) Biossegurança: o guia chama atenção às regulações disponíveis em cada país de forma a trabalhar com cultivos celulares com ética e moral, promovendo segurança no local de trabalho. Neste sentido, o guia recomenda seguir normas específicas sobre saúde

ocupacional e segurança laboratorial. No Brasil, a Resolução de BPF (Brasil, 2010) esclarece que estes dois temas não são de sua abrangência.

Em um laboratório de cultivo de células, os riscos podem ser de natureza física (exposição à luz ultravioleta ou nitrogênio líquido), química (reagentes e substâncias como corantes e crioprotetores), e biológica (patógenos oriundos das culturas). Uma análise de risco adequada inclui o estudo dos perigos em potencial, sua minimização e o treinamento da equipe a fim de proteger os operadores, seus colegas, a população em geral e o meio-ambiente (em função dos procedimentos para descarte do material biológico). Com relação à contaminação microbiológica, este guia considera que, quando uma cultura celular é adquirida de um banco reconhecido, a documentação fornecida pode ser suficiente, desde que as ampolas não tenham sido expostas a fontes de contaminação durante o transporte – no entanto, isto vai contra o que a OMS recomenda em relação às células Vero que fornece aos cientistas do mundo inteiro, i.e., a Organização as fornece certificadas, mas ainda assim orienta que os centros realizem nova certificação ao recebê-las.

- (g) Aderência às regulações: o trabalho desenvolvido, seja pesquisa ou produção, deve seguir as regulamentações e legislações disponíveis, a fim de serem enquadradas como éticas e legais, em especial quando forem usados materiais de origem animal, humana ou organismos geneticamente modificados.

- (h) Treinamento: deve ser oferecido e averiguado, de tempos em tempos ou a cada mudança impactante, um programa de educação continuada que inclua os tópicos de trabalho rotineiro. Os níveis básicos incluem desde a manipulação asséptica de culturas até os procedimentos gerais de laboratório, chegando, em níveis mais avançados, a técnicas mais complexas como autenticação de linhagens, transfecção e uso de biorreatores. Quando se tratar da obtenção de produtos para fins farmacêuticos, os treinamentos devem ser formalmente registrados e revisados. A OMS (2010) reforça ainda temas-alvo como subcultivo, manutenção de cabines de segurança biológica e criopreservação. Tais treinamentos são fundamentais do ponto de vista das BPF, e incluem a aplicação de cursos e testes iniciais e periódicos, especialmente em trabalhos que requerem esterilidade; portanto, são também um objetivo primário da garantia da qualidade e de vistoria durante uma inspeção sanitária.

Postas estas considerações, as BPCC se enquadram como uma adaptação das BPL a ambientes como laboratórios de pesquisa básica. Estas Boas Práticas estão claramente englobadas pelas BPL e BPF, porém dão mais ênfase à biossegurança que esta última.

1.4.2.4 Biossegurança

Costa e Costa (2009) entendem que a Biossegurança não seja uma ciência propriamente dita por si só, já que não detém conteúdos isoladamente; seria um trabalho interdisciplinar que abrange engenharia de segurança, medicina ocupacional, saúde do trabalhador, infecção hospitalar, higiene industrial, vigilâncias, metrologia, meio ambiente e gestão da qualidade. Assim, é constituída por uma filosofia de trabalho com base na ética e na competência profissional, gerando uma postura e conduta de indivíduo e empresa que levam à preservação e promoção da saúde humana, animal e do meio ambiente. Ela é aplicável na redução e eliminação dos riscos inerentes ao trabalho com tecnologias laboratoriais.

No Brasil, a Lei 11.105/2005 é conhecida como a “Lei de Biossegurança” (Brasil, 2005a), mas discorre, em termos práticos, apenas sobre o manejo de organismos geneticamente modificados ou OGM (obtidos pelo uso da tecnologia do DNA recombinante) e células-tronco embrionárias. Ela instituiu os seguintes órgãos:

- Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio): parte integrante do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), é a instância colegiada multidisciplinar, de caráter consultivo e deliberativo, que presta apoio técnico e de assessoramento ao Governo Federal na área de biossegurança; atua na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a OGMs e também age no estabelecimento de normas e pareceres técnicos na área.
- Comissão Interna de Biossegurança (CIBio): equipe que deve ser criada em toda instituição dedicada ao ensino, pesquisa, desenvolvimento tecnológico e produção industrial, com base em técnicas e metodologias de engenharia genética, com OGMs e seus derivados. Apenas o uso das células-tronco embrionárias fica sob a normalização da Anvisa e da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisas. A maioria das atividades reguladas por esta Lei necessitam de um parecer emitido pela CTNBio (Valle e Barreira, 2007), como a construção, experimentação, cultivo, manipulação,

transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivado. No país, a maioria das deliberações da Comissão se refere à produção de OGM em espécies agrícolas, como milho e algodão geneticamente modificados. No entanto, outra aplicação seria o desenvolvimento, em território nacional, de uma linhagem recombinante com fins de produção de biofármacos – exemplificado na geração de células CHO que expressem determinada glicoproteína terapêutica –, a qual deve ser apropriadamente avaliada e aprovada pela Comissão.

De acordo com a Resolução Normativa nº 2 da CTNBio (Brasil, 2006), os OGM são classificados em função do potencial patogênico dos organismos doador e receptor, das sequências genéticas transferidas e sua expressão no organismo receptor, do organismo modificado resultante e seus efeitos adversos à saúde humana e animal, aos vegetais e ao meio ambiente. Também são avaliadas questões como a possibilidade de recombinação de sequências inseridas no OGM, que poderia levar à reconstituição completa e funcional de genomas de agentes infecciosos; outros processos que gerem um genoma infeccioso; genes capazes de codificar substâncias tóxicas aos homens, animais, vegetais ou meio ambiente; e genes de resistência a antibióticos de amplo uso clínico.

A classificação adotada no Brasil obedece àquela descrita pela OMS em sua versão mais recente do manual de biossegurança (OMS, 2004b), cujo foco é nos microorganismos patogênicos. Organismos de classe de risco 1 ou nível 1 de biossegurança são aqueles sem probabilidade de causar doenças no homem ou em animais, e não constituem risco para o meio ambiente, portanto representam risco baixo ou nulo tanto individual quanto coletivo. Exemplos seriam *Lactobacillus sp.* e *Bacillus subtilis*. Se for um OGM, ele contém sequências de ácido nucléico de organismo doador e receptor que não causam agravos à saúde humana ou animal, nem efeitos adversos aos vegetais e meio ambiente. As atividades e projetos com tais organismos podem ser realizadas em condições de nível de biossegurança 1 (NB-1), que é o de menor grau de contenção e complexidade quanto à proteção. As operações são geralmente realizadas em bancadas e requerem cuidados básicos como limpeza das instalações, descontaminação de superfícies e resíduos, higiene e correto manuseio de materiais perfuro-cortantes, e a existência de um programa de controle de insetos e roedores. Um ambiente como este corresponde a um laboratório básico de ensino ou pesquisa, onde o simples uso de técnicas microbiológicas garante a segurança adequada. Em geral, para cultivos celulares envolvendo a tecnologia do DNA recombinante, onde a célula parental não

exibe patogenicidade, a produção pode ser realizada de forma segura em um ambiente NB-1 ou nível de biossegurança em grande escala 1 (Rodrigues e Moro, 2008).

Um microorganismo de classe de risco 2 pode provocar doenças no homem, mas não configura um sério risco a quem o manipula em condições de contenção, nem à comunidade, aos seres vivos ou ao meio ambiente, inclusive porque há tratamentos efetivos e medidas de prevenção disponíveis. Assim, apresenta risco individual moderado e risco coletivo limitado, como por exemplo, a manipulação de *S. mansoni* ou do vírus da rubéola. Um OGM desta classe contém sequências de DNA ou RNA de organismo doador ou receptor com moderado risco de agravo à saúde humana e animal, e com baixo risco de disseminação a ponto de causar efeitos adversos aos vegetais e meio ambiente. O trabalho com tais organismos deve ser realizado em condições de Nível de Biossegurança 2 (NB-2), as quais incluem os cuidados aplicáveis anteriormente, acrescidas das seguintes precauções (Costa e Costa, 2009):

- uso de cabines de segurança biológica (classe I ou II) para prevenir o espalhamento de aerossol
- uso de equipamentos de proteção individual, como máscaras, gorros, óculos e jalecos;
- vacinação contra o organismo manipulado, quando aplicável
- exames médicos periódicos, quando aplicáveis

Podem ainda ser desejáveis no laboratório NB-2: sistema de ventilação controlado, autoclave para descontaminação de material e a existência de um diferencial de pressão (neste caso o local teria pressão menor que as salas em seus arredores, para fins de contenção, i.e., evitar que um organismo potencialmente patogêneo se espalhe para outras áreas). Um laboratório deste ainda é considerado básico, onde tipicamente ocorrem serviços primários de saúde, serviços diagnósticos ou pesquisa. Há ainda níveis de maior contenção, NB-3 e NB-4, para o trabalho com organismos que oferecem risco aumentado para o indivíduo e para a coletividade.

Os fundamentos da biossegurança – em especial os conceitos de contenção (conjunto de métodos de segurança empregados na manipulação de materiais infecciosos) e segurança do operador - devem ser aplicados a diversos procedimentos laboratoriais de rotina (Hartung *et al.*, 2002). O uso de cabines de segurança biológica, contando com filtros HEPA para filtração do ar de entrada e saída do ambiente, também é grande foco da Biossegurança.

Cabines como as de classe II são apropriadas à maioria dos trabalhos envolvendo cultivos celulares, pois garantem segurança ao operador, ao produto e ao ambiente (OMS, 2004b).

Culturas de células primárias derivadas de tecidos humanos devem ser consideradas como carreadoras de possíveis agentes infecciosos, os quais representam grande risco de contaminação ao manipulador. As possibilidades incluem os vírus da imunodeficiência humana (HIV), citomegalovírus e hepatites B e C, mas também devem ser considerados agentes bacterianos como espécies de *Mycobacterium* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Na verdade, todo tecido humano, independentemente dos testes por que tenha passado, deve ser considerado perigoso, desde a pesquisa até seu descarte, e os operadores devem ser vacinados contra patógenos específicos, quando aplicável (Hartung *et al.*, 2002).

Linhagens imortalizadas podem ter sofrido transformação espontânea, indução por agentes externos ou podem ainda conter retrovírus endógenos, e, desta forma, levantam preocupações quanto à biossegurança. Há o risco teórico de que materiais derivados de células cultivadas (primárias ou linhagens) tenham efeito danoso no ser humano, seja através do contato com pele ou olhos, ou especialmente pela penetração no organismo via perfurações ou inalação de gotículas e aerossóis. Uma avaliação deve ser feita considerando o histórico e *status* da cultura: células bem caracterizadas, por exemplo, ofereceriam menor risco em comparação a uma cultura desconhecida. De qualquer forma, o aspecto mais importante é que deve haver conhecimento do sistema a ser usado, com treinamento adequado e procedimentos relativos à manipulação e descarte dos materiais biológicos (Hartung *et al.*, 2002).

As células focadas nesta dissertação – Vero, CHO e MRC - são classificadas como risco 1 quanto à biossegurança, visto que são bem caracterizadas, possuem nenhum ou pouco risco individual e à comunidade. Não são microorganismos com probabilidade de causar doença em humanos ou animais, nem representam risco aos trabalhadores do laboratório, à comunidade ou ao meio-ambiente.

A fim de verificar os procedimentos e o trabalho envolvendo OGMs, a OMS (2004b) estimula a certificação de laboratórios do ponto de vista da Biossegurança. Uma inspeção desta natureza seria a verificação sistemática, como parte de um programa regular, das características e processos relativos à segurança dentro de um dado laboratório, e que levaria em conta:

- controles administrativos
- equipamentos de proteção individual
- controles de engenharia

- procedimentos para segurança física e química
- tratamento dos resíduos

A RDC 17 (Brasil, 2010b), ao definir a abrangência das inspeções sanitárias para certificação quanto às BPF (título I, capítulo II), estabelece que a norma não engloba todos os aspectos de segurança ocupacional ou de proteção ambiental, as quais são regulamentadas por legislação específica e devem ser assegurados pelo fabricante. Desta maneira, percebemos que o tópico de biossegurança provavelmente não é vistoriado de forma frequente e consistente nas indústrias produtoras de medicamentos, ao menos no momento de uma inspeção para certificação quanto às Boas Práticas de Fabricação de medicamentos.

Existem semelhanças e diferenças entre os conceitos e operações em BPF e Biossegurança – e caso se tenha que escolher entre uma delas, deve-se optar pela segunda para proteção da saúde humana, animal e do ambiente. Os pontos em comum incluem a necessidade de certificar as cabines de segurança biológica/fluxo laminar, a fim de averiguar sua integridade e funcionalidade. Isto é investigado em profundidade durante inspeções sanitárias (BPF), como a qualificação de operação do equipamento, verificação da classificação do ambiente (em função da retenção de partículas) e avaliação do sistema de ar como da planta fabril como um todo. Por outro lado, a Biossegurança deve vigorar quando se manipulam organismos patogênicos, substâncias tóxicas ou radioativas, situação em que se inverte a lógica na definição das cascatas (ou diferenciais) de pressão entre as salas classificadas. Para a fabricação de biológicos (ou injetáveis), as manipulações assépticas, como a etapa de envase de um produto biológico, devem ser realizadas em um ambiente classe A (fluxo laminar), dentro de uma sala grau B, em um ambiente de pressão relativa positiva, a fim de evitar a entrada de contaminantes que comprometam a esterilidade do produto. No entanto, quando há preocupações relativas à Biossegurança (como o exemplo das vacinas virais atenuadas), a sala crítica deve apresentar pressão negativa a fim de evitar a disseminação do material de risco (Rodrigues e Moro, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Levantar a capacidade instalada para a produção e certificação de células animais no Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar instituições nacionais e internacionais que comercializem células animais ou que possuam capacidade produtiva, desde o estabelecimento à certificação
- Definir o perfil dos medicamentos biológicos registrados no Brasil, obtidos a partir de células CHO, MRC-5 ou Vero
- Pesquisar as regulamentações nacionais e internacionais que abordam a obtenção e certificação de células visando produzir medicamentos biológicos
- Propor um guia nacional para regulamentar o estabelecimento e certificação de substratos celulares visando produzir medicamentos biológicos

3 METODOLOGIA

3.1 Investigação sobre a capacidade instalada para a produção e certificação de células animais no Brasil

A abordagem escolhida para este tópico foi o levantamento de dados, que é mais adequado à fase descritiva de uma pesquisa. Esta estratégia prioriza questões do tipo “quem”, “o que”, “onde”, “quantos” e “quanto”, em contraste a um estudo de caso, onde se priorizam perguntas do tipo “como” e “por quê”. A estratégia é vantajosa quando o objetivo é descrever a incidência ou predominância de um fenômeno ou um tipo de dado, e pressupõe a aplicação de questionários para a coleta de dados, com um comportamento discricionário mínimo da parte do pesquisador. É aplicável também quando não se exige controle sobre eventos comportamentais, diferentemente do que ocorre em um formato de experimento; e está centrado nos acontecimentos contemporâneos, ao contrário do que se investiga em uma pesquisa histórica (Yin, 2005).

A investigação foi iniciada por uma busca ativa, através de questionários direcionados a cientistas - produtores ou pesquisadores - que trabalham com células animais, a fim de descobrir quais instituições no país produzem e/ou realizam pesquisa com bancos de células visando à produção de biológicos, e quais testes de caracterização são realizados nos bancos existentes no Brasil. Desta forma, as questões do estudo têm como alvo diagnosticar o cenário de pesquisadores e produtores envolvidos com tais cultivos. A forma das questões confirma a escolha pela abordagem de levantamento, pois as perguntas formuladas intencionam realmente descobrir “quem trabalha com cultivos de células”, “o que estes cientistas fazem - pesquisa, produção ou testes” ou “quais produtos/serviços oferecem”, “quantos eles são e onde estão no Brasil e no exterior”.

Os cientistas procurados, também descritos como sujeitos da pesquisa, foram identificados inicialmente como pesquisadores e líderes dentro de instituições públicas ou privadas no setor de saúde, com notável conhecimento na área de cultivos celulares. As instituições foram, em ordem alfabética:

- Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ);
- Instituto Adolfo Lutz (IAL);
- Instituto Butantan (IB);
- Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz);
- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz);
- Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC/UFRJ);
- Universidade de São Paulo (USP).

Cada questionário solicitou a indicação de outros contatos possíveis, e assim foram identificados novos centros como sujeitos de pesquisa no país. Os seguintes centros foram procurados para participar da pesquisa através do preenchimento do questionário:

- BrBiotec Brasil;
- Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda;
- Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás);
- Farmacore Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia;
- Fundação Ezequiel Dias (Funed);
- Hemocentro de Ribeirão Preto;
- Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo (IPT);
- Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar);
- Instituto Vita Nova;
- Nanocore Biotecnologia S.A.;
- Recepta Biopharma;
- Universidade de Brasília (UnB);
- Universidade Estadual de Campinas (Unicamp);
- Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

3.1.1 Questionário

Os questionários podem ser vistos como o modo mais extensivamente usado a fim de coletar informações sobre aspectos como atitudes e comportamentos (Sudman e Bradburn, 1982). No momento de sua confecção, alguns cuidados foram considerados para definir os dados realmente desejados e formular perguntas não enviesadas, que não causassem

distorções nem fossem ameaçadoras – visto que perguntas que causam desconforto podem levar o respondente a encerrar a pesquisa ou falsificar suas respostas.

Com relação à formulação das questões, os autores supracitados expõem que as perguntas podem ser fechadas, tanto do tipo dicotômicas (exigindo uma resposta do tipo “sim” ou “não”) ou apresentar mais alternativas explícitas ou implícitas, em um formato de múltipla escolha. Já as perguntas abertas não fornecem categorias de opções, podendo inclusive chegar a um formato de livre resposta, no qual o sujeito de pesquisa responde com suas próprias palavras, e o pesquisador transcreve tudo de forma literal.

Feitas estas considerações, o questionário foi desenvolvido pelo mestrando, aprovado por seus orientadores. Foi adotado o modelo de questionário semi-aberto, i.e., contendo opções a serem selecionadas, mas também espaços a serem preenchidos livremente. Desta forma, buscou-se obter respostas diretas a questões pontuais, porém com a possibilidade de que o cientista expusesse informações pertinentes adicionais.

O documento foi assinado pelo sujeito de pesquisa e pelo pesquisador em sua página final, e uma cópia foi entregue a este, conforme explicitado no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O modelo de questionário consta como anexo desta dissertação.

3.1.2 Aspectos éticos

A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) é uma instância colegiada, de natureza consultiva, educativa, normativa e estratégica que está diretamente ligada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS). Sua atribuição principal é o exame dos aspectos éticos de pesquisas que envolvem seres humanos, e sua missão é elaborar e atualizar diretrizes e normas para a proteção dos sujeitos de pesquisa, além de coordenar a rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das diversas instituições existentes no país.

A Resolução CNS 196/96 (Brasil, 1996) tem natureza essencialmente bioética; ela instituiu a CONEP e oficializou a noção de que pesquisa envolvendo seres humanos inclui o manejo de informações que estejam direta ou indiretamente, e total ou parcialmente ligadas ao ser humano. Outros conceitos foram introduzidos, como o consentimento livre e esclarecido, definido como a “anuência do sujeito da pesquisa e/ou de seu representante legal, livre de vícios (simulação, fraude ou erro), dependência, subordinação ou intimidação, após explicação completa e pormenorizada sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, formulada em

um termo de consentimento, autorizando sua participação voluntária na pesquisa”. Por fim, o risco da pesquisa é entendido como “a possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer fase de uma pesquisa e dela decorrente”.

O uso de questionário a ser enviado aos cientistas, como metodologia adotada para o cumprimento do primeiro objetivo do presente trabalho, pode ser considerado um tipo de pesquisa com seres humanos, visto que lida com a coleta e manuseio de informações. Pesquisas envolvendo seres humanos incluem as atividades que têm como objetivo o desenvolvimento/contribuição para o conhecimento, de acordo com formulário disponibilizado pelo CEP/Fiocruz. Questões de confidencialidade podem estar envolvidas, e o sujeito de pesquisa deve ser protegido, o que torna necessária a avaliação do projeto por um Comitê de Ética em Pesquisa - no caso, o CEP da Fiocruz.

Considerando tais definições, foi formulado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), com base nas diretrizes expostas no Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa (Brasil, 2008), explicitando, em linguagem acessível, os seguintes itens:

- ✓ natureza da pesquisa
- ✓ objetivos
- ✓ metodologia empregada (questionário)
- ✓ acesso aos benefícios previstos da participação no estudo
- ✓ potenciais riscos e incômodos

3.2 Produtos biológicos registrados

A técnica selecionada para este tópico foi a análise de arquivos, que apresenta algumas semelhanças ao levantamento de dados, a exemplo das perguntas feitas na pesquisa e a ausência de controle sobre os eventos comportamentais. No entanto, pode focar ou não em acontecimentos contemporâneos (Yin, 2005).

A fim de melhor caracterizar o cenário nacional, foi realizada uma pesquisa para identificar os medicamentos biológicos registrados no Brasil, até a data de 15/03/11, obtidos a partir das células de interesse desta dissertação – Vero, CHO e MRC-5. Estas informações são de domínio público, pois seus registros são publicados no Diário Oficial da União. Os

exemplos de biológicos com registro válido no Brasil constam nas tabelas 4.7 e 4.8. As informações foram buscadas nos seguintes endereços eletrônicos:

www.anvisa.gov.br

www.i-helps.com

Para verificar possíveis dados mais atualizados, os resultados foram conferidos através do Sistema DATAVISA (sistema operacional da Anvisa), e um levantamento junto à Coordenação de Produtos Biológicos e Hemoterápicos (CPBIH/Anvisa).

3.3 Análise da regulamentação

Ainda sob a abordagem da análise de arquivos, foi realizada uma pesquisa, por meio eletrônico, da legislação nacional e normas internacionais acerca do estabelecimento e caracterização de bancos celulares, bem como os assuntos relacionados ao tema, como registro de produtos biológicos e inspeção das plantas fabris. Foram consultados os seguintes endereços:

www.anvisa.gov.br

www.ich.org

www.ema.europa.eu

www.fda.gov

www.planalto.gov.br

www.portal.in.gov.br

www.saude.gov.br

www.who.int

O arcabouço legal referente à área de saúde consultado para o presente trabalho inclui a Lei 6.360/1976, também conhecida como a “Lei de Vigilância Sanitária”, e diversas normas que incluem Resoluções da Diretoria Colegiada (RDCs), uma Resolução (RE) e Consultas Públicas (CPs) da Anvisa, bem como documentos de outros órgãos do governo, conforme discriminado:

Tabela 3.1: Regulamentação nacional consultada

Ano de publicação	Regulamento
2002	RDC 305
2003	RDC 68, RDC 210, RE 899
2005	Lei 11.105, RDC 249, RDC 315
2006	Resolução Normativa 2 (MCT)
2009	CP 70, RDC 37
2010	CP 84, RDC 17, RDC 55
2011	CP 15

Os documentos internacionais foram analisados a fim de identificar os procedimentos técnicos para certificação dos substratos celulares usados com fins industriais, e também identificar os padrões de qualidade seguidos no âmbito internacional. Com base neste levantamento, foi proposto um modelo de guia específico a respeito do tema para orientar o setor produtivo nacional.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Retorno dos questionários

Os questionários enviados foram respondidos por 10 dos 21 (47,6%) centros procurados. Dentre os participantes, houve a possibilidade de uma reunião presencial para preenchimento do questionário (7 do total de 10), enquanto os outros 3 preencheram o documento e o devolveram através do correio eletrônico.

Os resultados desta seção estão divididos entre os institutos que compõem o cenário nacional e o internacional. Os centros identificados ao longo da pesquisa, mas que não responderam o documento, foram relacionados ao fim da seguinte seção com as informações publicadas em seus endereços eletrônicos.

4.1.1. Cenário nacional

A análise dos questionários e *websites* permitiu mapear os centros contemplados pela pesquisa e descrever suas atividades de forma qualitativa. Conforme indicado na Figura 4.1, a maioria dos centros investigados é de natureza pública (8 entre 10), seja esta federal ou estadual. Todos desenvolvem pesquisa com linhagens de células animais.

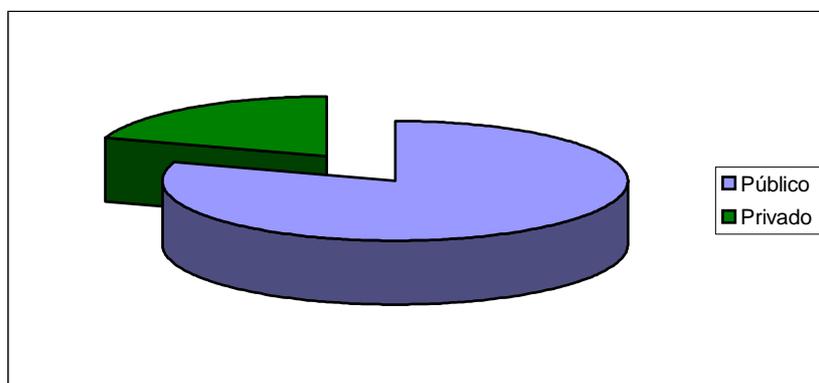


Figura 4.1: Perfil dos participantes da pesquisa por natureza pública ou privada

Apenas as duas universidades pesquisadas não estabelecem bancos de células, mas os demais oito centros o fazem. Um total de 9 centros atuam na pesquisa e desenvolvimento (P&D), visando à obtenção de medicamentos biológicos; 4 dos institutos estabelecem seus bancos de células para o uso em testes (como ensaios de toxicidade, diagnóstico e controle de qualidade); um centro investigado atua na produção de biológicos.

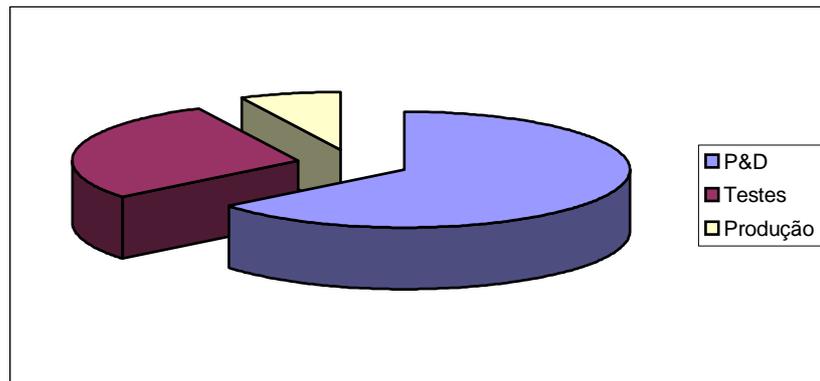


Figura 4.2: Perfil dos participantes da pesquisa por área de atuação

As informações coletadas pelo preenchimento do questionário seguem abaixo, por instituto pesquisado e em ordem alfabética.

4.1.1.1 Banco de Células do Rio de Janeiro

Esta associação civil sem fins lucrativos foi alojada por anos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, dentro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo transferida no final de 2010 para a sede do Inmetro (Xerém/RJ). Desde sua criação, o Banco se dedica ao depósito e distribuição de linhagens celulares aos cientistas brasileiros, e desenvolveu habilidades, ao longo do tempo, para ministrar treinamentos em biologia celular, chegando a abrigar programas como o transplante autólogo de medula óssea, e ainda o cultivo de queratinócitos para transplante autólogo de pele e mucosa. O preenchimento do questionário revelou as seguintes atividades realizadas:

- pesquisa: desenvolvimento de validação para ensaios de controle de qualidade de células;
- estabelecimento de bancos celulares para fins de pesquisa;
- produção de culturas de células para pesquisa e comercialização;

- comercialização (incluindo importação e exportação);
- testes de identidade: isoenzimas por eletroforese, citogenética clássica, análise de DNA por *fingerprinting*, marcadores de membrana por citometria de fluxo e marcadores internos por imunofluorescência;
- testes de segurança: esterilidade por microbiologia e detecção de micoplasma por PCR;
- o laboratório está em vias de acreditação ISO 17025.

Estes testes de caracterização são realizados em todas as mais de 300 linhagens criopreservadas e disponíveis para consulta em sua página na internet. As seguintes linhagens de interesse deste trabalho estão disponíveis em sua coleção: CHO-K1, Vero e MRC-5.

Ainda de acordo com seu *site*, o BCRJ pode avaliar propostas de projetos ou parcerias nas seguintes áreas: desenvolvimento de cultura primária específica, desenvolvimento de hibridomas, produção de anticorpos monoclonais e testes de citotoxicidade.

4.1.1.2 Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

Esta empresa privada nacional está localizada em Campinas (SP), onde realiza pesquisa e desenvolvimento de processos de produção e purificação em larga escala de proteínas heterólogas de alta complexidade, a partir de células animais. Além disto, são realizadas as atividades de estabelecimento de bancos, testes para caracterização e produção. A tabela abaixo resume as atividades com os tipos celulares empregados.

Tabela 4.1: Relação de células e atividades realizadas pela Cristália

Linhagem	Origem (coleção)	Atividade
CHO	Invitrogen	expressão de proteína de interesse farmacêutico
Nb2-11	USP	bioensaio - atividade
Caco-2	USP	bioensaio – permeabilidade celular
BUD-8 (humana)	ATCC	bioensaio - atividade
WEH1 - 13 var	ATCC	bioensaio - atividade

Os testes de identidade e segurança são terceirizados por ora; mas a Cristália realiza os testes de DNA residual e proteínas da célula hospedeira no produto.

A estabilidade é estudada pela avaliação do crescimento celular, morfologia e manutenção da expressão protéica pelas linhagens. As várias atividades desenvolvidas, como testes de citotoxicidade, podem demandar aumento do número de linhagens usadas atualmente.

Por se tratar de uma empresa farmacêutica, com planta certificada para produção de medicamentos sintéticos, vários aspectos das BPF já estão presentes na área de pesquisa e desenvolvimento, e a nova planta piloto de biotecnologia, atualmente em construção, será inspecionada pela Vigilância Sanitária local e Anvisa para futura certificação.

4.1.1.3 Farmacore Biotecnologia Ltda.

Esta microempresa nacional e privada de base tecnológica está localizada em Ribeirão Preto/SP. Ela estabelece bancos mestre e de trabalho de células HEK 293 originados da ATCC, e desenvolve pesquisa para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos em escala de bancada, somados a escalonamentos de até 25 L de volume de trabalho.

Com relação aos ensaios de segurança, a empresa possui capacidade para a realização dos seguintes testes:

- esterilidade por método farmacopéico;
- detecção de micoplasma pelo kit MycoAlert (6 tipos do contaminante) e de acordo com o guia norteamericano *Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals*;
- teste para DNA residual por qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa).

4.1.1.4 Fundação Ezequiel Dias

É um órgão do sistema estadual de saúde localizado em Belo Horizonte (MG/Brasil). A Funed atua na produção de medicamentos e imunobiológicos, na pesquisa em saúde pública e nas ações de vigilância sanitária, epidemiológica e ambiental. Os imunobiológicos são soros antiofídicos, antiescorpiônicos e antitóxicos para o PNI.

A Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento abriga a Divisão de Ciências Biomédicas, e uma de suas linhas de pesquisa envolve bancos de linhagens celulares para:

- testes de bioprospecção de venenos animais e extratos vegetais: triagem de moléculas para avaliar sua atividade antitumoral, antiangiogênica e bloqueadora de canais iônicos;
- validação de linhagens celulares para testes pré-clínicos;
- cultivo primário de células de invertebrados de interesse em saúde pública e de glândulas de animais peçonhentos;
- análise citogenética;
- produção de anticorpos monoclonais;
- bio-repositórios;
- análise de tecidos e linhagens tumorais humanas.

Especificamente, o Serviço de Biologia Celular e Inovação Tecnológica da Funed engloba os laboratórios que realizam os ensaios de bioprospecção e desenvolvimento de proteínas recombinantes terapêuticas, anticorpos monoclonais e antígeno rábico. Além disso, são realizados o estabelecimento de bancos mestre e de trabalho, e a produção de células em pequena escala. As atividades relacionadas com células de mamíferos incluem:

Tabela 4.2: Relação de células e atividades realizadas pela Funed

Linhagem	Origem (coleção)	Atividade
Vero	ATCC	ensaios de toxicidade
CHO	ATCC/Invitrogen	obtenção de proteínas recombinantes
MRC-5	ATCC	ensaios de toxicidade
Tumores humanos	ATCC	pesquisa de atividade antitumoral e de marcadores moleculares

Os seguintes testes de caracterização são realizados atualmente em todos os bancos de células:

- identidade: análise citogenética e análise de DNA por *fingerprinting*;

- pureza: esterilidade (microbiologia) e micoplasma (kits para detecção de DNA e também para detecção da atividade enzimática do microorganismo);
- o laboratório possui certificação ISO 9001:2008 (sistema de qualidade).

4.1.1.5 Instituto Adolfo Lutz

De natureza pública estadual, o Instituto Adolfo Lutz é credenciado pelo Ministério da Saúde como Laboratório Nacional em Saúde Pública e Laboratório de Referência Macro-Regional. Além disso, é Centro Colaborador da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) nas áreas de arbovírus, vírus influenza, produção de imunobiológicos e culturas celulares. O Núcleo de Cultura de Células do IAL, que atualmente está em adequação à norma ISO 17025, realiza as seguintes atividades com células animais:

- pesquisa na área de virologia, bacteriologia, parasitologia, toxicologia e outras, visando à Saúde Pública
- estabelecimento de bancos de trabalho
- produção e comercialização
- teste de citotoxicidade *in vitro*

O Instituto efetua manutenção para fornecimento e serviço de diagnóstico e pesquisa com as seguintes células, todas de origem ATCC: Vero, MRC-5, Hep2, RD, HeLa, BHK-21 clone 13 e MDCK. Os testes de identidade e segurança realizados são apresentados abaixo.

Tabela 4.3: Relação de testes de caracterização realizados pelo IAL

Teste	Método
Identidade (todas as linhagens do acervo)	Isoenzimas (eletroforese) e cariótipo (banda G), validação <i>in hosue</i>
Esterilidade	Microscopia eletrônica e meios microbiológicos
Micoplasma	Microscopia eletrônica, cultura e PCR

A estabilidade das células é verificada por viabilidade antes e após congelamento, morfologia, curvas de crescimento e sensibilidade viral.

4.1.1.6 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

Bio-Manguinhos está inserido na Fiocruz (RJ) como unidade técnico-científica voltada à pesquisa, desenvolvimento e fabricação de produtos biológicos, com um portfólio que inclui vacinas, biofármacos e reativos para diagnóstico. Suas atividades garantem a auto-suficiência em vacinas essenciais para o calendário básico de imunização MS. Duas de suas vacinas, a contra a febre amarela e a meningocócica AC, foram pré-qualificadas pela OMS para fornecimento internacional. São produzidas vacinas bacterianas e virais na planta fabril; as virais são, no entanto, de interesse específico quanto ao uso de culturas de células animais. São elas:

- poliomielite, a partir das cepas atenuadas (*Sabin*) tipos I, II e III, replicadas em MRC-5. Atualmente, Bio-Manguinhos recebe o granel importado e dá continuidade ao processamento até a obtenção do produto terminado;
- febre amarela (atenuada), obtida a partir de ovos embrionados de galinhas livres de patógenos específicos ou SPF (da sigla para *Specific Pathogen Free*);
- tríplice viral (atenuada), composta pelos vírus do sarampo e caxumba (replicados em fibroblastos de embriões de galinha), bem como o componente rubéola, replicado em culturas de MRC-5. Similarmente à vacina contra pólio, este produto atualmente é recebido na forma de granel.

Os biofármacos são fornecidos ao Programa de Medicamentos Excepcionais do MS, através de parceria com a Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Estão nesta classe de medicamentos:

- alfaepoetina, indicada para o tratamento de anemias, é uma glicoproteína recombinante produzida em células CHO transfectadas;
- alfainterferona 2b, para o tratamento de hepatites crônicas.

As linhas de pesquisa envolvendo medicamentos biológicos incluem os seguintes projetos:

- vacina febre amarela inativada;

- vacina dengue inativada;
- hibridomas;
- vacina Hepatite A inativada;
- interferon beta recombinante;
- controle de qualidade.

Diversas linhagens derivadas de mamíferos são utilizadas atualmente nas atividades de Bio-Manguinhos, conforme detalhado a seguir.

Tabela 4.4: Relação de células e atividades realizadas com biológicos em Bio-Manguinhos

Linhagem celular (origem)	Atividade	Produto (vacina ou biofármaco)
Vero (ATCC/OMS)	Pesquisa e CQ	Febre amarela e tríplice viral
CHO (ATCC)	Produção e CQ	eritropoetina e interferon- β
MRC-5 (ATCC)	Produção e CQ	Tríplice viral
RK13 (ATCC)	CQ	Rubéola
HEP 2C (ATCC)	CQ	interferon- α e poliomielite
WI-38 (ATCC)	CQ	Tríplice viral
MA104 (ATCC)	CQ	Rotavírus

Com relação aos testes de caracterização, o Instituto está em fase de implementação para análise de isoenzimas para a vacina tríplice viral, e de DNA residual por *threshold*. Os seguintes controles estão atualmente operacionais:

Tabela 4.5: Relação de testes de pureza realizados por Bio-Manguinhos

Teste	Linhagem celular testada	Método
Agentes adventícios	MRC-5, WI-38	Citopatogenicidade
Esterilidade	Todas	Filtração em membrana
Micoplasma	Todas	Cultivo direto e PCR

4.1.1.7 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

O INCQS é o laboratório oficial de saúde pública do país, inserido na Fiocruz (RJ), que é uma fundação federal. Ele é parte do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e atua em estreita cooperação com a Anvisa, Secretarias de Saúde estaduais e municipais, e diversos outros parceiros. Sua atuação inclui ensino, pesquisa e tecnologias de laboratório relativas ao controle de qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. De acordo com o artigo nº 339 do regimento interno da Fiocruz (Brasil, 2003d), ao Instituto compete planejar, coordenar, supervisionar e executar várias atividades, como a verificação da qualidade de alimentos, medicamentos, sangue e hemoderivados, imunobiológicos (onde se inserem soros e vacinas), cosméticos, produtos domissaneyantes, reativos para diagnóstico, equipamentos e artigos de saúde em geral. Além disso, presta assessoria aos laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária, emite pareceres técnico-científicos e pode participar de inspeções em indústrias ou laboratórios.

O Instituto possui acreditação na norma ISO/IEC 17025 para calibrações quanto à massa, temperatura, umidade, volume e massa específica, conforme verificado no relatório público do mesmo.

O INCQS possui grupos técnicos, dentre os quais o de produtos biológicos, que lida com biofármacos, soros e vacinas. Este grupo participa da revisão de regulamentações na área, trabalha para estabelecer padrões de referência laboratoriais e analisa a qualidade dos medicamentos citados, por demanda do PNI/MS, da Anvisa ou até mesmo da OMS ou Organização Pan-Americana de Saúde.

O Departamento de Imunologia do INCQS é uma de suas quatro seções técnicas, e contém o Laboratório de Vacinas e Virais e Cultura de Células, onde há bancos celulares para os ensaios de controle de qualidade necessários à liberação das vacinas.

Com o preenchimento do questionário, foi possível verificar que o INCQS realiza atualmente as seguintes atividades investigadas no presente trabalho:

- pesquisas envolvendo o controle de qualidade de produtos sujeitos à Vigilância Sanitária;
- estabelecimento de banco celular de trabalho;
- são realizados os seguintes testes de pureza em todas as culturas: esterilidade por inoculação direta e micoplasma por coloração de DNA.

- a estabilidade dos bancos celulares é testada pela confecção de curvas de crescimento.

O Departamento usa as células descritas abaixo em seus testes de controle de qualidade para análise lote-a-lote das vacinas:

Tabela 4.6: Relação de células usadas para testes de vacinas pelo INCQS

Linhagem	Origem (coleção)	Vacina
Vero	ATCC	febre amarela
Hep 2C	ECACC	poliomielite
RK 13	ATCC	tríplice viral
BHK 21	ATCC	raiva
MA 104	GSK	rotavírus

Foi constatado que as mesmas células (Vero, Hep 2C, RK 13 e MA 104) são usadas para o CQ das mesmas vacinas pelo INCQS e por Bio-Manguinhos.

4.1.1.8 Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares

O LECC está sediado na COPPE – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia -, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As atividades desenvolvidas englobam:

- (a) desenvolvimento de bancos mestre e de trabalho para fins de pesquisa;
- (b) pesquisa e desenvolvimento para a produção de vacinas (como a febre amarela), e biofármacos como G-CSF e fator IX recombinante. Neste sentido, as linhas principais são a clonagem e expressão de proteínas terapêuticas, o desenvolvimento de processos de cultivo celular e o desenvolvimento de processos de purificação de moléculas. As linhagens utilizadas atualmente são CHO, BHK-21, HEK293, Vero e SF9, obtidas da ATCC ou DSMZ. Com relação aos testes de pureza, o Laboratório está implementando um método baseado em PCR para a detecção de micoplasma.

(c) o laboratório se encontra atualmente em estágio de auditorias internas visando à certificação de boas práticas.

4.1.1.9 Universidade de Brasília

Esta Universidade federal, dentro de seu Instituto de Biologia, possui o Departamento de Biologia Celular com laboratórios que atuam na área de pesquisa e desenvolvimento com células de mamíferos e vetores plasmidiais. São usadas linhagens derivadas de mamíferos, provenientes de coleção oficial, visando à expressão heteróloga e produção de biofármacos de forma transiente ou estável, conforme exposto na tabela 4.5. Além disso, o Departamento realiza testes para detecção de micoplasma por PCR.

Tabela 4.7: Relação de células e produtos em desenvolvimento pela UnB

Linhagem	Origem (coleção)	Produto
CHO-K1	ATCC	Anticorpos e fatores plasmáticos
HEK 293	ATCC	Anticorpos e fatores plasmáticos
HEP-G2	ATCC	Fatores plasmáticos

4.1.1.10 Universidade de São Paulo

O Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica está inserido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. O Laboratório pesquisa o desenvolvimento de processos de crescimento celular, e tem como principal objetivo obter meios de cultura de células livres de proteínas de origem animal. O processo de cultivo está qualificado e a pesquisa abrange as seguintes linhagens:

Tabela 4.8: Relação de células usadas pela USP

Linhagem	Origem (coleção)
CHO	ATCC
BHK ₂₁ C ₁₃	MAPA
BHK ₂₁ S ₁₃	Vallè
HAW	ATCC

Adicionalmente, os seguintes testes são realizados:

- análise de isoenzimas por eletroforese;
- detecção de micoplasma por PCR.

A tabela 4.9 contém o resumo dos testes de caracterização que cada centro investigado pode realizar em parceria com Bio-Manguinhos, de acordo com os questionários respondidos.

Tabela 4.9: Possíveis parcerias de Bio-Manguinhos para testes de certificação

Instituição	Testes de identidade e estabilidade	Testes de pureza
BCRJ	Isoenzimas, citogenética, DNA <i>fingerprinting</i> , citometria de fluxo, imunofluorescência	Microbiologia e micoplasma
Cristália	Estabilidade pela avaliação do crescimento celular, morfologia e manutenção da expressão protéica	DNA residual e proteínas da célula hospedeira
Farmacore	---	Esterilidade, micoplasma e DNA residual
Funed	Citogenética e DNA <i>fingerprinting</i>	Esterilidade e micoplasma
IAL	Isoenzimas e cariótipo	Esterilidade e micoplasma
INCQS	Curva de crescimento	Esterilidade e micoplasma
UnB	---	Micoplasma
USP	Isoenzimas	Micoplasma

A tabela 4.10, apresentada a seguir, resume as atividades desempenhadas por cada centro que respondeu o questionário (exceto testes de caracterização, abordados na tabela

anterior), bem como seu *status* regulatório, ou seja, se há adesão a algum tipo de norma ou regulamento para a pesquisa e produção com bancos de células.

Tabela 4.10: Resumo das atividades realizadas com cultivos celulares e *status* regulatório dos centros nacionais investigados

Centro	Atividade	<i>Status</i> regulatório
BCRJ	Pesquisa, produção de bancos, comercialização	Em vias de acreditação ISO 17025
Bio-Manguinhos	Pesquisa, produção de medicamentos biológicos	Certificação BPF
Cristália	Pesquisa	Planta piloto será inspecionada para certificação BPF
Farmacore	Pesquisa, produção de bancos	(*)
Funed	Pesquisa, produção de bancos	Possui acreditação ISO 9001
IAL	Pesquisa, produção de bancos, comercialização	Em adequação à ISO 17025
INCQS	Pesquisa	Alguns ensaios possuem acreditação ISO 17025
LECC	Pesquisa, produção de bancos	Em estágio de auditorias internas visando à certificação em Boas Práticas
UnB	Pesquisa	(*)
USP	Pesquisa	Possui qualificação de equipamentos

(*) Não foi possível detectar esta informação através do questionário.

Os centros que citaram a acreditação pela norma ISO 17025 provavelmente se referiram às atividades de testes para caracterização dos bancos de células; já as referências às BPF (e também à ISO 9001 em potencial) se aplicam ao estabelecimento dos bancos. Parece haver uma falta de clareza quanto a quais normas seguir; mas de qualquer forma, fica evidente o esforço dos institutos nacionais investigados em se adequar a um sistema de qualidade, que possa ser avaliado e reconhecido por outros centros.

4.1.1.11 Centros pesquisados por meio eletrônico

Os seguintes centros foram identificados, porém não responderam o questionário da pesquisa, ou não o fizeram em tempo hábil para o fechamento desta dissertação. Seguem a

seguir, então, as informações disponíveis em seus endereços eletrônicos, a respeito das atividades que desenvolvem com culturas de células.

O estado de São Paulo abriga oito institutos de interesse da presente dissertação. Na capital está localizado o Instituto Butantan, que produz imunobiológicos como as vacinas contra difteria, tétano e pertussis, além do antígeno da Hepatite B (recombinante em *S. cerevisiae*), e inúmeros soros para acidentes com animais peçonhentos. O IB está desenvolvendo vacinas contra gripe (H1N1 e H5N1) e raiva usando células Vero; e desenvolve ainda pesquisa visando à produção de biofármacos.

O Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), através de seu Laboratório de Biotecnologia Industrial, atua nas seguintes áreas, dentre outras: projetos de biorreatores, desenvolvimento de processos biotecnológicos e de vacinas e biofármacos, escalonamento de processos, caracterização e controle de qualidade de produtos biotecnológicos. De especial interesse deste trabalho está a atividade de cultivo e preservação de microorganismos e células animais.

A empresa Recepta Biopharma atua em biotecnologia via parcerias com universidades, institutos de pesquisa e hospitais, e é dedicada à pesquisa e ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais para o tratamento do câncer. O desenvolvimento e produção envolvem diversas áreas de competência, dentre as quais a geração de linhagens celulares para a produção em escala piloto de anticorpos monoclonais e demonstração da viabilidade de sua produção em escala industrial. Contudo, as etapas de interesse do presente trabalho foram realizadas em parceria pelo IB: geração de linhagens celulares estáveis e alta produtividade para a produção de anticorpos monoclonais humanizados, construção dos bancos celulares e produção dos anticorpos em escala piloto pelos Laboratórios de Anticorpos Monoclonais.

A Associação Brasileira de Empresas e Entidades de Biotecnologia (BrBiotec Brasil) está localizada também na capital paulista, e é uma rede de entidades, organizações e empresas, com foco na geração de negócios, fortalecimento e promoção das empresas brasileiras de biotecnologia, tanto no país quanto no exterior.

A cidade de Campinas abriga uma empresa privada e uma universidade com atuação na área de cultivos celulares. A Nanocore Biotecnologia S.A., de base tecnológica, atua na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos, baseados em plataformas de biotecnologia e nanotecnologia. Ela trabalha com base em contratos de serviços para desenvolver medicamentos, vacinas e métodos diagnósticos. Já a Unicamp contém a Faculdade de

Engenharia Química, onde está inserido o Departamento de Processos Biotecnológicos, envolvido no desenvolvimento de processos com cultura de células animais e microbianas, sistemas de purificação e recuperação de biomoléculas em escala industrial, para aplicação médica e farmacêutica.

O interior do estado também apresenta dois outros centros de interesse. A Universidade Federal de São Carlos, localizada em Sorocaba (SP), através do seu Departamento de Engenharia Química, contém o Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celular, atua na pesquisa com linhagens como CHO-K1 e hibridomas, visando à produção de proteínas recombinantes com interesse terapêutico. Por fim, o Hemocentro de Ribeirão Preto é um instituto de referência para coleta, processamento e distribuição de sangue também desenvolve pesquisa na área de proteínas recombinantes. Ele possui laboratórios de citometria de fluxo, de HLA e de manutenção de linhagens celulares para pesquisas de interesse médico e científico. Há ainda uma linha de pesquisa para a expressão dos fatores VIII e IX de coagulação recombinantes, nas células de mamíferos SkHep-1 (linhagem derivada de tumor endotelial aderente humano) e HepG2 (derivada de hepatocarcinoma humano).

A Hemobrás é uma empresa pública estatal vinculada ao MS que trabalha para tornar o Brasil auto-suficiente no setor de derivados do sangue, fornecendo os seguintes medicamentos: albumina, cola de fibrina, complexo protrombínico, fatores VIII e IX, fator de von Willebrand e imunoglobulinas específicas. Uma de suas linhas de pesquisa, ocorrendo na unidade em Recife (PE), é o desenvolvimento de fator estimulante de colônia de granulócito e fatores VIII e IX humanos recombinantes.

No estado de Minas Gerais se encontra a empresa Vita Nova, inserida na incubadora Habitat (Fundação Biominas). Este Instituto se dedica ao desenvolvimento de processos de cultivo, purificação e caracterização de moléculas visando à produção de biofármacos.

O último exemplo se refere ao Tecpar, com sede em Curitiba, que atua em diversas áreas científicas, dentre as quais na produção de imunobiológicos, desta forma contribuindo com os órgãos públicos para a auto-suficiência do país com relação a tais produtos. Sua estrutura é composta pelas Divisões de Vacinas Virais, Vacina Anti-rábica Canina, Vacinas Bacterianas, Biotérios, Química Fina e Antígenos.

4.1.1.12 Avaliação dos resultados nacionais

Houve limitações intrínsecas na abordagem adotada para mapear o cenário nacional de cientistas que trabalham com células para fins industriais. Em primeiro lugar, a inegável possibilidade de vieses no planejamento do questionário (Yin, 2005). O método escolhido - levantamento de dados - caracteriza uma pesquisa qualitativa, onde há mais participação do sujeito de pesquisa e menos controle sobre os resultados, ou seja, os dados coletados através dos questionários não puderam ser confirmados de outra forma. Além disto, o cenário real foi certamente subquantificado devido: (a) ao alcance físico limitado da pesquisa em identificar todos os investigadores e produtores nacionais da área e (b) à não participação de alguns centros nacionais, por recusa ou não retorno do contato.

O país, no entanto, está claramente repleto de profissionais qualificados e dedicados à pesquisa, desenvolvimento de processos e produtos e à fabricação de biológicos para uso humano. É importante sempre aprimorar tais capacidades, bem como investir de forma constante em melhorias relacionadas às Boas Práticas como validações e qualificações, a fim de gerar células de grau farmacêutico e medicamentos com qualidade, eficácia e segurança.

O INCQS, que já realiza os testes de controle de qualidade nas vacinas de Bio-Manguinhos e está física e administrativamente próximo a ele, é um grande parceiro em potencial para prestar mais serviços como os testes de caracterização dos bancos celulares. No entanto, todos os outros centros pesquisados são interessantes possibilidades para parcerias com Bio-Manguinhos, tanto para etapas de (co)desenvolvimento de projetos, execução de testes (conforme resumido na tabela 4.9), validações e qualificações.

4.1.2. Cenário internacional

Os pesquisadores contatados indicaram os seguintes fornecedores de linhagens, reagentes e apoio em geral (o que inclui testes nos bancos de células) para suas atividades de pesquisa, desenvolvimento e produção na área de cultivos celulares. Os centros seguem listados em ordem alfabética, excluindo os bancos ATCC, ECACC e DSMZ, que já foram descritos na seção 1.2. Em seus *websites*, diversos centros afirmam seguir as BPF para a atividade de estabelecimento de bancos de células.

4.1.2.1 BioReliance Limited

Esta empresa possui unidades nos EUA (*Rockville*), Reino Unido (*Glasgow* e *Stirling*) e Japão (Tóquio). Ela realiza os seguintes testes de identidade: isoenzimas, cariologia, DNA *fingerprinting* e RAPD (*random amplified polymorphic DNA* – DNA polimórfico amplificado de forma randômica). Os muitos testes de pureza incluem microscopia eletrônica de transmissão, esterilidade por inoculação direta, filtração com membrana e transferência direta; micoplasmas por cultivo, células indicadoras e PCR quantitativo; vírus específicos por PCR, ensaios de co-cultivo, testes *in vitro* e *in vivo*, micobactéria por inoculação direta, e retrovírus por microscopia, pesquisa por transcriptase reversa, PCR do genoma e infectividade. Estão disponíveis também testes de tumorigenicidade e oncogenicidade. Por fim, a estabilidade é monitorada pelo sequenciamento genético, estabilidade genética e do inserto.

De acordo com as informações disponíveis na seção de literatura de sua página na internet, a empresa afirma que gera os BCMs e BCTs em condições de BPF, o que inclui a manipulação das culturas em fluxo unidirecional ISO 5 (classe 100), dentro de uma sala limpa ISO 7 (classe 10.000), ou seja, em um ambiente grau C. Isto é importante pois demonstra a possibilidade de realizar tal manipulação segundo esta configuração de salas classificadas, em vez do que se exige para envase e conexões assépticas na produção de medicamentos biológicos (requerimento de operação em fluxo laminar grau A, cercado por ambiente grau B). A configuração “A circulado por C” é equiparável ao requerimento para envase de produtos submetidos a esterilização terminal, e pode apresentar menor dificuldade para instalação, operação e qualificação. Tal disposição condiz com o documento da OMS (2011) e com a proposta da presente dissertação.

4.1.2.2 Charles River Laboratories International, Inc.

Esta empresa sediada em *Massachusetts* (EUA) foi indicada como referência para o preparo, armazenamento e caracterização de bancos celulares. Sua página eletrônica informa que a empresa estabelece bancos em condições BPF a partir de linhagens germinais, bem como de mamíferos, micróbios, insetos, leveduras e aves.

Os testes passíveis de contrato investigam a identidade, pureza e estabilidade das culturas. A verificação da autenticidade engloba isoenzimas, cariótipo e DNA *fingerprinting*. A segurança é averiguada através de testes de esterilidade, micoplasma, microscopia

eletrônica, ensaios de produção de anticorpos, pesquisa por retrovírus, ensaios *in vitro* e *in vivo*, e ainda PCR para vírus humanos, símios, porcinos e bovinos.

Através de contato por correio eletrônico, questionando sobre certificação quanto às BPF, a diretora de vendas esclareceu que esta empresa tem sido inspecionada pela FDA com frequência anual ultimamente, e que, além disso, estaria disposta a receber inspeção por outra Autoridade Sanitária. Adicionalmente, ela esclareceu que as operações assépticas com bancos de células são realizadas sob cabine de fluxo laminar grau A, circulado por ambiente de grau C, o que condiz com a proposta do presente trabalho.

4.1.2.3 Covance

Esta empresa está localizada em Nova Jersey (EUA) e disponibiliza o serviço de geração de BCMs e BCTs sob condições aderentes às BPF. As informações em sua *homepage* afirmam que ela possui uma licença de fabricação para produção de bancos celulares sob BPF, expedida pela Agência Reguladora de Medicamentos e Produtos para Saúde. Os bancos são preparados em salas limpas classificadas e validadas, com programas de limpeza e monitoramento ambiental. Há espaço para criopreservação das culturas e testes de viabilidade e estabilidade. A identidade das culturas é verificada por sequenciamento, número de cópias, mapa de restrição, isoenzimas, RAPD e cariologia.

A pesquisa por agentes adventícios inclui esterilidade, contaminação por micoplasma e espiroplasma (para linhagens derivadas de insetos). A contaminação viral é investigada por microscopia eletrônica, ensaios para vírus adventícios e retrovírus, bem como pelo uso de métodos específicos como a pesquisa por anticorpos e métodos moleculares.

4.1.2.4 Genibet Biopharmaceuticals

Esta empresa está localizada em Portugal e é especializada na produção e fornecimento de material para o desenvolvimento de medicamentos, estudos não-clínicos e atividades fabris em aderência às BPF. Segundo informações publicadas em sua *homepage*, uma unidade está em instalação, que será dedicada ao preparo de BCMs e BCTs de células de mamíferos, bem como de produtos para terapia gênica. Há espaço também para armazenamento das culturas e produção de células de insetos.

Esta empresa executa, junto com o IBET, as atividades e construção de sistemas de expressão, desenvolvimento de processos e desenvolvimento analítico.

4.1.2.5 Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET)

Trata-se de uma instituição privada portuguesa, que faz a interface entre diversos centros, academia e indústria em ramos da biotecnologia. As atividades realizadas com células animais incluem o estabelecimento de linhagens, desenvolvimento de processo (inclusive etapas de escalonamento, *downstream*, estabilidade e preservação) para obtenção de proteínas recombinantes e vacinas virais. Além disso, também há pesquisa nas áreas de terapia gênica e celular.

4.1.2.6 Invitrogen

Esta empresa foi apontada, durante a análise dos questionários, como um importante contato para o comércio de linhagens celulares no Brasil, que incluem clones da linhagem 293 e de CHO. Em particular, o clone CHO DG44 foi estabelecido sob condições BPF e é destinado ao crescimento em suspensão.

4.1.2.7 Lonza

Apontada no retorno dos questionários como referência para comércio de culturas celulares, esta empresa desenvolve linhagens e processos, especialmente para obtenção de anticorpos monoclonais e outras proteínas recombinantes em células de mamíferos, usando células CHO e NS0. De acordo com as informações disponibilizadas *on-line*, os bancos mestre e de trabalho são gerados em uma planta BPF licenciada no Reino Unido.

4.1.2.8 Perkin Elmer

Esta empresa foi apontada no retorno dos questionários como parceira para comércio de linhagens. Outras atividades anunciadas em seu *website* incluem testes de citogenética, análise e sequenciamento de DNA, bem como uma ampla variedade de reagentes laboratoriais.

4.1.2.9 Sigma-Aldrich

Também apontada como referência para o comércio de linhagens, esta empresa trabalha junto com a ECACC e oferece culturas de células de anfíbios, humanos, de insetos, peixes, camundongos e tumores, dentre outras.

A tabela 4.11 apresenta o resumo das atividades desenvolvidas com culturas de células, bem como o *status* regulatório, de cada uma das empresas pesquisadas no exterior.

Tabela 4.11: Resumo das atividades realizadas com cultivos celulares e *status* regulatório dos centros internacionais investigados

Centro	Atividade	<i>Status</i> regulatório
<i>BioReliance Ltd.</i>	Produção e caracterização de bancos	Condições de BPF
<i>Charles River</i>	Produção e caracterização de bancos	Condições de BPF
<i>Covance</i>	Produção e caracterização de bancos	Condições de BPF
<i>Genibet Biopharmaceuticals</i>	Pesquisa e desenvolvimento de atividades fabris	Aderência às BPF
IBET	Pesquisa, produção de bancos	(*)
<i>Invitrogen</i>	Pesquisa, produção e comercialização de bancos	Condições de BPF
<i>Lonza</i>	Pesquisa, produção e comercialização de bancos	Planta licenciada com BPF
<i>Perkin Elmer</i>	Comércio e caracterização de linhagens	(*)
<i>Sigma-Aldrich</i>	Comércio de linhagens	(*)

(*) Não foi possível detectar esta informação através da pesquisa eletrônica.

Em suma, a maioria dos centros internacionais pesquisados (6 dentre os 9, ou 66,7%) por via eletrônica afirma estabelecer bancos de acordo com as Boas Práticas de Fabricação. Este é um contraste com os centros brasileiros investigados, que em sua maioria se dedicam à pesquisa e desenvolvimento usando culturas de células, e não exibem condição atual para

estabelecer bancos celulares em aderência às BPF, visando à produção de medicamentos biológicos.

4.2 Produtos biológicos registrados

Conforme esperado, foram encontrados muitos exemplos de biofármacos produzidos em células CHO (tabela 4.7); as linhagens de Vero e MRC-5 (tabela 4.8) são usadas na fabricação de algumas vacinas virais.

Tabela 4.12: Exemplos de vacinas obtidas em células Vero e MRC-5 registradas no Brasil

Vacina	Célula	Detentor do registro (data do registro no Brasil)
Tríplice viral (rubéola)	MRC-5	Bio-Manguinhos (16/01/04)
Vacina contra raiva	Vero	Instituto Butantan (05/05/04)
Vacina influenza A (inativada)	Vero	Baxter Hospitalar Ltda. (11/05/10)

Tabela 4.13: Exemplos de biofármacos obtidos em células CHO registrados no Brasil

Medicamento	Substância ativa	Indicação terapêutica	Detentor do registro (data de registro no Brasil)
Advate®	Fator VIII de coagulação humano recombinante (alfaocotocogue)	Hemofilia A	20/07/2009
Avastin®	Bevacizumabe (IgG1 monoclonal humanizado contra fator de crescimento de endotélio vascular)	Carcinoma de colo, reto, mama e pulmão	16/05/2005
Campath®	Alemtuzumabe (anticorpo monoclonal humanizado)	Leucemia linfocítica crônica	10/04/2006
Enbrel®	Etanercepte (proteína de Fusão IgG1 e TNFr)	Artrite reumatóide	25/03/2003
Fabrazyme®	α -galactosidase (agalsidase β ou betagalsidase)	Doença de Fabry	19/04/2005
Gonal-F®	Hormônio folículo-estimulante (ou alfa-folitropina)	Infertilidade feminina	23/12/1996
Herceptin®	Trastuzumabe (IgG1 monoclonal contra HER-2)	Câncer de mama	16/09/1999
Luveris®	Hormônio luteinizante (ou gonadotrófico)	Infertilidade feminina	06/09/2001
Mabthera®	Rituximabe (IgG1 quimérico contra CD20)	Linfoma não-Hodgkin, artrite reumatóide	29/06/1998
Myozyme®	α -glucosidase ácida	Doença de Pompe	03/12/2007
Naglazyme®	N-acetilgalactosamina 4-sulfatase (ou galsulfase)	Mucopolissacaridose VI (síndrome de Maroteaux-Lamy)	02/02/2009
Ovidrel®	Gonadotrofina (ou alfacoriogonadotropina)	Infertilidade feminina	11/07/2002
Pulmozyme®	DNase I (alfadornase)	Fibrose cística	25/08/1995
Rebif®	Betainterferona 1 A	Esclerose múltipla	23/08/1996
Recombinate®	Fator VIII da coagulação (recombinante)	Hemofilia A	23/12/1998
Recormon®	B-epoetina	Anemia	18/10/1991
Xolair®	Omalizumabe (IgG1 humanizado contra IgE)	Asma	07/10/2004

4.3 Testes de caracterização

Ao menos um dos bancos, o BCM ou o BCT, deve ser caracterizado de forma extensiva. Geralmente isto é feito no banco mestre, pois ele é representativo de todos os de trabalho, e então sobre ele recai o foco das possíveis contaminações adventícias, expressão de vírus endógenos e aspectos de estabilidade. Se o BCM não fosse caracterizado profundamente, os lotes de BCT teriam que passar pela longa bateria de testes por campanha para cada lote do produto; mas, em vez disso, podem sofrer controles de pureza, e outros mais limitados de identidade. De forma similar, a certificação exaustiva do BCM isenta o produto biológico terminado de passar por ensaios adicionais (ICH, 1997; FDA, 2010), como tumorigenicidade, oncogenicidade e teste para retrovírus. Em vez disto, tais ensaios podem se concentrar na identidade e atividade da molécula, com os aspectos de segurança incluindo apenas esterilidade, endotoxinas e outras impurezas.

O objetivo do programa de testagens é confirmar a identidade e pureza (caracterização), bem como a adequabilidade (qualificação) de um determinado substrato para o uso produtivo proposto. Esse programa deve ser definido levando em consideração diversos aspectos, como as propriedades e o histórico das células, as metodologias analíticas disponíveis (ICH, 1997), mas também o processo fabril.

4.3.1 Identidade das culturas

A autenticação de linhagens deve ser realizada, essencialmente, a fim de verificar a ocorrência de trocas e confusões ou contaminações cruzadas entre as linhagens (OMS, 2010). A identidade de uma cultura deve ser determinada, no mínimo, com a verificação da espécie de origem, sem contaminação interespecies, o que pode ser analisado pelo perfil de isoenzimas ou citogenética (técnicas cariológicas). Pode haver preocupação ainda com a contaminação cruzada intraespécie, um problema comum em laboratórios que manipulam várias linhagens de uma mesma espécie (Hay *et al.*, 2003).

Os dados necessários para caracterizar satisfatoriamente uma linhagem, diferenciando-a de outros tipos celulares, são inicialmente descritos com a origem das células (se adquiridas de laboratório ou coleção oficial) e a história da linhagem, contendo informações do doador do tecido/órgão e seu estado de saúde. Para células obtidas de animais, é importante registrar dados do animal como espécie, condições de criação, origem geográfica, idade, sexo,

presença de agentes patogênicos e estado fisiológico geral. A descrição morfológica também é um instrumento importante para tipos celulares aderentes (ICH, 1997). Os dados sobre a procedência incluem ainda registros sobre forma de isolamento, manutenção, checagens de contaminação, procedimentos de descontaminação, propriedades expressas, modificações genéticas, alterações espontâneas, observações experimentais e criopreservação (Freshney, 2010).

Durante o desenvolvimento e validação do processo de fabricação, devem ser avaliadas características relacionadas ao crescimento da cultura, a fim de assegurar a consistência da produção. Estão incluídos neste tema os testes para viabilidade, morfologia, tempo de duplicação celular, eficiência de clonagem (se aplicável) e homogeneidade. A avaliação morfológica deve ser realizada em todas as etapas, e as características de crescimento e a viabilidade só não precisam ser determinadas na semente celular, mas o devem ser no BCM, BCT e em células pós-produção (OMS, 2010).

4.3.1.1 Determinação da espécie de origem

Estudos de cariologia são muito úteis para linhagens diplóides, possibilitando a visualização do genoma total e a identificação no nível da espécie. Algumas linhagens têm marcadores cromossômicos específicos que permitem a identificação neste nível. O bandeamento G, por exemplo, é realizado pela análise do cariótipo após tratamento com Giemsa, uma técnica que requer muito trabalho laboratorial, mas identifica padrões cromossômicos com a visualização de inversões, deleções, translocações e marcadores (OMS 1998, Hay *et al.* 2003).

Análises padrão de células metafásicas podem não ter sensibilidade para detectar contaminação cruzada (OMS, 2010), mas podem determinar gênero, ploidia (número de pares de cromossomos homólogos) e estabilidade genética de forma não muito precisa (FDA, 2010). Isto é interessante para diferenciar células normais das transformadas (imortais), pois as últimas têm o número de cromossomos mais instável (Freshney, 2010). Para fins de classificação, é necessário consultar as publicações do *International Standard Committee on Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN), órgão que estabelece a terminologia e descrições dos rearranjos cromossômicos.

A análise de isoenzimas (ou isozimas) também permite a identificação no nível de espécie, com a vantagem de fornecer o resultado dentro de poucas horas. O método requer a

análise de um painel de 4 a 6 enzimas, geralmente incluindo lactato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase, nucleosídeo fosforilase e malato desidrogenase (OMS, 2010), verificando seu padrão de migração quando submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (FDA, 2010). Trata-se de um teste aplicável a culturas de origem animal ou humana (ICH, 1997), que avalia seu padrão bioquímico (OMS, 1998).

4.3.1.2 Análises genéticas

As abordagens genéticas que empregam ferramentas da biologia molecular são mais específicas e podem ser aplicadas em células humanas, levando à identificação no nível do indivíduo doador do tecido. Métodos de DNA *profiling* ou *fingerprinting* geram um “perfil” ou “impressão digital” deste ácido nucléico, com técnicas que analisam polimorfismos relacionados às repetições em tandem de número variável (*Variable Number of Tandem Repeats* ou VNTR), os quais tendem a ser únicos para cada organismo.

Os métodos iniciais se baseavam na pesquisa por polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou RFLP para *fingerprint*), um teste baseado na hibridização de sondas em *Southern Blotting*, pouco utilizado hoje porque demanda muito trabalho laboratorial. Atualmente são preferíveis protocolos que utilizam a PCR para amplificar determinadas sequências do DNA, como a análise de repetições pequenas em tandem ou *Short Tandem Repeats* (STR, um tipo de VNTR), que constitui um teste rápido para *profiling*. Podem ainda ser investigados múltiplos polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e *Exon Primed Intron Crossing PCR* (EPIC-PCR), sendo que este é um teste rápido e aplicável a células humanas ou não (OMS, 2010). DNA *fingerprinting* ou *profiling* são considerados os melhores métodos, visto que pesquisam marcadores únicos das células para acusar contaminações cruzadas (Freshney, 2010).

4.3.1.3 Outras abordagens

Há possibilidade de realizar testes adicionais para DNA e RNAm com base em técnicas de biologia molecular, bem como a pesquisa por proteínas específicas. A hibridização com sondas (*Southern Blotting*) pode investigar a presença de sequências genéticas marcadoras específicas e de genes repórteres, com o auxílio ou não de PCR para

amplificação do material. Os transcritos podem ser analisados também com o auxílio de sondas ou com a reação em cadeia da polimerase utilizando a enzima transcriptase reversa (RT-PCR). Por fim, as proteínas também são capazes de gerar uma impressão digital única pela análise de extratos celulares totais ou de membranas; no caso de enzimas, a atividade catalítica particular de determinados tipos celulares também pode ser estudada para fins de identificação (Freshney, 2010).

Outra possibilidade inclui a pesquisa sobre o padrão imunológico, como testes de HLA para células humanas (OMS, 1998). Esta tipagem fornece a identidade da célula (FDA, 2010), pois seu alto grau de polimorfismo constitui um marcador único. Além da pesquisa por esta classe de macromoléculas, uma série de outros marcadores antigênicos pode ser investigada por técnicas de imunofluorescência, ELISA ou com ação de enzimas (peroxidase, fosfatase), quando está estabelecida a relação de especificidade ao tipo celular testado. Por exemplo, métodos de imunohistoquímica, focados em antígenos da superfície celular, são aplicáveis na individualização de células hematopoéticas e outras, em função de seu grau de diferenciação. A imunocitoquímica, usando anticorpos contra componentes específicos do citoesqueleto e produtos de especializados em diferentes tipos celulares, pode identificar queratina em células epiteliais e melanina em melanócitos (Freshney, 2010).

4.3.1.4 Células modificadas geneticamente

Linhagens manipuladas para a produção de biotecnológicos, como proteínas de interesse terapêutico, são usadas para o estabelecimento de bancos e devem ser caracterizadas, inclusive quanto à expressão do inserto adicionado, e podem ser realizados testes adicionais no tipo celular parental, considerado neste caso como as células ainda não transfectadas com a sequência genética de interesse (ICH 1995, 1997). Etcheverrigaray e Kratje (2008), Rodrigues e Moro (2008) e a OMS (1991, 2010) indicam a necessidade por informações minuciosas sobre:

- caracterização da célula parental (linhagem hospedeira): origem, fonte, histórico, morfologia, meio de cultivo, cultivo de forma finita ou contínua, velocidade de crescimento, fenótipo e genótipo, método de transfecção e seleção;
- gene de interesse: origem, identidade e sequência; a sequência de nucleotídeos deve ser confirmada no banco mestre, mas exceções podem ocorrer quando há múltiplas

cópias do inserto integradas ao genoma do hospedeiro, caso em que pode-se determinar DNA celular total por *Southern Blot* ou RNA por *Northern Blot*, com especial atenção à caracterização da sequência peptídica do produto final; o sequenciamento do inserto e o mapa de restrição devem ser analisados no BCM e ao menos uma vez nas células após o processo fabril;

- vetor de expressão recombinante: sequência, integridade física, mapa de restrição com função das sequências presentes (incluindo sequências de regulação, resistência a antibióticos, expressão como proteína de fusão ou secretada), método de transformação/clonagem, localização na célula (integrado ou extracromossomial), número de cópias e de pontos de inserção, inserções e deleções;
- célula transfectada: estabilidade do sistema de expressão hospedeiro-vetor, percentual de células hospedeiras retendo o sistema de expressão (inserto localizado fora do cromossomo) e condições de armazenamento.

As linhagens modificadas geneticamente podem ser diferenciadas das suas células parentais, ou de outra linhagem por contaminação cruzada, através de *Southern Blotting*, PCR, crescimento em meio seletivo, expressão do gene de interesse ou de gene repórter (FDA, 2010).

A análise do constructo fornece informações sobre a estabilidade genética, e deve ser realizada no BCM e em células ao fim da produção. A fim de obter informações sobre a fidelidade translacional (síntese de RNAm) ou traducional (síntese protéica) de sua informação, ou sobre a estrutura secundária e terciária ou alterações pós-traducionais de uma determinada proteína recombinante, se faz necessária a análise do polipeptídeo sintetizado, uma etapa fundamental para avaliar a qualidade e consistência na produção de um biofármaco (ICH, 1995). Devem ser conferidas a sequência protéica (aminoácidos) e o nível de produtividade (OMS, 2010).

4.3.1.5 Programa de testes

Com relação ao programa de testagens, o ICH (1997) defende que a identificação pode ser fenotípica ou genotípica. Para fins de autenticação, seria adequado comprovar a espécie de origem ou a presença de um marcador celular único da linhagem. Neste sentido, seria suficiente a análise de isozimas, bandeamento (citogenética) ou o uso de anti-soro espécie-

específico; ou alternativamente, técnicas de citogenética por bandeamento para demonstrar a presença de um marcador cromossomial único, ou ainda análise de DNA (*fingerprinting*, RFLP, repetições de dinucleotídeos no genoma) para detectar um padrão individual de polimorfismo.

A FDA (1993) defende que a autenticidade deve ser demonstrada por características fenotípicas (como análise morfológica) e confirmação da espécie de origem. Freshney (2010) relatou que o padrão majoritário era o emprego de uma técnica de análise de DNA (*fingerprinting* ou *profiling*) junto com análise de isoenzimas.

Já a OMS (2010) defende que a testagem deve fornecer identificação específica da linhagem. Cariologia e isoenzimas devem ser analisados quando há marcadores cromossomiais específicos em células não humanas; contudo, quando há marcadores mais específicos, testes mais aprofundados devem ser considerados. É recomendada a verificação da identidade (por isoenzimas, marcadores citogenéticos e imunológicos, DNA *fingerprinting*) em todos os estágios pelos quais o substrato celular passa, ou seja, as células enquanto semente celular, BCM, BCT e ao fim da produção. Já o monitoramento do cariótipo poderia ser realizado apenas no BCM (ou BCT, se este for escolhido como foco da caracterização) e em células no fim do cultivo para produção. Linhagens diplóides que já se encontram satisfatoriamente estudadas, como MRC-5, WI-38 e FRhL-2 não modificadas geneticamente, só precisariam ser cariotipadas ao fim da produção, a fim de verificar sua estabilidade genética após exposição às condições da cultura.

No presente trabalho se defende que os bancos de células devem ser exaustivamente autenticados, no nível do BCM (ou a cada BCT) e ao fim da produção. Isto é especialmente aplicável às linhagens novas, mas também vale aquelas conhecidas, como no caso de Vero e MRC-5, fornecidas pela OMS como sementes celulares, com procedência determinada e certificação.

Cada produtor deve estabelecer cuidadosamente seu programa de caracterização, considerando as possibilidades de contaminação cruzada; porém, minimamente, uma técnica de confirmação de espécie deve ser realizada (cariotipagem, isoenzimas), em especial quando o laboratório manipular células de diferentes animais. Células diplóides devem ser cariotipadas no nível do banco e ao fim da produção. O ideal é que também seja realizado um teste genético, ou teste para outro marcador específico (imunológico, padrão cromossomial ou outro).

As linhagens humanas devem ser autenticadas com o emprego de uma técnica genética, como DNA *profiling* por STR. Os métodos cariológicos, bioquímicos e imunológicos não possuem poder discriminatório tão elevado a ponto de identificar, sem ambigüidade, um tipo celular no nível do indivíduo. Mas, de qualquer forma, se faz necessária a confirmação da espécie de origem, dado que STR geralmente reconhece células humanas apenas (Barallon *et al.*, 2010).

4.3.2 Segurança

Os seguintes itens podem ser avaliados acerca da segurança de uma cultura: vírus e retrovírus (inclusive sequências de seus genomas), outros contaminantes microbiológicos clássicos (bactérias, fungos, leveduras e micoplasmas) e seu potencial tumorigênico e oncogênico. É recomendado o teste em amostras com 10^7 células/mL (ou volume correspondente de lisado/sobrenadante).

Pode ser necessário investigar a contaminação por agentes como micobactérias (p.ex.: *Mycobacterium tuberculosis*) em células susceptíveis e espiroplasmas em células de inseto ou expostas a materiais derivados de plantas (OMS, 2010). Possíveis agentes adventícios incluem ainda *rickettsia*, protozoários e parasitas. Os métodos de detecção de agentes adventícios têm que ser validados, no que couber, e devem se basear no uso de estratégias múltiplas que se sobrepõem, a fim de abranger uma ampla variedade de contaminantes.

4.3.2.1 Importância de avaliar a pureza de cultivos celulares

A Organização Mundial da Saúde (OMS) destaca, nas afirmações de sua página sobre biológicos na internet, que células e tecidos bem caracterizados são empregados como substratos para obter produtos biológicos como vacinas e biofármacos, e que vêm gradativamente se impondo como produtos terapêuticos. Empregados como substratos para crescimento, a uniformidade e a isenção de agentes adventícios destes materiais é essencial. Como produtos terapêuticos, especialmente ao usar os avanços recentes da engenharia genética, eles podem prover intervenções muito mais direcionadas e compatíveis que as técnicas químicas e mecânicas disponíveis atualmente. Neste sentido, a confirmação da autenticidade de uma célula, sua inocuidade e a manutenção de seus atributos são de vital importância.

Houve um acidente desagradável em 1967, em meio a um momento de franca produtividade na área de cultura de células e tecidos, com relação à identidade de culturas de células. Devido a erros na manipulação, nas boas práticas e assepsia, células tumorais HeLa, que possuem grande capacidade proliferativa, contaminaram muitas outras linhagens em diversos centros. Apenas em 1977 se confirmou esta contaminação cruzada, a qual pode invalidar experimentos e resultados dos laboratórios. A partir deste ponto, os cientistas começaram a se preocupar com a autenticidade das células mantidas em seus laboratórios, bem como a dar mais atenção aos cuidados para prevenir tal acidente, a saber: não compartilhar garrafas de meios entre diferentes linhagens; evitar contato de pipetas com frascos de cultura e garrafas de meio; não compartilhar meios de cultura entre diferentes operadores; e manusear uma linhagem por vez (Freshney 2003, 2010).

Em termos históricos, contudo, a maior preocupação sempre esteve mais centrada na segurança dos produtos biológicos, tal qual a presença de contaminantes e dos próprios constituintes celulares (como ácidos nucleicos e proteínas), e os efeitos adversos que eles representam à saúde dos indivíduos expostos (ICH, 1997). Medicamentos biológicos podem transmitir doenças, como já ocorreu com infecções virais por HIV e hepatite B através de hemoderivados⁷; e os próprios substratos celulares podem conter agentes adversos introduzidos inadvertidamente (adventícios) ou intrínsecos, como alguns retrovírus integrados. Preocupações relativas à segurança viral incluem a presença de SV40 em vacinas contra pólio e retrovírus aviário endógeno em vacinas obtidas em ovos embrionados. Questões também são debatidas sobre o risco da presença de príons e da pureza de novos substratos para vacinas, conforme consta no endereço eletrônico da FDA.

A prevenção contra o vírus da poliomielite, causador da paralisia infantil, é estimulada pela imunização com a vacina na forma atenuada (contendo o vírus vivo, administrada por via oral) ou inativada – composta pelo vírus morto. O processo fabril desta última inclui o uso de formalina para inativar o patógeno, gerando um produto injetável. No entanto, mesmo com esta etapa no processo, foi descoberta a contaminação deste produto pelo SV40, um vírus símio identificado apenas em 1960, o que levantou preocupações sobre o risco teórico do desenvolvimento de câncer em humanos. Com o acompanhamento, foi visto que, embora os sujeitos do ensaio clínico que receberam o produto contaminado tenham soroconvertido ao SV40, não houve evidências do desenvolvimento de malignidades em decorrência desta

⁷ A OMS relembra tais eventos em seu documento de 2010, e expressa sua preocupação na parte sobre qualidade e segurança de biológicos (em seu *site*).

exposição – mas, mesmo assim, foi desenvolvida uma nova versão da vacina, com materiais de partida isentos desse contaminante.

Algumas vacinas obtidas através da replicação viral em ovos embrionados também exibiram problemas relativos à pureza. Os métodos analíticos usados inicialmente não detectavam contaminações nas vacinas derivadas destes modelos animais; contudo, com o advento de uma técnica em 1996, que pesquisa a transcriptase reversa com maior sensibilidade (PERT), foi demonstrada a presença do retrovírus aviário endógeno (EAV). Os estudos de acompanhamento demonstraram que EAV é um vírus defeutivo produtor de partículas não infecciosas em culturas de células, uma evidência confirmada pelo histórico de segurança do uso de vacinas geradas nesta plataforma.

Outro importante exemplo sobre a importância da caracterização e pureza das células usadas na produção de medicamentos biológicos ocorreu recentemente. Em fevereiro de 2010, a empresa GlaxoSmithKline Biologicals (GSKBio) foi informada por um pesquisador sobre a descoberta, usando técnicas de PCR, de sequências de DNA do circovírus porcino tipo 1 (PCV-1) em 2 lotes de sua vacina contra o rotavírus (Rotarix®, atenuada e oral). Esta descoberta inesperada causou grande preocupação no meio regulatório e na classe médica, pois compromete a segurança destas vacinas, as quais são amplamente usadas para prevenir a infecção pelo maior causador de gastroenterites em crianças.

A GSKBio conduziu experimentos e confirmou a presença de PCV-1 nos intermediários do processo de produção, no banco de células de trabalho (células Vero), na semente viral que derivou a vacina e no recipiente final. A própria FDA conduziu ensaios e também detectou o contaminante na vacina. Em 03/2010, a Autoridade Americana recomendou a suspensão temporária do uso das vacinas contra o rotavírus, inclusive a Rotateq® (também atenuada e por via oral), produzida pela empresa Merck. Após análises desta empresa e da FDA, foram identificados fragmentos genéticos correspondentes às cepas PCV-1 e 2 na Rotateq®⁸.

A partir deste momento, foi realizada uma grande avaliação do risco para se chegar ao consenso sobre o uso dessas vacinas. Ambas as cepas são compostas por vírus pequenos de DNA fita simples. O PCV-1 é comumente encontrado em suínos, mas não é patogênico a eles nem ao homem; a cepa PCV-2 foi reconhecida em 1997, sendo enquadrada como causador de doença letal em suínos, mas não há evidências de que possua a capacidade de infectar nem de

⁸ A discussão científica realizada pela Autoridade Americana está exposta em sua *homepage*.

causar doença no homem. Houve dados clínicos mostrando que estes vírus não se replicam no intestino, nem levam à formação de anticorpos quando aplicados no homem.

Uma investigação sobre a implicação do uso continuado da vacina foi conduzida. A avaliação de risco levou em consideração os dados dos ensaios clínicos e de farmacovigilância para ambas as vacinas desde seu registro, os quais não justificaram grande preocupação quanto à segurança até o momento. Ao fim, foi considerado que os benefícios ultrapassam os riscos relativos ao seu uso nos programas de vacinação, dada sua grande importância na redução de casos da doença; mas foi exposta a necessidade de maior caracterização dos substratos e materiais de partida (com relação à detecção de contaminação por agentes adventícios), usando métodos emergentes e mais sensíveis.

Fazendo uma análise laboratorial e considerando aspectos históricos, foi demonstrado que as células Vero são muito susceptíveis à infecção pelo PCV-1. A descoberta de culturas destas células contaminadas na ATCC ocorreu em 1974, e existe a possibilidade de que tal fato se deva ao uso de tripsina porcina contaminada com o vírus, visto que somente em 1995 se começou a tratar esta enzima com radiação ultravioleta.

A vacina inativada, por outro lado, teria algumas vantagens sobre as que contêm o vírus vivo. Suas etapas de inativação, necessárias para gerar o princípio ativo, também teriam a possibilidade de inativar PCV ou outros agentes adventícios, desde que devidamente comprovado por validação de processo, e isto aumenta a segurança do uso do produto. Os resultados discutidos pela FDA indicam que para o produto inativado, foram detectadas sequências do vírus no banco de células, na semente viral e no estágio da coleta, porém não no recipiente final, fortalecendo a idéia de que o contaminante presente no início foi inativado ao longo das etapas fabris.

Fica evidente, com a exposição destes casos, que a avaliação do risco presente em um medicamento biológico deve ser realizada levando em consideração a certificação dos bancos de células (incluindo demais insumos, reagentes e matérias biológicas de partida), e a validação do processo de fabricação, dado que este pode conter etapas de redução (remoção/inativação) de agentes contaminantes. A produção de novos substratos celulares deve considerar os riscos relativos ao fenótipo tumorigênico (em especial de linhagens contínuas), infectividade teórica (como pela contaminação por príons) e a possibilidade de ação oncogênica de materiais como DNA, proteínas ou vírus presentes nas células. A

evolução dos testes para detecção de vírus em produtos como vacinas evoluiu com o tempo, aproximadamente recapitulando o próprio histórico de descoberta dos vírus⁹.

4.3.2.2 Vírus

É comum encontrar bancos de células antigos que foram estabelecidos sem caracterização dos reagentes derivados de animais, como aqueles de origem bovina e porcina. Neste caso, se faz necessária a testagem destes substratos para a presença de patógenos virais que reconhecidamente infectam tais espécies, levando em conta os métodos de isolamento e detecção disponíveis, através de testes em células do fim da produção (OMS 2009, FDA 2010). Como exemplo, a tripsina derivada de porcos pode conter agentes adventícios e parvovírus (Etcheverrigaray e Kratje, 2008). Contaminações virais são majoritariamente introduzidas pelo uso de soro fetal bovino, e causam mudanças na taxa de crescimento das células em cultura (Léo *et al.*, 2008). Quando necessário, como no momento de pesquisar a presença de agentes infecciosos em uma suspensão contendo o vírus vacinal, deve-se neutralizar o mesmo, por exemplo, pelo uso de anticorpos (FDA, 2010).

Os diversos tipos de células usadas apresentam diferentes painéis de vírus potencialmente presentes e patogênicos a seres humanos, dependendo da origem e estado de saúde do organismo originário, dos eventuais vírus usados para imortalizar uma linhagem contínua, ou ainda dos reagentes e da manipulação quando do estabelecimento do banco celular (ICH, 1999). Estes microorganismos podem constar como virions inteiros, partículas visualizáveis por microscopia eletrônica, ou na forma de sequências genéticas (ou partes destas) persistentes e integradas ao genoma hospedeiro, e sua expressão pode ser ativada sob as condições do cultivo em biorreator. Os bancos de linhagens diplóides e contínuas devem, portanto, ser bem caracterizados quanto à presença, sequência de nucleotídeos e marcadores virais possíveis, através de testes em três modalidades: com o uso de culturas de células, com a inoculação em animais e ovos (ensaios *in vivo*), e pela pesquisa por retrovírus e vírus endógenos.

No primeiro caso, os lisados celulares e/ou o meio de cultura gasto, ou ainda as células intactas da amostra, são usados para inoculação direta ou para co-cultivo, respectivamente, pela adição a culturas de células indicadoras. Estas são apresentadas em monocamadas (OMS

⁹ As preocupações relacionadas à pureza de matérias de partida biológicas estão descritas em uma apresentação do FDA disponível em sua página na internet.

1998, ICH 1999) de células dos bancos ou do fim da produção, e permitem a detecção de várias famílias virais com atividade citopática, hemadsorvente e hemaglutinante. As células indicadoras devem contar com ao menos:

- uma cultura primária ou contínua derivada da mesma espécie e tecido que o substrato usado na produção;
- uma cultura de linhagem diplóide humana, especialmente para a detecção do vírus do sarampo;- uma cultura de rim de macaco, para a detecção de vírus símios, especialmente se o substrato celular empregado na produção for de origem humana;

Devem ser usadas 10^7 células (ou o volume correspondente de lisado ou meio, ou ainda o volume equivalente a 500 doses ou 50 mL do granel ou coleta viral) em cada cultura indicadora, com observação para efeitos citopáticos por ao menos duas semanas, e, opcionalmente, o sobrenadante pode ser inoculado novamente em culturas frescas para observação adicional por outras duas semanas, bem como mais ensaios para hemaglutinação e hemadsorção.

Os testes supracitados devem ser realizados com o sobrenadante das culturas após o período de observação dos efeitos citopáticos. As hemácias usadas devem ser derivadas de galinhas, cobaias e macacos ou humanas do tipo O.

Quando houver susceptibilidade do substrato e suspeita de contaminação por citomegalovírus humano ou símio, as culturas indicadoras de células diplóides humanas devem ser observadas por no mínimo quatro semanas. Alternativamente, este método *in vitro* pode ser substituído por PCR.

Os agentes adventícios detectáveis por esse ensaio incluem os seguintes vírus humanos em culturas diplóides: adenovírus, alfavírus, coronavírus, enterovírus (como poliovírus, ecovírus e coxsackievírus B), flavivírus, certas cepas de hepatite A, herpesvírus (como herpes simplex, varicela zoster e citomegalovírus), ortomixovírus, paramixovírus, raiva, reovírus, alguns rinovírus e rubéola (FDA 2010, OMS 2010) e SCMV. Os seguintes agentes infecciosos humanos podem ser pesquisados em células Vero: algumas cepas de adenovírus, alfavírus, arenavírus, bunyavírus (como flebovírus e nairovírus), enterovírus (como pólio, coxsackie B e ecovírus), filovírus, flavivírus, herpes simplex, influenza, ortomixovírus, paramixovírus, poliomavírus, poxvírus, raiva, reovírus, rinovírus, rotavírus, rubéola e vesiculovírus; e herpes B símia (FDA, 2010).

A pesquisa por vírus de insetos deve ser realizada em adição aos testes anteriores, quando esse substrato celular for adotado na produção. Possíveis contaminantes incluem os arbovírus, organismos transmitidos por artrópodes como os mosquitos, e que são potencialmente patogênicos ao homem.

Os protocolos disponíveis exibem algumas diferenças. A Agência Americana indica a pesquisa por diversas famílias de agentes virais específicas em culturas de células de insetos, bem como BHK21, susceptível aos arbovírus. Já a Organização recomenda a prévia indução do substrato, e o uso de três tipos de células-controle: uma permissiva ao crescimento de arbovírus humanos; outra permissiva ao crescimento de vários tipos de vírus de insetos; e uma última derivada da mesma espécie do substrato celular. O ensaio em células BHK21 é citado como método alternativo ao teste em células de mosquito susceptíveis a arbovírus humanos.

Os testes com células indicadoras são inespecíficos e têm a limitação de que nem todos os agentes virais são cultiváveis nas células escolhidas (OMS 1998, ICH 1999). No entanto, o método pode ter sua sensibilidade aumentada dada a possibilidade de inocular uma grande quantidade da amostra (FDA, 2010).

Animais vivos são excelentes para detectar a presença viral, pois a replicação é fácil nesse ambiente, e um resultado positivo para sua presença reprova a amostra analisada. Testes *in vivo* podem incluir camundongos, porquinhos-da-índia (cobaias) e coelhos, que devem ser observados por algumas semanas para detectar o desenvolvimento de complicações (OMS, 1998); e ovos embrionados são tão sensíveis à replicação viral que são adotados como padrão ouro em virologia. O lisado celular e o meio de cultura inoculados permitem a detecção de vários patógenos humanos, desde que os mesmos consigam se replicar e causar doença nos modelos animais testados (ICH, 1999). Estes métodos são capazes de detectar vírus que inicialmente não são evidenciados por outros sistemas, mas possuem as limitações de que¹⁰: (a) a sensibilidade é desconhecida com relação às cepas selvagens, visto que os métodos foram estabelecidos com cepas adaptadas a laboratório, e (b) muitos vírus patogênicos aos seres humanos não infectam nem se replicam em roedores e ovos.

Testes em camundongos adultos são usados para detecção do vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV, da sigla em inglês), coxsackievírus (A e B), flavivírus e o vírus da raiva. Aplicáveis no banco mestre ou de trabalho, e também em células cultivadas até o fim da produção (ou um pouco além), para culturas primárias, diplóides e contínuas. É realizada inoculação em camundongos pesando entre 15-20g, com 0,5 mL pela via intraperitoneal e

¹⁰ Conforme apresentação do FDA sobre seu próprio guia, disponível em sua *homepage*.

0,03 mL pela intracerebral. Há diferenças nos protocolos analisados, conforme exposto abaixo.

Tabela 4.14: Diferenças entre os métodos da OMS e FDA para testes em camundongos adultos

Aspecto considerado	OMS	FDA
Protocolo	Ao menos 10 animais são observados por 1 mês e investigados em caso de anormalidades. Os que morrem devem ser examinados por (histo)patologia e, se for indicada infecção viral, esta deve ser investigada por cultura ou método molecular.	Ao menos 20 animais são observados por 21 dias; os que morrem devem ser investigados para infecção viral, e seu tecido deve ser homogeneizado e inoculado em 5 camundongos adicionais, que são observados por mais 21 dias.
Critério de aceitação	80% dos camundongos dos grupos teste e controle negativo não podem morrer por causa inespecífica, para que o ensaio seja válido.	80% dos animais sobrevivem de forma saudável sem evidência de agente transmissível ou infecção.

De qualquer forma, é importante que o ensaio inclua controles positivo e negativo, isto é, grupos com número de camundongos igual ao testado, porém um sendo inoculado com padrão de vírus (controle positivo) e outro grupo inoculado com material sem contaminantes, como solução salina estéril (controle negativo).

O uso de camundongos neonatos (“*suckling mice*”) é de grande valia. Este ensaio *in vivo* é capaz de indicar a infecção por coxsackievírus (tipos A e B, sendo que o B também é detectável em cultura de células), picornavírus como poliovírus e ecovírus, alfavírus, bunyavírus como flebovírus e nairovírus, arenavírus, flavivírus, raiva, herpesvírus como herpes simplex, coriomeningite linfocítica e diversos vírus murinos.

As células devem ser inoculadas, sendo 0,1 mL pela rota intraperitoneal e 0,01 mL pela intracerebral, em filhotes com menos de 24 horas de vida. Devem ser usados grupos controle para garantir a validade do ensaio. As diferenças existentes entre os guias são resumidas abaixo.

Tabela 4.15: Diferenças entre os métodos da OMS e FDA para testes em camundongos neonatos

Aspecto considerado	OMS	FDA
Protocolo	Ao menos 10 animais são observados por 1 mês e investigados em caso de anormalidades. Os que morrem devem ser examinados por (histo)patologia e, se for indicada infecção viral, esta deve ser investigada por cultura ou método molecular.	Ao menos 20 animais são observados por 14 dias; os que morrem devem ser investigados para infecção viral, e seu tecido deve ser homogeneizado e inoculado em 5 camundongos adicionais, que são observados por mais 14 dias. Há uma passagem cega adicional, com tecido homogeneizado dos animais sobreviventes em 5 novos camundongos.
Critério de aceitação	80% dos camundongos de todos os grupos devem sobreviver, para que o ensaio seja válido.	80% dos animais sobrevivem de forma saudável sem evidência de agente transmissível ou infecção viral.

Ensaio em cobaias (“porquinhos-da-Índia”) são complementares nos documentos da OMS e FDA. São empregados a fim de detectar a presença principalmente de espécies de micobactéria (em especial *Mycobacterium tuberculosis*), mas também LCMV, paramyxovírus (como Sendai), reovírus e filovírus, a partir de células do BCM ou BCT; células do fim de produção devem ser testadas uma vez por processo (e não a cada BCT).

Cinco porquinhos-da-índia por grupo (incluindo os grupos controle), pesando entre 350-450g, devem ser inoculados com células viáveis em 5 mL pela via intraperitoneal e 0,1 mL pela rota intracerebral. Os animais devem ser monitorados para anormalidades diariamente por 42 dias. Os animais que morrem devem ser examinados por (histo)patologia e, se houver indício de infecção viral, é recomendável identificar o agente por métodos de cultura e/ou moleculares. Para a validade do ensaio, mais de 20% dos animais devem sobreviver nos grupos teste e controle negativo; o critério de aprovação da amostra pressupõe que 80% das cobaias sobrevivam de forma saudável, e que nenhum apresente sinal de contaminação por agente transmissível ou infecção viral.

Como a pesquisa por *Micobacterium* pode ser realizada por métodos alternativos *in vitro*, com o uso de cultura ou PCR, devidamente validados, estes testes devem ser preferíveis, a menos que haja forte justificativa para manutenção do ensaio *in vivo*.

Os protocolos da OMS e FDA estão harmonizados para o teste em coelhos. A fim de detectar a presença do herpesvírus B em culturas primárias de macaco, é realizada inoculação de 1 mL pela via intradérmica (múltiplos locais) e ao menos 2 mL pela via subcutânea, com células divididas igualmente entre cinco coelhos (por grupo) pesando entre 1,5-2,5 Kg. Os animais são observados diariamente por um mês para anormalidades; os que morrem devem

ser examinados por (histo)patologia e, se houver indício de infecção viral, é recomendável identificar o agente por métodos de cultura e/ou moleculares. Para a validade do ensaio, mais de 20% dos animais devem sobreviver nos grupos teste e controle; o critério de aprovação da amostra pressupõe que 80% dos coelhos sobrevivam de forma saudável, e que nenhum apresente sinal de contaminação por agente transmissível ou infecção viral.

A Organização destaca que este ensaio pode ser substituído pelo teste em cultura celular contínua de rins de coelho. Neste sentido, a detecção do vírus herpes B em células símias primárias deve ser realizada pelo método *in vitro*, a não ser que haja forte justificativa para o uso do ensaio *in vivo*.

Um modelo animal muito empregado se baseia no teste em ovos embrionados de galinha. O material testado deve ser derivado de culturas primárias, diplóides ou contínuas de células aviárias e de novos substratos celulares. A suspensão é aplicada em ao menos 10 ovos embrionados por grupo e posteriormente recolhida; é verificada sua atividade hemaglutinante em hemácias de cobaia, galinha ou outra espécie aviária (OMS, 2010) e tipo O humana. A inoculação ocorre por duas vias a fim de detectar a presença de vírus distintos: a via alantóica revela a infecção por ortomixovírus (influenza), paramixovírus (sarampo, caxumba e parainfluenza como o vírus Sendai), alfavírus e vesiculovírus; a injeção no saco vitelínico detecta a presença de herpesvírus, poxvírus, rabdovírus, bem como outros agentes adventícios como *rickettsia*, micoplasma e bactérias (FDA, 2010).

Os guias da FDA e da OMS sugerem diferentes métodos, conforme exposto a seguir de forma comparativa.

Tabela 4.16: Diferenças entre os métodos da OMS e FDA para testes em ovos embrionados

Aspecto considerado	OMS	FDA
Inóculo	10 ⁶ células do final da produção (ou volume equivalente de seu lisado), derivadas do BCM ou BCT	10 mL ou volume equivalente a 100 doses (o que for de maior volume)
Idade dos ovos	5-7 dias para via do saco vitelínico; 9-11 dias para via da cavidade alantóica	6-7 dias para via do saco vitelínico; 10-11 para via da cavidade alantóica
Protocolo	Os ovos inoculados são incubados por 5 dias; o fluido coletado é incubado com eritrócitos e a leitura é feita após 30 minutos entre 0-4°C, novamente após 30 minutos entre 20-25°C; e adicionalmente, para hemácias de macacos, após 30 minutos entre 34-37°C.	Para a via alantóica, os ovos são inoculados com 0,5 mL da amostra, incubados por 3 dias a 35°C e testados. O material coletado é testado novamente da mesma forma em ovos novos. Para a via do saco vitelínico, os ovos são incubados por ao menos 9 dias a 35°C, e o procedimento também é repetido em ovos novos.
Critério de aceitação	- 80% dos embriões de qualquer grupo não podem ser descartados, por razões inespecíficas, para que o ensaio seja válido - sem evidência de agentes virais	- 80% dos embriões com aparência normal - sem evidência de agentes virais ou hemaglutinantes

Conforme exposto, os critérios de aceitação do substrato avaliado diferem entre os documentos, e apenas a OMS destaca um critério para validade do ensaio. Neste sentido, também é importante adotar grupos-controle com igual número de ovos embrionados; e é desejável que os ovos sejam livres daqueles patógenos específicos (SPF) investigados nesta metodologia.

A Organização ainda chama atenção à necessidade de se investigar, por exame patológico, a causa da morte dos embriões com evidência de infecção viral, e que a identificação destes agentes pode envolver métodos com cultura e/ou moleculares.

O último teste em modelo animal se refere à produção de anticorpos. Estes ensaios *in vivo* detectam uma ampla gama de patógenos espécie-específicos, em especial para células de roedores como *hamsters*, camundongos e ratos, mas também podem ser aplicáveis a células de galinhas, e a culturas que possam ter sido expostas a agentes de roedores. São considerados testes específicos, e devem ser realizados nos bancos ou células ao fim da produção de culturas primárias, diplóides e imortalizadas, em animais SPF. Os agentes detectados pelo ensaio incluem:

- Produção de anticorpos em *hamster* (HAP, da sigla em inglês): LCMV, vírus da pneumonia de *hamster* (PVM), reovírus tipo 3 (Reo3), Sendai e vírus símio 5 (SV5)
- Produção de anticorpos em ratos (RAP): vírus Hantaan, vírus de rato Kilham (KRV), LCMV, adenovírus murino, vírus da encefalomielite murina (Theilers, GDVII), PVM, coronavírus do rato (RCV), Reo3, vírus sialodacryoadenite (SDAV), Sendai e vírus Toolan (HI).
- Produção de anticorpos em camundongos (MAP): vírus ectromelia, rotavírus murino (EDIM), vírus Hantaan, LCMV, vírus da desidrogenase láctica (LDM), vírus minuto murino (MVM), adenovírus murino (MAV), citomegalovírus murino (MCMV), vírus da encefalomielite murina (Theilers, GDVII), hepatite murina (MHV), PVM, polioma, Reo3, Sendai, vírus tímico e vírus K.

Métodos de PCR podem ser usados, desde que devidamente demonstrada sua sensibilidade; esforços para desenvolver tais métodos moleculares são interessantes para a redução do uso de animais nestes testes de controle de qualidade (OMS 1998, 2010, FDA 2010).

A microscopia eletrônica de transmissão é um método inespecífico e de baixa sensibilidade, usado para detectar vírus e retrovírus endógenos, bem como partículas semelhantes a vírus e agentes adventícios de vários tipos (ICH, 1999). A morfologia pode ajudar na identificação do tipo de contaminante. É, portanto, um método qualitativo, e um resultado positivo leva a testes adicionais, como infectividade e PCR. A microscopia de transmissão pode também ter aplicação quantitativa, estimando a concentração de partículas virais, a fim de gerar dados de suporte à validação da redução viral. Pode ser apropriada a aplicação de um pré-tratamento nas culturas, com substâncias químicas ou indutoras, visando estimular a produção dos vírus latentes ou endógenos. O protocolo envolve a análise por coloração negativa de cortes ultrafinos (FDA, 2010) de 200 células, sejam elas diplóides ou contínuas. Os bancos podem ser testados, mas células do fim da produção (ou cultivadas um pouco além) devem ser investigadas, pois estas foram expostas às condições de cultivo que podem induzir a expressão de partículas virais. Células de insetos podem precisar passar por variações de temperatura, indução química e análise de mais células para a avaliação por este método (OMS, 2010).

Retrovírus, vírus endógenos – aqueles com genoma covalentemente integrado ao da célula hospedeira -, vírus latentes ou persistentes (como o herpesvírus em células humanas) e

ácidos nucléicos virais podem ser propagados verticalmente, de uma geração celular a outra, tendo a chance de ser expressos de forma constitutiva ou inesperada sob as condições de cultura (ICH, 1999). A infecção por retrovírus não está obrigatoriamente relacionada ao aparecimento de efeitos citopáticos em células indicadoras, logo se faz necessária a utilização de métodos como microscopia eletrônica de transmissão, ensaio para transcriptase reversa aprimorada pelo produto (PERT), PCR ou outros testes *in vitro* específicos e ensaios de infectividade. Devem ser examinadas células do BCT ou BCM cultivadas até o fim de sua vida no processo fabril (OMS, 2010).

Ensaio para transcriptase reversa podem ser realizados com células de animais (como mamíferos) e insetos, obtidas do BCM ou BCT cultivado até o fim de produção (ou o sobrenadante destas culturas), devem ser testadas por PCR ou PERT. É possível adotar uma etapa de estresse para induzir a transcrição das sequências retrovirais integradas ao genoma da célula hospedeira. Por se tratar de um método com alta sensibilidade, há chance de serem gerados resultados falso-positivos; neste sentido, um resultado positivo pode não ser conclusivo, sendo importante adotar controles (positivo e negativo), bem como avaliar a performance (pelos parâmetros de limite de quantificação, especificidade e reprodutibilidade) para a validade do ensaio. O método para transcriptase reversa e o de infectividade se complementam, dado que os resultados (possivelmente falsos) positivos do primeiro podem ser confirmados pelo segundo (FDA 2010, OMS 2010).

A infecciosidade (ou “testes de infectividade”) de retrovírus deve ser investigada usando-se células viáveis do banco, cultivadas até seu limite máximo *in vitro*, ou o sobrenadante. Isto é especialmente aplicável aos substratos de roedores, humanos e primatas não-humanos.

A amostra deve ser inoculada em culturas de células indicadoras apropriadas, que devem permitir o crescimento de uma ampla variedade de agentes virais. O protocolo pode prever ainda uma nova inoculação em culturas frescas a fim de aumentar sua sensibilidade (FDA 2010, OMS 2010).

Este ensaio detecta apenas os contaminantes infecciosos; logo, um resultado negativo também pode ser complementado através da pesquisa pela enzima transcriptase reversa, pois tal ensaio detecta a presença dos retrovírus não infecciosos (ICH, 1999).

Os métodos moleculares estão em constante evolução. Ao contrário dos ensaios *in vivo*, que detectam uma ampla variedade de contaminantes possíveis, métodos de PCR, acoplados ou não a *Southern Blot*, são capazes de identificar especificamente agentes virais

conhecidos, em especial aqueles dificilmente cultiváveis e os sem efeito citopatogênico. Também podem ser encontrados vírus com genoma de RNA, através de PCR com a enzima transcriptase reversa; e técnicas de ELISA e imunofluorescência podem esclarecer resultados incertos obtidos por PERT. Podem ser detectados muitos vírus humanos e símios, bem como os vírus de inseto quando células desta origem forem utilizadas, desde que o método seja devidamente validado (FDA 2010, OMS 2010).

Os testes supracitados são apresentados pela OMS (1998, 2010), pelo ICH (1999) e FDA (2010) como uma lista sugerida, que não necessariamente deve englobar todos os procedimentos, e que deve ser revista à medida que métodos novos e alternativos surjam com os devidos dados de suporte, como a implementação de métodos mais sensíveis.

4.3.2.3 Bactérias e fungos

Amostras do fluido sobrenadante dos bancos mestre e de trabalho devem passar por testes de esterilidade para detectar a presença de possíveis microorganismos como bactérias, fungos e leveduras (OMS, 1998). Contaminações microbianas desses tipos causam aumento na turbidez e queda do pH do meio de cultivo. As células cultivadas morrem rapidamente, visto que estes organismos adventícios crescem em ritmo mais acelerado, depletando os nutrientes em solução (Léo *et al.*, 2008).

A esterilidade deve ser testada em 1% dos frascos, porém em não menos que dois frascos do BCM e BCT (Rodrigues e Moro, 2008). A testagem em diversas etapas do processo fabril condiz com a estratégia de que o BCM deve ser exaustivamente testado para identidade, e que os demais ensaios podem focar nas possíveis contaminações introduzidas de forma inadvertida durante a produção, derivadas de fontes como o ambiente, materiais ou pessoal. E além dos bancos, devem ser testadas células ao fim do cultivo, sendo apenas uma corrida para cada processo comercial ou produto aprovado (OMS, 2010).

Diversas farmacopéias descrevem os testes, e o ICH (1997) considera apropriados os métodos e limites adotados pelas monografias de seus três integrantes – Farmacopéias Européia, Norte-Americana e Japonesa –, e estas são também reconhecidas pelo Brasil conforme exposto na RDC 37/2009 (Brasil, 2009b).

O soro bovino, usado para suplementação de meios de cultura básicos, pode ser contaminado por bactérias, fungos e micobactérias. Este último microorganismo pode ser detectado pela cultura de uma amostra em meio específico e fértil, por seis semanas; também

estão disponíveis protocolos com o uso de cobaias e PCR (FDA, 2010). Devem ser testadas células susceptíveis a *Mycobacterium tuberculosis* e culturas primárias (OMS, 2010).

A presença de agentes microbianos em produtos biológicos e bancos celulares é testada em sistemas *in vitro* e *in vivo* pelos fabricantes. Embora os resultados com alguns substratos, como as células CHO, não tenham historicamente revelado diferenças quanto à detecção de contaminações entre os dois métodos, e embora ensaios *in vivo* devam aos poucos ser substituídos por modelos em culturas de células, pois tais testes devem ser reduzidos unicamente aos necessários à comprovação da segurança, eles ainda são os que exibem maior sensibilidade (mensurada como limite de detecção) e amplitude na descoberta de vários agentes contaminantes. Felizmente, BCMs derivados de sementes bem qualificadas previamente, como aqueles originados de células Vero da Organização Mundial de Saúde, não necessitam de testes repetidos em animais de laboratório (OMS, 2009).

4.3.2.4 Micoplasma

Estas bactérias diminutas e desprovidas de parede celular podem contaminar culturas de células e os materiais com os quais elas entram em contato, como soro fetal bovino (FDA, 2010), meios de cultura e outros reagentes que precisam ser estéreis, como a tripsina (Freshney, 2003).

Estes contaminantes são geralmente originados da própria microbiota oral humana (do manipulador) e do soro bovino (Rodrigues e Moro, 2008). Apenas no fim da década de 50 se reconheceu esta contaminação como um problema no trabalho com cultivos celulares em laboratório (Freshney, 2010). A contaminação é insidiosa porque não é tão facilmente detectável como aquela causada por bactérias e fungos, e pode ter consequências drásticas. As células podem sofrer alterações na taxa de crescimento, viabilidade, morfologia, nos cromossomos e metabolismo (Léo *et al.*, 2008). Mesmo sem efeitos degenerativos, a infecção por algumas espécies de micoplasma pode ser silenciosa, mas os microorganismos continuam metabolizando e proliferando ativamente em cultura, o que pode invalidar estudos celulares relacionados às vias metabólicas, receptores de superfície, interação vírus-hospedeiro e antigenicidade (Freshney, 2003; Hay *et al.*, 2003; Rodrigues e Moro, 2008).

Devem ser testadas as células derivadas de ao menos um frasco do BCM, e em cada ampola do BCT, seguindo-se os métodos de cultura em ágar e em “meio-caldo” e o ensaio em células indicadoras (ICH, 1997) para pesquisar micoplasmas cultiváveis e não-cultiváveis.

Sua detecção deve ser realizada nas linhagens, mas não precisa ser efetuada em estágios anteriores de desenvolvimento, como nos órgãos/tecidos parentais ou em culturas primárias (Hartung *et al.*, 2005).

Os métodos de cultivo devem usar ágar e caldo comprovadamente férteis, ou seja, que suportem o crescimento de inóculos do microorganismo. A validação do método requer o uso de controles positivos (crescimento de micoplasmas padronizados) e um negativo, que seria o próprio meio não inoculado (FDA, 2010). Este método microbiológico é muito sensível e empregado no controle de qualidade e em procedimentos de validação, e permitem a identificação até o nível de espécie do micoplasma (Freshney, 2010).

O uso de células indicadoras, como Vero ou outra devidamente qualificada, é aplicável à detecção de espécies do microorganismo difíceis de cultivar. Os micoplasmas são detectados através de microscopia de epifluorescência com o uso de um fluorocromo corante de DNA. De forma similar, o método precisa de controles positivos e negativo para ser considerado válido (FDA, 2010). Outras células indicadoras apropriadas incluem 3T6, NRK e A549; elas são importantes porque evitam os resultados falso-positivos que podem ser gerados pelo método da coloração de DNA, quando há muitos restos celulares no meio (Freshney, 2010).

Para os casos em que a presença de vírus interfere na avaliação, como quando os vírus vacinais causam efeitos citopáticos ou fragmentação na cromatina das células testadas, podem ser adotadas algumas estratégias: neutralização dos vírus com anti-soro, uso de culturas de células não permissivas ao vírus para o ensaio, ou o uso de células controle. Estas são células separadas do inóculo da produção, que são mantidas de forma semelhante e paralela àquelas destinadas à produção, porém não infectadas; tais culturas podem ser usadas para simular Vero e MRC-5, que são infectadas e lisadas durante a produção, não fornecendo células ao fim da produção para testes (FDA, 2010).

Há procedimentos para pesquisar a contaminação por micoplasmas descritos em guias, monografias farmacopéicas e em documentos do FDA (1993, 2010). Atualmente existe uma busca pelo desenvolvimento de testes de ácido nucléicos (PCR ou NAT) como alternativas mais rápidas e sensíveis à cultura, conforme foi introduzido em monografia da Farmacopéia Européia de 2007. No entanto, ainda não houve sucesso em sua implementação, em função das dificuldades para a padronização e interpretação dos resultados gerados (OMS, 2009). Os métodos de PCR devem se demonstrar comparáveis aos de cultura e célula indicadora, ou podem ser usados em combinação com um de cultura (FDA, 2010). Estudos de validação

devem comparar métodos de PCR com os oficiais, a fim de serem considerados apropriados para o uso alternativo de forma isolada ou combinada (OMS, 2010). Uma vez demonstrados aspectos como especificidade (painel de detecção em função de possíveis resultados falso-positivos) e sensibilidade, de forma comparável aos métodos aprovados atualmente, não há motivo para impedir o uso dessa metodologia com reação em cadeia de polimerase.

Há diversas outras técnicas para detecção deste tipo de contaminação, geralmente aplicadas em laboratórios de pesquisa. Este método de coloração de DNA usa um reagente fluorescente (DAPI) que se liga de forma específica ao ácido dextrorribonucléico. A técnica é fácil e confiável (pelo menos para a pesquisa básica) e evidencia as moléculas de DNA presentes na cultura, de forma a visualizar os micoplasmas como um padrão particulado fino ou filamentosos, na superfície celular (ao longo do citoplasma, na membrana plasmática) ou ao seu redor.

Pode-se pesquisar a infecção através da hibridização de sondas específicas para o DNA de micoplasma e análise por *Southern Blotting*; pesquisa por auto-radiografia da incorporação de timidina radioativa; e ELISA com anticorpo monoclonal específico (Freshney, 2010).

Existe ainda um kit para detecção de micoplasma através da pesquisa pela sua ação enzimática. Neste método, as células lisadas do microorganismo liberam enzimas metabólicas que convertem ADP em ATP; o aumento na concentração deste último é detectado por uma reação luminescente com a enzima luciferase, de forma a estabelecer uma relação entre a molécula e a presença do contaminante no meio¹¹.

Outros contaminantes relacionados são espiroplasma, entomoplasma e mesoplasma; sua detecção deve ser feita por cultura e coloração de DNA, quando for apropriado (FDA, 2010).

4.3.2.5 Príons

A encefalopatia espongiforme transmissível é uma doença de incubação demorada, porém fatal, que pode decorrer do contato do homem com materiais derivados de animais ruminantes infectados com príons, os quais são proteínas infecciosas com capacidade de auto-replicação. Em 2004, a EMA relatou casos de transmissão desta doença em humanos, atribuídas à administração parenteral de hormônio do crescimento e gonadotropina derivados

¹¹ Protocolo disponível no endereço eletrônico da empresa Lonza.

de glândulas de cadáveres; portanto, existe o risco teórico de contaminação com o uso de biomedicamentos como vacinas, hemoderivados e outros produtos farmacêuticos.

Detalhamentos são encontrados em um guia do EMA (2004) específico sobre o tema. O foco é na minimização – e não na eliminação – do risco presente no preparo de substâncias ativas, excipientes, materiais de partida e reagentes usados na produção de medicamentos. No caso de bancos celulares, há preocupação de que sejam inseridos príons pelo uso de produtos como tripsina, ou ainda soro bovino, extratos de carne, insulina e primatona, que são acrescentados aos meios de cultura para otimizar o crescimento de células. O documento citado e uma declaração oficial (EMA, 2002c) concluem que todos os bancos celulares e sementes já estabelecidos (à época da publicação deste guia), a partir dos quais se obtêm produtos medicinais já registrados e em uso nos países-membro europeus, e que tenham passado por análise de risco das agências reguladoras, são aceitáveis, mesmo que não possuam toda a documentação exigida para comprovar sua adequação à Farmacopéia Européia. No entanto, os fabricantes devem comprovar documentalmente tal adequação para os materiais usados ao estabelecer novos bancos de trabalho e ao restabelecer BCMs.

O Brasil acompanhou a regulamentação internacional e publicou as Resoluções da Diretoria Colegiada nº 305/2002 (Brasil, 2002) e nº 68/2003 (Brasil, 2003a). São levados em consideração o enquadramento de risco geográfico de cada país, definido pelo Escritório Internacional de Epizootias e pelo Código Zoossanitário Internacional; e o grau de infectividade de cada tecido, de acordo com a Farmacopéia Européia. Para os produtos derivados de ruminantes, são requeridos documentos como o Certificado de Boas Práticas de Fabricação, Certificado Veterinário Internacional, Certificado de Conformidade à Farmacopéia Européia, laudo analítico de controle de qualidade do produto acabado e/ou documento oficial da Autoridade Sanitária local atestando a origem da matéria-prima. Em suma, a redução do risco da contaminação por príons está focada no controle dos materiais de partida; com estas medidas e a tendência em substituir insumos de origem animal por outros (sintéticos ou obtidos a partir de vegetais), espera-se evitar o risco hipotético do contágio humano pelo uso de insumos derivados de ruminantes infectados.

4.3.2.6 Tumorigenicidade e oncogenicidade

Como linhagens contínuas passaram por processos de desregulação dos genes ligados ao crescimento e à proliferação celular, elas podem ter a capacidade de formar tumores

quando injetadas em cobaias, i.e., podem exibir tumorigenicidade, uma característica própria da célula analisada. Consequentemente, existe a suspeita (e o risco teórico) de que tais células possam levar ao aparecimento de displasias em seres humanos saudáveis. De forma similar, considera-se que alguns de seus resíduos possam capacidade oncogênica: o DNA derivado destas células hospedeiras pode ter a habilidade de causar transformações, devido à atividade relacionada aos seus oncogenes mutados e ativados, como *p53*, *bcr-abl*, *myc* e *ras*. Este ácido nucléico pode ser considerado infectante, devido a possíveis vírus (latentes ou retrovírus) integrados ao seu genoma ou extracromossomiais; podem estar presentes também apenas sequências dos genomas virais. E, em menor escala, há preocupações relativas às proteínas codificadas pelos genes de tais células, que também poderiam ter a capacidade de conferir potencial oncogênico (EMA, 2001; OMS, 2009; 2010). Os ensaios *in vivo* de tumorigenicidade e oncogenicidade são um requerimento também para as BPL (FDA, 2010), e há particular importância quando se trata de uma linhagem eucariótica derivada de mamífero (Etcheverrigaray e Kratje, 2008).

A OMS (1998; 2010) recomenda que os testes de tumorigenicidade sejam realizados uma vez no banco mestre ou no primeiro BCT, especificamente em suas células subcultivadas até o limite de idade *in vitro* ou preferencialmente além (três duplicações populacionais adicionais, a fim de simular um cenário de pior caso durante a produção), visto que culturas mais velhas têm maior probabilidade de exibir fenótipo tumorigênico e oncogênico.

É necessário testar linhagens diplóides novas e as antigas não caracterizadas previamente; células epiteliais humanas; e linhagens usadas na produção de vacinas virais atenuadas (com vírus vivo), as quais não passam por purificação extensiva. Não é necessário realizar os ensaios em linhagens diplóides bem caracterizadas, como MRC-5, WI-38 e FRhL-2, as quais podem inclusive ser empregadas como controle negativo nos protocolos. As culturas contínuas novas devem ser consideradas tumorigênicas até que se comprove o contrário, e só não devem ser testadas quando forem derivadas de células já sabidamente tumorigênicas, como os hibridomas e linhagens derivadas de roedores (Dusing, 2000), como CHO.

A fim de investigar o potencial tumorigênico de uma linhagem nova, os produtores devem realizar estudos em modelos animais imunossuprimidos e sem contaminações microbianas. As células usadas como o controle negativo e o positivo (p.ex.: HeLa, com grande capacidade tumorigênica) devem ser submetidas às mesmas condições e procedimentos que as amostras investigadas. Devem ser injetadas 10^7 células em dez animais

por grupo, com monitoramento por ao menos três meses (mas por até sete meses) para pesquisar a formação de tumores e metástases (FDA, 2010), com análise histológica da área injetada e de tecidos imunes proximais como nódulos linfáticos e baço, mas também pulmões, rins, cérebro e fígado (OMS, 2010).

É possível, adicionalmente, efetuar testes *in vitro* para melhor qualificar o comportamento das células em teste, com a formação de colônias em ágar e crescimento invasivo em culturas de órgãos (músculo). No entanto, estes testes não são o padrão porque seus resultados não podem ser diretamente correlacionados aos dados gerados *in vivo* (OMS 1998, 2009, 2010).

Com relação aos resíduos do substrato celular, podem ser realizados testes de oncogenicidade, a fim de assegurar a ausência de determinados agentes que poderiam imortalizar células e torná-las tumorigênicas. Para tal, é necessário testar o lisado de células e investigar o desenvolvimento de tumores em modelo animal (FDA, 2010). Este teste não é aplicável a BCMs bem caracterizados diplóides como WI-38, MRC-5 e FRhL-2, nem a bancos de linhagens contínuas como CHO, NSO, Sp2/0 e Vero em passagens baixas. O ensaio é particularmente aplicável às linhagens novas, compostas por células imortalizadas e identificadas como tumorigênicas, em especial aquelas candidatas à produção de vacinas atenuadas, pois estas contêm vírus viáveis (OMS, 2010).

Os métodos *in vivo* para oncogenicidade exibem dificuldades para a padronização, adoção de controles (positivo e negativo) e interpretação dos resultados. O protocolo inclui a inoculação do lisado de células ao fim de produção, ou preferencialmente com três duplicações populacionais extras. É inoculado o volume correspondente a 10^7 células em camundongos *nude*, ratos e *hamsters* recém-nascidos, com mais de dez animais por grupo, que são monitorados por ao menos seis meses para o desenvolvimento de nódulos no local de injeção e metástases. Deve-se avaliar a relação causal entre os nódulos surgidos com o material injetado, como base em exames histológicos (pois a malignidade formada deve ser derivada de tecido do animal em teste) e considerando os tumores que ocorrem espontaneamente em cada espécie, especialmente com a idade avançada dos animais (OMS, 2010).

As proteínas de uma linhagem tumorigênica, tais como fatores de crescimento e demais mitógenos, podem possuir a capacidade de desregular o ciclo celular; no entanto, elas têm ação limitada e reversível, visto que não se replicam e podem ser inativadas *in vivo* (OMS 1998, 2010).

Outra preocupação seria relativa à tolerância devido ao seu potencial imunogênico quando administradas ao organismo (EMA, 1997).

4.3.2.7 Validação da redução de contaminantes

A seleção de um substrato celular está diretamente relacionada à segurança e pureza do produto biológico que será gerado. Neste sentido, é fundamental definir programa de testes de controle de qualidade que será aplicado, levando em consideração a origem do substrato, a natureza e uso pretendido do produto, bem como o processo de fabricação empregado (FDA, 2010) para obter o medicamento final.

Essas considerações implicam que os contaminantes específicos devem ser pesquisados quando for relevante, por exemplo, como a aplicação de testes para vírus símios em bancos de Vero, mas não obrigatoriamente em CHO ou MRC-5. É esperado que um medicamento de uso contínuo tenha maior preocupação com a pureza, visto que a exposição do paciente será maior e prolongada, quando se compara ao uso de um medicamento de forma eventual. Além disso, a via de administração também pode ser importante, conforme afirmação da OMS (2010) sobre a ausência de infectividade, por parte do DNA presente em vacina, quando adotada a via oral. Por fim, estudos de validação do processo podem demonstrar sua capacidade de reduzir os contaminantes no produto final.

A redução de contaminantes – representados aqui por agentes virais e resíduos da célula hospedeira - pode ser alcançada pela sua remoção e/ou inativação. O estudo de validação deve ser desenhado com vírus reconhecidos ou suspeitos de infectarem o tipo celular de interesse, ou vírus modelos (envelopados e não envelopados), em escala equivalente à industrial, determinando-se a contribuição de cada etapa individualmente e seu somatório na redução do título, em unidades logarítmicas (OMS, 1998).

Contaminantes virais podem ser removidos através de fracionamentos com solventes, filtrações esterilizantes e etapas cromatográficas ao longo do processo de purificação. Estas colunas de cromatografia, presentes nas etapas de *downstream*, podem também eliminar resíduos como proteínas da célula hospedeira e DNA oncogênico ou infectivo. Já a inativação é observada em passos com o uso de tratamentos térmicos e de solventes e/ou detergentes para vírus; e agentes químicos como endonucleases de restrição e betapropiolactona, uma substância capaz de inativar vírus e destruir a atividade biológica do ácido desoxirribonucléico.

Produtos altamente purificados, como as glicoproteínas recombinantes sintetizadas por células transfectadas (p.ex.: CHO), passam por etapas que podem ser validadas a fim de demonstrar a eliminação e inativação de eventuais contaminantes presentes no início da cultura. O mesmo se aplica a outros produtos obtidos por métodos biotecnológicos, como vacinas compostas por subunidades ou partículas semelhantes a vírus (FDA, 2010). Conseqüentemente, produtos obtidos por tais processos podem se apoiar mais em estudos de validação de processo do que na caracterização do substrato inicial com relação à segurança do medicamento terminado.

O ICH (1997) pondera que, mesmo para novos substratos celulares, quando o produto final é altamente purificado, sem indícios da presença de células, os testes de tumorigenicidade (bem como os de cariologia, especialmente para culturas diplóides) não são necessários, assegurado que a redução na quantidade de DNA residual seja demonstrada por estudos de validação ou testes de controle de qualidade na liberação de cada lote.

Oncogenes típicos podem medir entre $3-30 \times 10^7$ pares de bases, mas o DNA residual em fluidos das culturas é encontrado majoritariamente na forma de pequenos fragmentos, improváveis de comporem uma sequência genética funcional que codifique para proteínas tumorais, e esta sequência ainda teria que se integrar em locais específicos do genoma a fim de causar mutagênese. É importante que o processo de fabricação disponha de etapas que inativem e removam o ácido nucléico até uma quantidade máxima de 10 nanogramas por dose humana, como o uso de enzimas como DNase, filtrações e betapropiolactona. Desta forma, a análise de risco recai sobre a redução (de quantidade e tamanho) do ácido nucléico em vacinas, e na validação da sua redução para biofármacos (OMS 2009, 2010). Se as células imortalizadas foram desenvolvidas pelo uso de sequências virais ou de oncogenes, estes elementos devem estar ausentes no produto final (FDA, 2010).

A fabricação de vacinas inativadas, como a obtenção de influenzavírus em Vero, também permite estudos de validação para demonstrar a capacidade das diversas etapas de produção, em especial para os passos de tratamento químico e purificação, de remover ou inativar diversos agentes contaminantes (FDA, 2010). Com relação à tumorigenicidade, e de forma semelhante aos biofármacos, vacinas fabricadas em um substrato tumorigênico, mas nas quais se demonstre a ausência de células no produto terminado, não precisariam passar por teste de tumorigenicidade.

No entanto, a produção de vacinas atenuadas gera maior preocupação quanto à pureza do material de partida, visto que não há etapas de inativação, e as etapas de *downstream* são

mínimas. Para o exemplo da tríplice viral, cujo componente sarampo é proliferado em células MRC-5, o medicamento é composto justamente pelas partículas virais viáveis, e o meio (que irá compor o medicamento) ainda contém componentes intracelulares do substrato lisado. Desta forma, os bancos destinados à produção de vacinas de vírus vivos não podem contar muito com estudos de validação do processo fabril a fim de demonstrar a redução de agentes adventícios; eles devem, portanto, ser exaustivamente qualificados antes do uso na produção (FDA, 2010).

Preocupada na época com a crescente consideração sobre o uso de linhagens humanas tumorigênicas para a obtenção de produtos biológicos, a EMA (2001) se posicionou de forma cautelosa. A Agência ressaltou que linhagens humanas contínuas podem, teoricamente, representar um risco maior pela inexistência de barreiras inter-espécies. A concentração de DNA residual e a análise de risco para este caso devem levar em conta aspectos como a posologia do produto (que reflete a exposição aos resíduos), tamanho dos fragmentos de ácidos nucleicos e capacidade do processo em reduzir as impurezas.

Quanto à validação da redução de proteínas ao longo do processo, há dificuldades na padronização, pois seria necessário identificar proteínas representativas a serem acompanhadas ao longo das etapas, e ainda se teria que levar em consideração os muitos protocolos, equipamentos e reagentes do processo de purificação. Logo, uma abordagem de análise rotineira das proteínas da célula hospedeira, para a liberação de um medicamento a granel, é preferível (EMA, 1997).

4.3.3 Estabilidade

É vital que se demonstre a manutenção estável da característica “normal” de células diplóides, pela carilogia de amostras retiradas de forma intervalada durante o processo fabril, a fim de pesquisar a presença de hiperploídia, hipoploídia e anormalidades estruturais nos cromossomos. E a fim de demonstrar a ausência de contaminação de um banco diplóide por células contínuas, deve-se ainda realizar testes para marcadores genéticos (OMS, 1998).

Quando mantidas em cultura, células normais irão se adaptar ao microambiente ao seu redor e, em função da fase do ciclo de crescimento, elas irão apresentar comportamentos diferentes no que tange à atividade proliferativa, ação enzimática, metabolismo e síntese de produtos especializados. É importante que se determine a curva de crescimento de uma

cultura celular, a fim de avaliar suas características específicas. As fases de crescimento são semelhantes às de microorganismos e passam pelos seguintes estágios:

- (a) lag: iniciada com o inóculo, esta fase tem taxa de crescimento mínima, enquanto as células secretam moléculas de glicocálix e rearranjam seu citoesqueleto para aderirem e se espriarem pelo suporte;
- (b) log: momento de proliferação ativa no qual as células estão no auge de seu estado fisiológico, e, desta forma, ideais para o estudo das funções celulares;
- (c) platô: durante a fase estacionária, a taxa de crescimento decai drasticamente em função da depleção de nutrientes e acúmulo de metabólitos. Pode haver um aumento relativo na produção de proteínas especializadas em vez das estruturais;
- (d) morte celular, por necrose ou apoptose.

Quando as células são cultivadas sequencialmente por muito tempo, elas podem apresentar instabilidade e alterações na morfologia, no funcionamento, em seu cariótipo e no padrão de crescimento. As linhagens mostram alterações que estão associadas à sua idade *in vitro*, podendo ocorrer transformações espontâneas (Léo *et al.*, 2008). O aumento das duplicações populacionais pode levar a uma queda na produtividade de proteínas recombinantes, como anticorpos monoclonais sintetizados em linhagens GS-CHO. Este fenômeno é parcialmente devido ao super crescimento de uma subpopulação composta por células com pouca ou nenhuma capacidade produtiva. Tal subpopulação pode ter vantagens metabólicas e se estabelecer como dominante no processo de cultivo, com impactos no rendimento do cultivo (Porter *et al.*, 2007). No entanto, outros autores (Derouazi *et al.*, 2007) pensam que esta redução na produtividade protéica se deve a mudanças na regulação da expressão transgênica.

A validação do processo de fabricação de um dado biológico deve conter informações sobre o número máximo de passagens que uma linhagem deve sofrer em produção, contado desde o descongelamento de um frasco do BCM até a coleta do produto medicamentoso. O tempo pelo qual um cultivo celular é mantido *in vitro* é chamada de idade ou duração da cultura, a qual pode ser contada pelo (OMS 1998, 2010):

- (a) número de passagens (repiques ou subcultivos usando tripsina, ou diluições no caso de células não-aderentes);

- (b) nível (ou número) de duplicações populacionais; ou
- (c) tempo cronológico decorrido em cultura (medido em horas, dias, etc.).

Este dado é importante especialmente ao se trabalhar com linhagens imortalizadas, para assegurar que até certo ponto de cultivo, por exemplo, em biorreatores industriais, elas não expressem seu potencial tumorigênico. Neste sentido, é vital que se testem células usadas no cultivo, ao fim de seu número máximo de passagens ou um pouco além (denominadas “células ao fim da produção”), ou ainda células residuais presentes após a coleta do produto. Essas amostras fornecem informações valiosas sobre a estabilidade da célula e expressão de genes, bem como a reativação de possíveis retrovírus e vírus latentes integrados ao genoma hospedeiro. No entanto, em processos de vacinas virais, como na produção de vacina contra a febre amarela ou influenza em células Vero, o substrato celular é rompido ao permitir a replicação dos vírus em ciclo lítico; nestes casos, deve-se conduzir os testes necessários em células do BCM ou BCT, cultivadas em paralelo sem sofrerem infecção, as células-controle (OMS, 2009).

Outro objetivo no estudo da estabilidade é avaliar a conveniência e adequação de uma dada linhagem celular para o fim produtivo a que se propõe, o que pode ser avaliado em termos de consistência na produção e retenção da capacidade produtiva durante o armazenamento sob condições definidas. Para tal, devem ser realizadas comparações entre células do BCM ou células no início do cultivo com células de produção ao final de sua idade *in vitro* ou além, incluindo análises das características morfológicas e de crescimento, marcadores bioquímicos e imunológicos, produtividade ou qualquer outro marcador genotípico ou fenotípico; podem-se ainda realizar comparações quanto às taxas de consumo de oxigênio ou glicose, ou ainda de produção de subprodutos metabólicos como amônia e lactato (ICH, 1997). A estabilidade genética deve ser confirmada por métodos como cariótipo ou DNA *fingerprinting*. As células diplóides devem continuar como tal ao fim da sua vida em laboratório ou na produção (FDA, 2010). Eventuais alterações do processo fabril devem ser validadas em escala piloto ou maior, usando células no limite de sua vida *in vitro* ou além.

Com relação às linhagens transformadas para produção de proteínas terapêuticas recombinantes, há preocupações adicionais quanto à estabilidade do sistema de expressão, que é composto pela célula hospedeira e o vetor contendo a sequência genética de interesse. A fim de assegurar consistência do cultivo, crescimento da cultura e produção das moléculas-alvo, deve ser definido o número máximo de duplicações populacionais ou nível de passagem, com

base em informações de estabilidade do sistema de expressão quando exposto a subcultivos seriais. Para ao menos um lote derivado de cada BCM, devem ser monitorados os seguintes parâmetros ao fim da cultura (ou além): número de cópias do gene, retenção do vetor na célula hospedeira, mapa de restrição e sequenciamento do inserto (OMS, 1991); e ainda a integridade do inserto e seu nível de expressão (FDA, 2010). Com relação ao cronograma de testes, a estabilidade genética de linhagens engenheiradas deve ser verificada no BCM e em células ao fim da produção (OMS, 2010).

Os resultados gerados ajudam a definir o período máximo de manutenção das células em cultura, garantindo a estabilidade do sistema de expressão e consistência do produto (OMS, 1991). O ICH (1995) recomenda avaliar a expressão do inserto através da análise dos ácidos nucleicos, que pode ser feita em células de produção em escala piloto ou industrial, expandidas até seu limite de vida *in vitro* ou além; ou ao mapeamento peptídico do produto de interesse. Por fim, Etcheverrigaray e Kratje (2008) também alertam para a avaliação da viabilidade como medida de estabilidade das células ao longo do tempo. Além disto, a avaliação e definição do tempo máximo *in vitro* para determinada linhagem celular faz parte de uma satisfatória validação de processo de fabricação, exigida tanto por regulamentos internacionais quanto pelos nacionais, como as RDC 55/2010 (registro de medicamentos biológicos) e 17/2010 (BPF para indústrias de medicamentos).

4.3.4 Certificação de células de interesse para Bio-Manguinhos

A seguir são resumidos os requisitos para a caracterização de bancos de células Vero, MRC-5 e CHO, tendo em mente que as duas primeiras seriam destinadas à produção de vacinas virais, e a última, de proteínas recombinantes.

Os testes de esterilidade, incluindo bactérias, fungos/leveduras e micoplasma, são iguais para todos, devendo ser realizados no BCM, em cada BCT, e uma vez nas células ao fim de produção para cada processo ou produto aprovado. Caso as células tenham sido cultivadas em meio suplementado com soro fetal bovino (em vez de meio definido), é necessário pesquisar a presença de vírus bovinos.

Vero

- Micoplasma no BCT e nas células ao fim de produção (estas podem ser representadas por células-controle, visto que ocorre lise durante o processo).

- Identidade: a cariotipagem desta linhagem contínua será interessante caso haja algum cromossomo marcador; caso contrário, pode ser usada análise de isozima para confirmar a espécie de origem, dado que linhagens imortalizadas, propagadas por muito tempo *in vitro*, estão mais propensas à contaminação cruzada. Além disso, deve ser realizado teste genético (DNA *fingerprinting* ou *profiling*).
- Estabilidade: cariotipagem de cromossomo marcador, se aplicável, para assegurar estabilidade genética.
- Vírus e retrovírus: testes para detecção de PCV-1 e 2 são fundamentais porque os BCTs para produção de vacina contra rotavírus estão potencialmente contaminados; vírus símios devido à origem da célula.
- Tumorigenicidade e oncogenicidade: estes testes seriam necessários, em princípio, por se tratar de uma linhagem imortalizada. Contudo, a orientação mais recente da OMS (2010) recomenda que não sejam realizados testes novamente nos bancos, visto que Vero já foi bem caracterizada como tumorigênica em altas duplicações populacionais. Neste sentido, o cuidado recai sobre o desenho do processo com limite máximo bem definido para manutenção da cultura em biorreatores.

MRC-5¹²

- Micoplasma semelhante à Vero.
- Identidade: seu cariótipo diplóide não precisa ser conferido nos bancos, dada sua extensiva caracterização publicada; mas sim em células controle (simulando aquelas ao fim de produção), para assegurar sua estabilidade genética após exposição às condições do processo de fabricação, tais como meio de cultura, reagentes e outras variáveis. Este método já confirma a espécie de origem (humana), e a autenticação deve ser complementada por um teste genético como DNA *profiling*.
- Estabilidade: manutenção do cariótipo diplóide, até o fim da produção, pelo uso de células-contrôle, dado que ocorre lise durante a replicação viral.
- Vírus e retrovírus: pela origem da cultura, devem ser investigados vírus humanos (como HIV1/2, HCV e HBC) por métodos *in vivo* e *in vitro*. Vírus bovinos relativos ao uso de soro fetal bovino, e porcinos devido ao uso de tripsina

¹² Linhagem atualmente usada para a produção do componente rubéola da vacina tríplice viral em Bio-Manguinhos conforme seu portfólio.

- Tumorigenicidade e oncogenicidade: não necessários por serem células diplóides, sabidamente não tumorigênicas, de acordo com extensiva publicação sobre sua certificação. Na verdade, estas células podem ser usadas como controle negativo quando o potencial tumorigênico for investigado em novas linhagens.

CHO¹³

- Micoplasma em células ao fim de produção (ou além) porque não há lise (não precisa usar células-controle); pesquisa também em coletas do produto durante o processo, especialmente em pontos onde o líquido está concentrado. O produto pode ser altamente purificado e passar por etapas de redução de contaminantes.
- Autenticidade: deve ser confirmada a espécie de origem (cariologia ou isoenzimas). Além disso, por se tratar de uma linhagem modificada geneticamente, ela deve ser autenticada quanto à sequência do DNA, vetor e sistema de expressão e produtividade específica.
- A estabilidade genética desta linhagem modificada deve ser investigada no BCM e em células ao fim da produção, uma vez por BCT. A avaliação deve considerar a manutenção do gene inserido, do vetor, da expressão e produtividade; adicionalmente, deve ser verificada a integridade da proteína gerada.
- Vírus e retrovírus: teste HAP (*hamster antibody production*); retrovírus (porque linhagens de roedores podem produzi-los), avaliando a quantidade e tipo de retrovírus produzidos; também é recomendável teste de infectividade para este agente. Vírus bovinos relativos ao uso de soro fetal bovino, e porcinos caso as células sejam cultivadas de forma aderente e se use tripsina.
- Tumorigenicidade e oncogenicidade: estes testes seriam necessários por se tratar de uma linhagem imortalizada derivada de tumor. No entanto, a orientação mais recente da OMS (2010) defende que estas células, como já foram exaustivamente caracterizadas como tumorigênicas, não devem passar por estes testes novamente. O foco deste aspecto de segurança recai sobre a validação das etapas de purificação, que devem ser validadas para demonstrar a ausência de células e a redução de DNA e proteínas de CHO no produto biológico terminado.

¹³ Linhagem atualmente usada para produção de alfaeopetina em Bio-Manguinhos, conforme seu portfólio.

4.4 Aplicação das Boas Práticas

As Boas Práticas em Cultura de Células estão dentro das Boas Práticas de Laboratório (guia da OECD), pois são uma versão adaptada destas aos laboratórios de menor complexidade, como os de pesquisa básica. Os seus princípios são contemplados também nas BPF, e são necessários para atender os requerimentos regulatórios de vários tipos de produtos, diagnóstico médico e aplicações terapêuticas como engenharia de tecidos, bem como as terapias celular e gênica (Coecke *et al.*, 2005).

4.4.1 Áreas limpas

A qualificação do sistema de ar das salas limpas merece especial atenção. Estes ambientes abrigam operações importantes, como os procedimentos assépticos, logo a qualidade do ar deve ser garantida através dos filtros de entrada (e os de saída podem estar relacionados à biossegurança, retendo patógenos), e monitorada pela velocidade do ar, contagem de partículas viáveis (por controle ambiental) e não viáveis. As BPF definem que operações críticas, como envase asséptico, devem ser realizadas com maior rigor em ambiente grau A (sob cabine de fluxo laminar classe II ou de biossegurança), rodeado por ambiente de grau B. Já o envase de um produto a ser esterilizado terminalmente pode ocorrer em cabine grau A, dentro de uma sala limpa grau C.

No presente trabalho, é defendido que as manipulações assépticas de culturas, a fim de gerar os bancos de células, podem ser efetuadas em cabine classe II (grau A) circundada por ambiente grau C. Esta configuração é aceitável de acordo com o documento da OMS (2011) a respeito do monitoramento ambiental das salas limpas para a produção de vacinas, para a atividade de geração de sementes mestre e de trabalho; esta disposição foi verificada também em duas empresas no exterior que estabelecem bancos celulares (conforme resultados na seção 4.1.2). O documento citado expõe ainda a alternativa de efetuar tais manipulações em sistema fechado (cabine classe III, com isolador destinado ao trabalho com patógenos) circundado por ambiente grau D, com redução no grau de limpeza da sala.

Dada a restrição exposta no escopo das normas de inspeção (Brasil, 2010b) e de acreditação (ABNT, 2005), é provável que o tópico “biossegurança” seja atualmente negligenciado durante as inspeções sanitárias e avaliações. No entanto, como exposto

anteriormente, este deve prevalecer sobre as BPF caso haja divergências quanto aos diferenciais de pressão em salas classificadas.

4.4.2 Produção de biológicos

Na presente dissertação (e na proposta de guia em anexo), é defendida a idéia de que as Boas Práticas de Fabricação são fundamentais por serem relacionadas a produtos destinados ao uso humano. Neste sentido, a Autoridade Sanitária (VISA local e Anvisa) deve conduzir inspeções para certificação BPF nos centros que estabelecem bancos de células visando à fabricação de medicamentos biológicos.

Uma empresa, indústria ou laboratório que estabeleça bancos de células, sejam mestre ou de trabalho, está executando atividade produtiva, gerando substrato celular ou material de partida destinado à produção de medicamentos biológicos por uma indústria – devendo, portanto, passar igualmente por inspeção e certificação. O presente estudo ajudou a identificar, conforme apontado na tabela 4.11, que a maioria dos estabelecimentos internacionais já se encontra preocupada com a geração destes bancos em conformidade às BPF; tal busca pela excelência é vital para a obtenção consistente de substratos biológicos bem caracterizados e uniformes.

Se os laboratórios que estabelecem bancos de células integrarem uma indústria, e se eles também forem responsáveis pelos testes de caracterização das linhagens, uma mesma inspeção sanitária poderia certificar que a criação dos bancos ocorreu em adesão às BPF, e que os métodos analíticos empregados foram válidos.

Os seguintes princípios das BPF são especificamente aplicáveis à geração de substratos celulares:

- descrição do histórico de obtenção, desenvolvimento e manutenção da cultura de células, como parte da identidade;
- manutenção dos bancos de células: procedimentos e registros sobre o armazenamento das ampolas (em nitrogênio líquido ou *freezer*), bem como o acesso aos bancos de células por pessoal autorizado; detalhes do cultivo como os meios e reagentes utilizados, rotina de testes e de repiques, dentre outros;
- POPs escritos e aprovados para todos os procedimentos e operações;
- registros: documentação disponível para permitir rastreabilidade e comprovar que os procedimentos aprovados foram seguidos, bem como os resultados dos testes;

- pessoal: treinamento, vestuário e fluxo de pessoas pelas áreas produtivas;
- instalações: áreas adequadas e fáceis de limpar, com a menor quantidade possível de objetos; acesso às áreas classificadas por ante-salas (*airlocks*); procedimentos e registros de limpeza e descontaminação;
- monitoramento ambiental: avaliação de partículas viáveis e não viáveis nas condições “em repouso” e “em operação”;
- classificação do sistema de ar, necessária para a classificação das salas limpas onde ocorrem manipulações assépticas; as operações durante a geração de um banco celular podem ser realizadas em cabine de fluxo laminar grau A, inserido em sala de grau C (no mínimo);
- prevenção de contaminações (inclusive cruzadas): manipulação de outras linhagens ou vírus em momento diferente daquele em que se estabelece um banco de células; fluxo adequado de materiais limpos e contaminados;
- validação do sistema de água para assegurar sua geração com a qualidade exigida em cada operação, como a formulação de meios de cultura;
- calibrações de instrumentos como termômetros e toda a vidraria;
- qualificações para assegurar o correto desempenho de equipamentos, como autoclave e as cabines de fluxo laminar;
- validação de limpeza, incluindo os procedimentos de descontaminação e fumigação, a fim de evitar contaminação cruzada e microbiana;
- controles em processo;
- validação do processo asséptico (“*media fill*”): a etapa mais crítica deve ser desafiada, pela simulação do preparo de suspensão celular para criopreservação, porém usando meio de cultura para testar a integridade do frasco e a técnica asséptica (Doyle e Griffiths, 1999).

4.4.3 Produção de insumos

Contrastando com os medicamentos sintéticos, os produtos biológicos são diferenciados em função da origem biológica de seus princípios ativos e à diversidade dos processos tecnológicos utilizados na sua obtenção (RDC 55/2010). A OMS (1992) afirma que devido a esta maior variabilidade relativa à origem e processo fabril, os biológicos devem ser fabricados em conformidade às BPF em todas as etapas produtivas, desde a produção dos ingredientes ativos. Em outro documento (OMS, 1998), a Organização define que as BPF

para produtos farmacêuticos e produtos biológicos devem ser aplicadas no preparo de bancos de células. Esta linha de raciocínio é seguida em seu documento de 2010, no qual segue afirmando que os princípios gerais das BPF para biológicos devem ser aplicados.

De forma semelhante, a Agência Americana defende que os conceitos de *design* de qualidade consistentes com as BPF são relevantes na seleção e desenvolvimento de substratos celulares. Afirma ainda que se tal substrato não for desenvolvido sob tais Boas Práticas, pode ser necessária testagem adicional ou até nova derivação de banco de células (FDA, 2010).

Na verdade, o banco de células não deve ser enquadrado como mero insumo ou material de partida; os substratos celulares são uma plataforma (bio)tecnológica para a obtenção de produtos biológicos, tal qual a síntese química o é para os medicamentos sintéticos, e os processos extrativos para os fitoterápicos. Acreditamos que estes bancos devem ser estabelecidos, a partir da semente celular, sob condições BPF a fim de gerar proteínas ou partículas virais que comporão biofármacos ou vacinas, respectivamente, com os devidos atributos de qualidade, eficácia e segurança, conforme se espera de um medicamento.

Outros autores também defendem que os bancos de células devem ser gerados em condições BPF. Doyle e Griffiths (1998) entendem que as BPF são aplicáveis ao estabelecimento de bancos porque a intenção é assegurar que os produtos sejam fabricados de forma consistente, no grau de qualidade requerido pelo seu uso desejado. Tais requerimentos incluiriam documentação detalhada, monitoramento ambiental, manipulação de uma linhagem por vez no laboratório e validação de processo e de limpeza.

O assunto é abordado ainda por Dusing (2000), os quais afirmam que tais bancos devem ser produzidos usando as regulações de BPF, a partir de uma semente celular controlada e gerando um banco padronizado. Rodrigues e Moro (2008), por fim, defendem que os bancos de células devem ser gerados em ambiente adequadamente controlado, e com estrita adesão às BPF.

4.4.4 Métodos analíticos e laboratórios para certificação de bancos

Com relação aos métodos analíticos, o controle de qualidade dos produtos biológicos, seja nos controles em processo ou na liberação, frequentemente emprega testes (como ensaios em sistemas biológicos) que exibem uma variabilidade maior do que as determinações físico-químicas tradicionais, conforme disposto na RDC 55/2010 e RE 899/2003 (Brasil 2010c, 2003c). Estes documentos referentes à validação analítica foram desenvolvidos visando os métodos cromatográficos, para os quais se deseja determinar atributos como especificidade,

limite de detecção e quantificação, linearidade da resposta, dentre outros. Contudo, certas metodologias utilizadas não são consideradas lineares pelo ICH (2005), como os imunoenaios. De forma similar, a maioria dos testes necessários à certificação de linhagens celulares não seguem prontamente tais atributos, como os protocolos para cariotipagem. Muitos testes devem ser válidos apenas com o emprego de controles positivo e negativo, como os ensaios *in vivo* para detecção de contaminantes em ovos e animais.

Um laboratório que conduza os testes de controle de qualidade, necessários à certificação de bancos de células (identidade, pureza, estabilidade) deve ser auditado por alguma autoridade. Neste sentido, poderiam ser aceitas a acreditação quanto à ISO 17025 para cada ensaio realizado; e/ou reconhecimento BPL para os ensaios de segurança enquadrados naquela área de conhecimento pelo Inmetro. Alternativamente, se defende nesta dissertação que um laboratório deste tipo, caso esteja localizado dentro de uma indústria, poderá ser auditado quanto às Boas Práticas em Controle de Qualidade durante uma inspeção sanitária para fins de certificação BPF.

Por mais que haja diferenças entre os três casos, em todos ocorre a verificação por parte de uma autoridade que averigua a existência de um sistema da qualidade dentro do laboratório, e que o mesmo é seguido; isto acrescenta credibilidade aos resultados analíticos para fins de caracterização de bancos de células e outros tipos de análises.

4.5 Lacunas na regulamentação e proposta de guia

Apesar da maior especificidade introduzida por normas como a RDC 55/2010 (Brasil, 2010c), RDC 17/2010 (Brasil, 2010b), e a futura RDC definida pela CP 70/2009 (Brasil, 2009a), a lacuna na regulamentação nacional quanto ao estabelecimento e certificação de bancos celulares deve ser sanada. Há espaço para a introdução de um guia específico que detalhe o disposto nas Resoluções. Uma proposta para tal documento foi desenvolvida e consta como anexo, seguindo as seguintes considerações:

- ✓ a proposta de guia está baseada no documento da OMS (2010), visto que o Brasil é país-membro desta; outras fontes a serem consideradas, em seguida, são documentos de outras autoridades como ICH, EMA e FDA, bem como farmacopéias, pois estas publicações têm mais poder regulatório do que artigos científicos isolados;

- ✓ o texto deve conter as tabelas com sugestão de planejamento e cronograma dos testes para caracterização de BCM e BCT (OMS, 2010), visando fornecer as diretrizes para ajudar os produtores nacionais (como Bio-Manguinhos) a trabalharem seus pontos fracos. No entanto, a estratégia final deve ser discutida com o fabricante envolvido, levando em consideração fatores como a natureza do produto, seu uso pretendido, processo fabril, reagentes e materiais de partida;
- ✓ produtores de bancos de células devem ser certificados quanto às BPF pela Autoridade Sanitária;
- ✓ laboratórios que realizam testes de caracterização devem validar seus métodos analíticos (no que for aplicável) e possuir acreditação ISO, reconhecimento BPL ou certificação BPF (caso estejam dentro de uma indústria). A acreditação para os ensaios realizados é especialmente importante porque alguns métodos analíticos não são passíveis de validação (da forma como se entende para um método cromatográfico);
- ✓ os bancos de células devem ser caracterizados e qualificados para o uso pretendido, com relação à autenticidade, segurança e estabilidade; é fundamental avaliar a redução de contaminantes, bem como definir e controlar a idade celular *in vitro*, como parte da validação do processo fabril;
- ✓ o desenvolvimento de linhagens novas deve ser acompanhado por registros detalhados sobre o processo de derivação, reagentes e materiais usados, já que as células podem culminar por serem usadas em aplicações não planejadas inicialmente, como sua aplicação na clínica (Coecke *et al.*, 2005). No entanto, todas as linhagens usadas como substratos devem ser extensivamente caracterizadas para que se conheçam suas propriedades.
- ✓ o texto deve ser atualizado em função das publicações que foram utilizadas como base, porém se encontram em consulta pública atualmente. Tais documentos englobam o guia da OMS (2010) e as normas para BPF de insumos e habilitação de laboratórios analíticos junto à GGLAS.

4.6 Boas Práticas Regulatórias

A legislação na área da saúde está primeiramente representada por leis, decretos-leis, decretos (Poder Legislativo) e Portarias do Ministério da Saúde (Poder Executivo), que são peças frequentemente amplas e necessitam de maiores detalhamentos. A atuação da Anvisa na

produção normativa, através de Resoluções da Diretoria Colegiada (RDCs), aborda os produtos e serviços sujeitos ao regime de Vigilância Sanitária.

A Agência Reguladora, através de seu Programa de Melhoria do Processo de Regulamentação e do Guia de Boas Práticas Regulatórias (Brasil, 2008), almeja aprimorar o sistema regulatório de forma a garantir maior qualidade e efetividade da regulação sanitária na prevenção de riscos à saúde da população. Esse Programa tem como um de seus objetivos a geração de atos normativos ordenados, claros, sistematizados, técnicos e satisfatórios. A elaboração das RDCs deve ocorrer com transparência através de mecanismos de participação da sociedade, i.e., através de consultas públicas e audiências públicas, momentos em que os interessados podem participar – produtores, pesquisadores e acadêmicos, conselhos de classe, associações e todo cidadão em geral.

Os procedimentos de elaboração de atos normativos pela Agência foram sistematizados e seguem uma agenda contemplando temas estratégicos. O fluxo começa quando há uma iniciativa formal do Diretor e a área responsável elabora uma proposta de regulamentação. Após eventuais ajustes, é realizada a análise do impacto regulatório e análise jurídica; a proposta pode ser arquivada, sofrer novos ajustes ou seguir diretamente para apreciação pela Diretoria Colegiada. Neste ponto, a proposta de RDC pode passar pelo procedimento de consulta pública e/ou de audiência pública. As contribuições são consolidadas, o texto passa por deliberação pela Diretoria e então segue para a publicação no Diário Oficial da União; só então passa a vigorar e a ser acompanhada para futura compilação ou revisão. As etapas de consulta e audiência públicas não são obrigatórias e podem ser excepcionalmente suprimidas em casos de urgência e quando o conteúdo é meramente administrativo. As consultas objetivam obter subsídios e informações para ajudar no processo de tomada de decisões de uma forma transparente e democrática; já os temas mais complexos e de maior repercussão são tratados por meio de debates orais com os setores envolvidos, através das audiências.

Apesar de sua maior especificidade com relação às Leis e Portarias, as RDCs ainda podem ser atos normativos gerais e abstratos. Pela técnica legislativa, ela pode, então, prever a publicação de uma Instrução Normativa (IN) contendo um guia, que enfim ajude na operacionalização técnica e metodológica de determinado tópico. Conforme disposto no Regimento Interno da Anvisa¹⁴, a IN é um ato expedido pelo Diretor-Presidente ou por outro

¹⁴ Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/institucional/anvisa/regimento_interno/Portaria354_010410.pdf>.

Diretor da casa, que expressa uma decisão de caráter normativo, visando detalhar ou orientar procedimentos de alcance externo, ou seja, relativos ao setor regulado.

Após a pesquisa envolvendo os atos legais Brasileiros, ficou evidenciada a falta de regulamentação específica capaz de orientar a indústria farmacêutica quanto ao estabelecimento de um banco de células, bem como na realização de um programa de testes de controle de qualidade necessários para sua certificação, de forma a garantir sua autenticidade, pureza e estabilidade. A melhor solução identificada seria a confecção de uma proposta para guia nesta área, pormenorizando o disposto nas Leis e Resoluções. A idéia é que tal guia seja publicado através de uma IN, a qual, embora não pressuponha consultas nem audiências públicas, pode ser debatida em reuniões técnicas com os setores interessados da sociedade, desta forma assegurando a participação democrática e transparente na construção de um novo marco normativo.

5 CONCLUSÕES

- ✓ foi identificado que alguns centros estrangeiros que trabalham com culturas de células já estão conscientes da necessidade de gerar bancos em adesão às BPF
- ✓ foi identificado que os vários centros nacionais trabalhando com substratos celulares para pesquisa, desenvolvimento, controle de qualidade e produção buscam se adequar, mas carecem de orientação clara
- ✓ não foi identificado centro nacional capaz de certificar bancos de células; esta capacidade foi identificada apenas em empresas no exterior
- ✓ foram verificadas vacinas e biofármacos, produzidos em células CHO, MRC-5 e Vero, com registro válido no Brasil
- ✓ foi elaborada uma proposta de guia, com base na regulamentação consultada, a fim de orientar os produtores e reguladores nacionais a respeito do estabelecimento e certificação de substratos celulares visando à produção de medicamentos biológicos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida LS. **Pesquisa qualitativa dos requerimentos fundamentais para a transferência, registro sanitário, estabelecimento e parâmetros de estabilidade de bancos de células de *Escherichia coli* que expressa o interferon alfa 2b humano recombinante.** Rio de Janeiro; 2009. Mestrado (Dissertação em Tecnologia de Imunobiológicos) – Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/mpti/dissertacoes/mpti-2007/luciana-de-santos-almeida.pdf>>.

Alves PMM, Carrondo MJT, Cruz PE. **Introdução à tecnologia de cultivo de células animais.** In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR (eds.). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica.** São Paulo: Roca; 2008. p. 2-14.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). **ABNT NBR ISO/IEC 17025.** Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2 ed. Rio de Janeiro, 2005.

Augusto EFP, Oliveira MS. Processos com células animais. In: Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schmidel W, coord. **Biotecnologia industrial.** 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda; 2001, p.547-69.

Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E *et al.* **Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, and tissues.** In Vitro Cell Dev Biol Anim 2010 Out; 46(9): 727-32. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965362/>>.

Bernard AR. Production of proteins by transient expression. In: Ozturk SS, Hu WS (eds). **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies.** EUA: Taylor and Francis Group; 2006, p. 605-26.

Bollati-Fogolín M, Comini MA. **Clonagem e expressão de proteínas heterólogas em células animais.** In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR (eds.). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica.** São Paulo: Roca; 2008. p. 42-80.

Bradshaw T. **The UK bioprocessing sector.** Cell technology for cell products: Proceedings of the 19th ESACT Meeting; 2005 Jun 5-8; Harrogate (Reino Unido). Reino Unido: Springer; 2007. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/978-1-4020-5475-4#section=340114&page=1&locus=35>>. Acesso em 12/04/2011.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Boas Práticas Regulatórias: guia para o programa de melhoria do processo de regulamentação da Anvisa.** Anvisa. Brasília; 2008.

_____. **Consulta Pública nº 15 de 23 de março de 2011.** Dispõe sobre a Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS). Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 28 mar. 2011; Seção 1, n.59, p.94.

_____. **Consulta Pública nº 70 de 03 de novembro de 2009** (Brasil, 2009a). Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de insumos farmacêuticos ativos obtidos por culturas de células/fermentação. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 10 nov. 2009; Seção 1, n.214, p.77.

_____. **Consulta Pública nº 84 de 10 de agosto de 2010** (Brasil, 2010a). Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de produtos intermediários e insumos farmacêuticos ativos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 12 ago. 2010; Seção 1, n.154, p.42.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 17 de 16 de abril de 2010** (Brasil, 2010b). Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 abr. 2010; Seção 1, n.73, p.94.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 37 de 06 de julho de 2009** (Brasil, 2009b). Na ausência de monografia oficial de matéria-prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais inscritos na Farmacopéia Brasileira. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 08 jul. 2009; Seção 1, n.128, p.40.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 55 de 16 de dezembro de 2010** (Brasil, 2010c). Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 17 dez. 2010; Seção 1, n.241, p.110.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 67 de 8 de outubro de 2007.** Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficinais para Uso Humano em farmácias. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 9 out. 2007; Seção 1, n.195, p.29.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 68 de 28 de março de 2003** (Brasil, 2003a). Estabelece condições para importação, comercialização, exposição ao consumo dos produtos incluídos na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº. 305, de 14 de novembro de 2002. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 31 mar. 2003; Seção 1, n.62, p.52.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 210 de 04 de agosto de 2003** (Brasil, 2003b). Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, conforme ao Anexo I da presente Resolução. República Federativa do Brasil. Brasília, 04 ago. 2003; Seção 1, n.156, p.24.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 249 de 13 de setembro de 2005** (Brasil, 2005b). Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de produtos intermediários e insumos farmacêuticos ativos. República Federativa do Brasil. Brasília, 2005.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 305, de 14 de novembro de 2002.** Ficam proibidos, em todo o território nacional, enquanto persistirem as condições que configurem risco à saúde, o ingresso e a comercialização de matéria-prima e produtos acabados, semi-

elaborados ou a granel para uso em seres humanos, cujo material de partida seja obtido a partir de tecidos/fluidos de animais ruminantes, relacionados às classes de medicamentos, cosméticos e produtos para a saúde, conforme discriminado. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 18 nov. 2002; Seção 1, n.222, p.60.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 315 de 26 de outubro de 2005** (Brasil, 2005c). Dispõe sobre o regulamento técnico de registro, alterações pós-registro e revalidação de registro dos produtos biológicos terminados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 31 out. 2005; Seção 1, n.209, p.11.

_____. **Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003** (Brasil, 2003c). Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 02 jun. 2003; Seção 1, n.104, p.56.

Brasil. Conselho Nacional de Saúde (CNS). **Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996**. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 16 out. 1996; Seção 1, n.201, p.81. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/1996/Reso196.doc>>. Acesso em 12/04/2011.

Brasil. **Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976**. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 24 set. 1976. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L6360.htm>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005** (Brasil, 2005a). Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados - OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança - CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança - PNB, revoga a Lei no 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória no 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei no 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 28 mar. 2005; Seção 1, p.1. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm>. Acesso em 12/04/2011.

Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). **Resolução Normativa nº 2 de 27 de novembro de 2006**. Dispõe sobre a classificação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 28 nov. 2006; Seção 1, p.90. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3913.html>>. Acesso em 12/04/2011.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. **Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa**. 4ª ed. Brasília: Editora MS; 2008. Disponível em:

<http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/materialeducativo/Manual_ceps_v2.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Portaria nº 2.376 de 15 de dezembro de 2003** (Brasil, 2003d). Regimento Interno da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 17 dez. 2003; Seção 1, p.77/91. Disponível em: <http://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/legislacao/portaria_n2376_15122003.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). **Programa Nacional de Imunizações: 30 anos**. Brasília, 2003 (Brasil, 2003e). Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/politicas/livro_30_anos_pni.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

Bretas RM. **O uso de soros hiperimunes heterólogos no Brasil: uma análise do mercado e das reações adversas a medicamentos**. Londrina; 2009. Especialização (monografia em Toxicologia aplicada à Vigilância Sanitária) – Universidade Estadual de Londrina.

Butler M. **Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals**. Appl. Microbiol. Biotechnol, 2005; 68: 283-91.

_____. **Modificações Pós-tradução em Proteínas Recombinantes**. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR (eds.). **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. São Paulo: Roca; 2008. p. 122-37.

Carvalho Mello IMVG, Conceição MM, Jorge SAC, Cruz PE, Alves PMM, Carrondo MJT *et al.* **Vacinas virais: conceitos, princípios e bioprocessos**. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR (eds.). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Roca; 2008. p. 427-50.

Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T *et al.* **Guidance on good cell culture practice: a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice**. ATLA 33, 261-7, 2005. Disponível em: <<http://ecvam.jrc.it/>>. Acesso em 12/04/2011.

Costa MAF, Costa MFB. **Biossegurança de A a Z**. Rio de Janeiro: Publit; 2009.

Derouazi M, Martinet D, Besuchet N, Flaction R, Wicht M, Bertschinger M *et al.* **Stability and cytogenetic characterization of recombinant CHO cell lines established by microinjection and calcium phosphate transfection**. Cell technology for cell products: Proceedings of the 19th ESACT Meeting; 2005 Jun 5-8; Harrogate (Reino Unido). Reino Unido: Springer; 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/978-1-4020-5475-4#section=340114&page=1&locus=35>>. Acesso em 12/04/2011.

Doyle A, Griffiths JB. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology**. Reino Unido: John Wiley & Sons Ltd; 1999. Cap.1.2: Cell lines for biotechnologists. Cap.1.3: Master and working cell banks.

Dusing SK. **Cell line characterization**. In: Sofer G, Zabriskie DW. Biopharmaceutical process validation. BioReliance; 2000. Disponível em: <http://www.bioreliance.com/literature_res.aspx>. Acesso em 12/04/2011.

Etcheverrigaray M, Kratje R. **Controle de qualidade de produtos biotecnológicos**. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR (eds.). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Roca; 2008. p. 321-41.

Food and Drug Administration (FDA). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). **Draft guidance for industry: characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious diseases (draft guidance)**. Rockville, sep. 2006. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/ucm092122.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Draft of Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals**. Rockville, 12 jul. 1993. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/OtherRecommendationsforManufacturers/UCM062745.pdf>>. Acesso em 31/05/2011.

_____. **Guidance for industry: characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious diseases (versão final)**. Rockville, feb. 2010. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM202439.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

Freshney RI. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6^a ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2010. Cap. 1: Introduction. Cap. 2: Biology of cultured cells. Cap. 6: Safety, bioethics, and validation. Cap. 15: Characterization.

_____. **Introduction to basic principles**. In: Masters, JRW. **Animal cell culture – practical approach series**. 3 ed. New York: Oxford University Press, 2003. p.1-18.

Hartung T, Balls M, bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G *et al*. **Good cell culture practice: ECVAM good cell culture practice task force report 1**. ATLA 30, 2002: 407-14. Disponível em: <<http://ecvam.jrc.it/>>. Acesso em 12/04/2011.

Hay RJ, Miranda-Cleland M, Durkin S, Reid YA. **Cell line preservation and authentication**. In: Masters, JRW. **Animal cell culture – practical approach series**. 3 ed. New York: Oxford University Press, 2003. p.69-104.

Hochman G, Bhattacharya S. **Imunização, vacinas: passado e futuro**. Ciênc. Saúde coletiva. [on-line]. 2011. v.16 [capturado 11 mar 2011]; p.372. Disponível em:

<http://www.scielo.br/pdf/csc/v16n2/v16n2a01.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

Homma A, Martins RM, Leal MLF, Freire MS, Couto AR. **Atualização em vacinas, imunizações e inovação tecnológica**. Ciênc. Saúde coletiva. [on-line]. 2011. vol. 16 (2) [capturado 31 mar 2011]; p. 445-58. Disponível em:

<http://www.scielo.br/pdf/csc/v16n2/v16n2a08.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. **Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5**. *Nature*, 1970; 227:168-70.

Kistner et al. **Development of a Vero cell-derived influenza whole virus vaccine**. *Dev. Biol. Stand.* 1999;1998:101-10.

Kistner et al. **Cell culture (vero) derived whole virus (H5N1) vaccine based on wild type virus strain induces cross-protective immune responses**. *Vaccine*, 2007; 25(32):6028-36.

Léo P, Galesi ALL, Suazo CAT, Moraes AM. **Células animais: conceitos básicos**. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR (eds.). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Roca; 2008. p. 15-41.

Martinet D, Derouazi M, Besuchet N, Wicht M, Beckmann J. **Karyotype of CHO DG44 cells**. *Cell technology for cell products: Proceedings of the 19th ESACT Meeting*; 2005 Jun 5-8; Harrogate (Reino Unido). Reino Unido: Springer; 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/978-1-4020-5475-4#section=340114&page=1&locus=35>>. Acesso em 12/04/2011.

Mellado MCM, Castilho LR. **Proteínas recombinantes terapêuticas**. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR (eds.). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Roca; 2008. p. 384-402.

Montagnon et al. **Experience with Vero cells at Pasteur Mérieux Connaughx**. *Dev. Biol. Stand.* 1999;1998:137-40.

Moraes AM, Mendonça RZ, Suazo CAT. **Meios de cultura para células animais**. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR (eds.). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Roca; 2008. p. 105-21.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Environmental monitoring of clean rooms in vaccine manufacturing facilities - draft document: points to consider for manufacturers of human vaccines**. Genebra: WHO, 27 fev 2011. Disponível em: <http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/env_monitoring_cleanrooms_draft.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Evaluation of cell substrates for the production of biologicals: revision of WHO recommendations**. Report of the WHO study group on cell substrates for the production of biologicals. Bethesda: WHO; 23-23 apr 2009. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/publications/meetings/areas/vaccines/cells/Cell_Subst_Final_MtgReport_22_July_09_IK.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Good manufacturing practices for biological products** (annex 1). Geneva: WHO Technical Report Series, n° 822; 1992. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/biological_products/WHO_TRS_822_A1.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Good manufacturing practices for pharmaceutical products: main principles** (annex 4). Geneva: WHO Technical Report Series, n° 908; 2003. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_908.pdf#page=46>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations** (OMS, 2004a). Geneva: WHO Technical Report Series, n° 924; 2004. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/clinical_evaluation/035-101.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Guidelines for assuring the quality of pharmaceutical and biological products prepared by recombinant DNA technology (annex 3)**. Genebra: WHO Technical Report Series, n° 814; 1991. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/rdna/WHO_TRS_814_A3.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Laboratory Biosafety Manual** (OMS, 2004b). Genebra: WHO, 3ª ed; 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Meeting report of the WHO study group on cell substrates for production of biologicals**. Geneva: WHO; 11-12 jun 2007. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/publications/meetings/areas/vaccines/cells/Cells.FINAL.Mtg_Rep.IK.26_Sep_07.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks (draft version)**. Geneva: WHO; mai 2010. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/cells/Cell_Substrates_for_public_consultation_HK_4_May2.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals (Addendum 2003)**. Geneva: WHO Technical Report Series, n° 927; 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/cells/ANNEX-4-Animal-cellsP135-137.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals (requirements for biological substances n° 50)**. Geneva: WHO Technical Report Series, n° 878; 1998. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/cells/WHO_TRS_878_A1Animalcells.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

Porter AJ, Dickson AJ, Barnes LM, Racher AJ. **Antibody Production by GS-CHO Cell Lines over Extended Culture Periods**. Cell technology for cell products: Proceedings of the 19th ESACT Meeting; 2005 Jun 5-8; Harrogate (Reino Unido). Reino Unido: Springer; 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/978-1-4020-5475-4#section=340114&page=1&locus=35>>. Acesso em 12/04/2011.

Rodrigues MTA, Moro AM. **Aspectos regulatórios**. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho LR (eds.). **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Roca; 2008. p. 342-64.

Shen AY, Van de Goor J, Zheng L, Reyes AE, Krummen LA. Recombinant DNA technology and cell line development. In: Ozturk SS, Hu WS (eds). **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. EUA: Taylor and Francis Group; 2006, p. 15-41.

Sudman S, Bradburn NM. **Asking questions: a practical guide to questionnaire design**. 1^a ed. United States: Jossey-Bass Inc.; 1982.

Tauber H et al. **Safety and immunogenicity of a Vero-cell-derived inactivated Japanese encephalitis vaccine: a non-inferiority, phase III, randomized controlled trial**. *Lancet*, 2007; 370(9602):1847-53.

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). (EMA, 2002a)Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). **Cell culture inactivated influenza vaccines: annex to note for guidance on harmonization of requirements for influenza vaccines (CPMP/BWP/214/96)**. CPMP/BWP/2490/00. London, 17 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/bwp/249000en.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Note for guidance on the development of vaccinia virus based vaccines against smallpox**. London, 01 jul. 2002. CPMP/1100/02. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/vwp/110002en.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Production and quality control of medicinal products derived by recombinant DNA technology (3AB1a)**. London, jul. 1995. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/bwp/3ab1aen.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Position paper on viral safety of oral poliovirus vaccine (OPV)**. CPMP/BWP/972/98. London, 28 may. 1998. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/press/pp/097298en.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

_____. Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP). **Position paper on re-establishment of working seeds and working cell banks using TSE compliant materials**. EMA/22314/02. London, 10 sep. 2002. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/press/pp/2231402en.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Position statement on DNA and host cell proteins (HCP) impurities, routine testing versus validation studies**. London, 10 jun. 1997. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/press/pos/038297en.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Position statement on the use of tumorigenic cells of human origin for the production of biologicals and biotechnological medicinal products**. London, 1 mar. 2001. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/press/pos/114300en.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses**. CPMP/BWP/268/95 3AB8A. 14 aug. 1996. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/bwp/026895en.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products**. EMA/410/01. Rev. 1, 28 jan. 2004. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/bwp/TSE%20NFG%20410-rev2.pdf>>. Acesso em 12/04/2011.

The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). **Addendum to ICH S6: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6(R1)**. 29 oct. 2009. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S6_R1/Step2/S6_R1_Step2_Guideline.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products Q5D**. 16 jul 1997. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5D/Step4/Q5D_Guideline.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Good Manufacturing Practices for active pharmaceutical ingredients Q7**. 10 nov 2000. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q7/Step4/Q7_Guideline.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6**. 16 jul. 1997. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S6_R1/Step4/S6_Guideline.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Quality of biotechnological products: analysis of the expression construct in cells used for production of r-DNA derived protein products Q5B**. 30 nov. 1995. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5B/Step4/Q5B_Guideline.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. nov. 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

_____. **Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin Q5A(R1)**. 23 sep. 1999. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5A_R1/Step4/Q5A_R1_Guideline.pdf>. Acesso em 12/04/2011.

Unchern S. **Basic techniques in animal cell culture**. Drug Delivery System Workshop; 19-20 ago. 1999; Bangkok.

Valle S, Barreira Y, orgs. **Biossegurança – engenharia genética: legislação brasileira em 5 idiomas**. Rio de Janeiro: Publit; 2007.

Walsh G. **Biopharmaceutical benchmarks 2010**. Nature Biotechnol. Sep. 2010; 28: 917-24.

_____. **Pharmaceutical Biotechnology: concepts and applications**. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, 2007. Cap. 2: Protein structure.

Wood, JM et al. **The use of correlates of immunity in European Union licensing of influenza vaccines**. Dev. Biol. (Basel), 2003; 115:9-16.

Yin RK. **Estudo de caso: planejamento e métodos**. 3ª ed. Porto Alegre: Bookman; 2005.

Páginas da internet pesquisadas:

<<http://www.ctnbio.gov.br/>>

<<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>>

<http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_Product_Information/human/000721/WC500024632.pdf>

<<http://ecvam.jrc.it/>>

<<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/tabid/112/Default.aspx?SearchId=106>>

<<http://ccr.coriell.org/>>

<http://www.dsmz.de/identification/main.php?menu_id=2>

<<http://www.hpacultures.org.uk/collections/ecacc.jsp>>

< http://www.jhsf.or.jp/English/resource_panphlet.pdf>

<http://cellbank.nibio.go.jp/cellbank_e.html>

<<http://www.brc.riken.jp/lab/cell/english/inspection.shtml>>

<<http://www.cellbankaustralia.com/>>

<<http://cellbank.snu.ac.kr/english/index.php>>

<<http://ncbi.pasteur.ac.ir/>>

<<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-81&Template=cellBiology>>

<http://b200.nce.ufrj.br/bcrj/index.php?option=com_wrapper&Itemid=32>

<<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-171&Template=cellBiology>>

<http://b200.nce.ufrj.br/bcrj/index.php?option=com_wrapper&Itemid=32>

<<http://www.hpacultures.org.uk/products/cellines/generalcell/search.jsp>>

<<http://www.brc.riken.jp/lab/cell/english/inspection.shtml>>

<<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ComplianceActivities/Enforcement/CompliancePrograms/UCM095419.pdf>>

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/laboratorios#>>

<http://www.inmetro.gov.br/monitoramento_BPL/>

<<http://www.bcrj.hucff.ufrj.br/>>

<http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=57>

<http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=73&Itemid=68>

<<http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rbc/index.asp>>

<http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=87&Itemid=95>

<http://www.peq.coppe.ufrj.br/index.php?option=com_content&view=category&id=39&Itemid=69&lang=pt>

<www.2cristalia.com.br>

<<http://www.farmacore.com.br/index.php?item=emp>>

<<http://funed.totlab.com.br/servicos-e-produtos/visitas/>>

<<http://www.ial.sp.gov.br/>>

<<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/portifolio>>

<<http://www.butantan.gov.br/home/vacinas.php>>

<http://www.ipt.br/centros_tecnologicos/CTPP/linhas_de_atuacao>

<<http://www.receptabiopharma.com.br/>>

<<http://www.brbiotec.org.br/>>

<http://www.btdt.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado/tde_busca/resultado-tdes-prog.php>

<<http://pegasus.fmrp.usp.br/projeto/producao.htm>>

<http://www.hemobras.gov.br/site/conteudo/pesquisa_curso.asp>

<http://win.biominas.org.br/habitat/popup_empresas.asp?id=41>

<http://portal.tecpar.br/index.php?option=com_content&view=article&id=18&Itemid=100&lang=pt>

<http://www.bioreliance.com/literature_res.aspx>

<<http://www.criver.com/en-US/ProdServ/ByType/Biopharm/Manufacture/Pages/CellBanking.aspx>>

<<http://www.covance.com/products/nonclinical/biotechnology/cgmp-cell-banking.php>>

< <http://www.genibet.com/>>

<http://www.ibet.pt/Research/Animal_cell_technology/>

<http://www.lonza.com/group/en/products_services/Custom_Manufacturing/mammalian.html>

<http://www.who.int/bloodproducts/quality_safety/en/>

<<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/VaccinesandRelatedBiologicalProductsAdvisoryCommittee/UCM211830.ppt#314,2,Introduction>>

<<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/VaccinesandRelatedBiologicalProductsAdvisoryCommittee/UCM211843.ppt>>

<<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/VaccinesandRelatedBiologicalProductsAdvisoryCommittee/UCM211995.ppt>>

<<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/VaccinesandRelatedBiologicalProductsAdvisoryCommittee/UCM211995.ppt>>

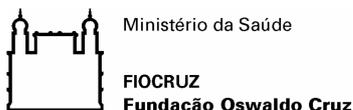
<http://www.lonzabio.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/18886_MycoAlert_Mycoplasma_Detection_Kit.pdf>

<<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/component/flippingbook/book/7>>

<portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/sanguetecidoorgaos>

ANEXOS

Anexo 1 - Questionário



Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Imunobiológicos (MPTI)
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz - RJ)
Questionário de dissertação – aluno: Rodrigo Martins Bretas

Dados Gerais:

1. Nome da Instituição: _____

2. Nome do Diretor: _____

3. Nome do responsável, cargo e Departamento (divulgação opcional conforme TCLE): _____

4. Em que categoria sua Instituição está incluída?

a. Pública

Federal

Empresa Pública

Estadual

Fundação Pública

Municipal

Sociedade de Economia Mista

Universidade

Outros – especificar: _____

b. Privada

Nacional Multinacional

Universidade

Outros – especificar: _____

Dados específicos:

5. Quais atividades abaixo sua Instituição realiza com culturas de células de mamíferos:

- a. pesquisa – descrição: _____

- b. estabelecimento de bancos: banco mestre banco de trabalho
- c. testes de caracterização (identidade, segurança ou estabilidade)
- d. produção
- e. comercialização
- f. outros – especificar: _____

Tipo celular	Origem (coleção)	Atividade	Produto ou Serviço

Comentários:

6. Quais os testes de identidade realizados nos bancos e qual a metodologia (p.ex.: método farmacopéico, validação *in house*):

Teste	Tipos celulares testados	Metodologia
Análise de isozimas		
Análise citogenética		
Antissoro		
Análise de DNA		
Cariótipo		
HLA		

Outros:

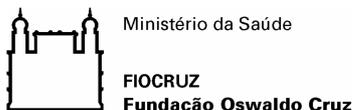
Observação: este questionário é aplicado acompanhado de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para uso da informação.

_____, ____/____/____.
(local) (data)

Rodrigo Martins Bretas

(assinatura do entrevistado)

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**

Título do projeto: “*Avaliação da capacidade instalada para produção e certificação de células animais*”.

Você está sendo convidado(a) para participar de uma pesquisa sobre culturas de células de mamíferos, desenvolvida pelo aluno Rodrigo Martins Bretas, sob orientação do Dr. Marcos da Silva Freire e Dra. Luciane Pinto Gaspar, como parte do curso de Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Imunobiológicos, oferecido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

_____, você foi selecionado(a) pelo seu notório saber em relação ao tema da pesquisa e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento, sem a necessidade de esclarecimentos ou explicações. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. Este estudo integra a metodologia de uma dissertação de mestrado, a qual tem como objetivo levantar a capacidade instalada no país para atividades que envolvam cultura de células de mamíferos, como pesquisa, produção e certificação de bancos.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder às perguntas de um questionário semi-aberto e emitir seus próprios conceitos relacionados ao tema da pesquisa.

Os benefícios relacionados à sua participação são de grande relevância devido ao aporte de conhecimentos a serem utilizados no âmbito nacional de pesquisa e produção com culturas de células. Com o uso da informação coletada, é esperado mapear o cenário nacional e o internacional para possíveis parcerias entre pesquisadores, produtores e laboratórios no que concerne aos produtos e serviços envolvendo células de mamíferos.

Os riscos e incômodos que poderão advir da sua participação são reduzidos, tendo em vista que serão divulgadas apenas as informações por você autorizadas. Este documento é elaborado em duas vias de igual teor, a serem assinadas e mantidas pelo pesquisador (entrevistador e autor da dissertação) e pelo sujeito de pesquisa (o entrevistado). Você pode se recusar a responder quaisquer perguntas que ocasionem constrangimentos. Você receberá uma cópia do questionário, bem como uma cópia deste Termo no qual consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. O pesquisador irá assegurar sigilo e não irá divulgar os dados de forma que possibilite a sua identificação; no entanto, vale explicitar que, dada a natureza do projeto, o número relativamente pequeno de sujeitos de pesquisa e a posição que estes ocupam nas instituições, pode ser possível a identificação dos referidos cientistas.

_____, ____/____/____
Local e Data

_____, ____/____/____
Local e Data

Pesquisador

Sujeito de pesquisa

Pesquisador: Rodrigo Martins Bretas - Farmacêutico
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos (Fiocruz)
Av Brasil, 4365 – Manguinhos – Rio de Janeiro
CEP: 21045-900
Tel: (21) 3882-9317/9381; (61) 3462-5591
e-mail: rodrigo.martins@bio.fiocruz.br

Anexo 3 – Proposta de guia

***GUIA PARA ESTABELECIMENTO E AVALIAÇÃO DE
SUBSTRATOS CELULARES VISANDO À PRODUÇÃO DE
MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS***

Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia - GESEF

Brasília, XX de XXXX de 20XX

Copyright © 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.

Depósito Legal na Biblioteca Nacional, conforme Decreto n.º 1.825, de 20 de dezembro de 1907.

Diretor-Presidente

Nome

Adjunto de Diretor-Presidente

Nome

Diretores

Nome 1

Nome 2

Nome 3

Chefe de Gabinete

Nome

Gerência Geral de Medicamentos

Nome

Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia

Nome

Participação direta:

Coordenação de Produtos Biológicos e Hemoterápicos (CPBIH)

Colaboração

Citar centros, institutos, universidades e empresas envolvidas nas discussões

Sumário

Lista de abreviaturas

1. Introdução

2. Considerações sobre produtos biológicos.....

2.1. Vacinas

2.2 Biofármacos

3. Estabelecimento de bancos de células.....

3.1. Sistema de bancos de células mestre e de trabalho

3.2. Boas Práticas de Fabricação

4. Caracterização de bancos celulares.....

4.1. Identidade

4.1.1 Cariologia

4.1.2 Análise de isoenzimas

4.1.3 Perfil genético

4.1.4 Outros testes

4.2 Segurança

4.2.1 Bactérias, fungos e micoplasma

4.2.2 Vírus e retrovírus

4.2.3 Prions

4.2.4 Tumorigenicidade e Oncogenicidade

4.3 Estabilidade

4.4 Boas Práticas de Laboratório e Acreditação

5. Referências bibliográficas.....

Lista de Abreviaturas

<i>ANVISA</i>	<i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i>
<i>BCM</i>	<i>Banco de Células Mestre</i>
<i>BCT</i>	<i>Banco de Células de Trabalho</i>
<i>BPF</i>	<i>Boas Práticas de Fabricação</i>
<i>BPL</i>	<i>Boas Práticas de Laboratório</i>
<i>FDA</i>	<i>Agência Americana de Alimentos e Drogas</i>
<i>HLA</i>	<i>Antígeno de leucocito humano</i>
<i>ICH</i>	<i>Confêrencia Internacional sobre Harmonização dos Requerimentos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucléico</i>
<i>EMA</i>	<i>Agência Européia de Medicamentos</i>
<i>MHC</i>	<i>Major histocompatibilitu complex – complexo maior de histocompatibilidade</i>
<i>OMS</i>	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction – Reação em cadeia da polimerase</i>
<i>RAPD</i>	<i>Random amplified polymorphic DNA - DNA polimórfico amplificado de forma randômica</i>
<i>RFLP</i>	<i>Restriction fragment lengh polymorphsim - polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição</i>

<i>SNP</i>	<i>Single nucleotide polymorphism - polimorfismo nucleotídeo único</i>
<i>SPF</i>	<i>Specific pathogen free- livre de patógeno específico</i>
<i>STR</i>	<i>Small tandem repeat - repetição pequena em tandem</i>
<i>TR</i>	<i>Transcriptase reversa</i>

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a biotecnologia está representada na área da saúde humana na forma de processos e produtos de alta complexidade. A cultura de microorganismos procariotos e eucariotos, de células de animais incluindo roedores, outros mamíferos e humanos, e ainda células de aves e insetos, tem sido a base tecnológica para obtenção de inúmeros medicamentos biológicos.

Substratos celulares são células empregadas na produção de medicamentos biológicos, e incluem as culturas de células primárias, as sementes celulares e os bancos de células mestre (BCM) e de trabalho (BCT).

A *caracterização* (ou *certificação*) é a determinação das propriedades de um determinado substrato celular, incluindo aspectos de *identidade*, *segurança* e *estabilidade*. Ela deve ser exaustiva para substratos novos, desenvolvidos como candidatos à fabricação de biológicos; culturas já bem caracterizadas podem passar por um programa reduzido de testes. Com base nessa caracterização, os substratos podem ser *qualificados* como adequados à produção de um medicamento biológico.

Este documento visa orientar os produtores nacionais quanto ao estabelecimento e à certificação de substratos celulares visando à fabricação de medicamentos biológicos para uso humano, com atenção aos atributos de qualidade, eficácia e segurança. As recomendações estão baseadas na legislação sanitária Brasileira vigente, bem como no entendimento científico atual da Anvisa, o qual se encontra em harmonia com os documentos relevantes publicados e de projeção internacional no âmbito regulatório. Abordagens diferentes daquelas propostas aqui podem ser adotadas, desde que devidamente justificadas e validadas.

O guia está especialmente focado nos requisitos para bancos mestre e de trabalho derivados de animais, como linhagens de mamíferos e de insetos. Estão excluídas do escopo as células originadas de plantas e microorganismos procariotos ou eucariotos (como *E. coli*, fungos e leveduras).

2. CONSIDERAÇÕES SOBRE PRODUTOS BIOLÓGICOS

Os produtos biológicos incluídos na RDC 55/2010 (ou suas posteriores revisões) são: vacinas, anticorpos monoclonais, biomedicamentos (extrativos e biotecnológicos), hemoderivados, soros hiperimunes e medicamentos contendo microorganismos vivos, atenuados ou mortos. Os alergênicos e probióticos também são biológicos, porém possuem regulamento próprio.

Apesar das diversas categorias de biológicos descritas acima, os medicamentos prováveis de serem obtidos por esta plataforma biotecnológica são as vacinas virais e as proteínas recombinantes. A

estratégia para caracterização deve ter abordagem específica em função do produto final, seu grau de pureza e uso – como via de administração e grau de exposição (p.ex.: regime posológico).

2.1 Vacinas

As vacinas virais são geralmente obtidas pela proliferação de vírus em células susceptíveis. Se houver lise, não haverá células ao fim da produção viáveis para alguns testes, logo devem ser usadas células (ou culturas) controle para estes fins. Tais células são cultivadas expostas às mesmas condições (como meios e reagentes) das células de produção, porém sem sofrerem infecção pelo vírus vacinal.

Como o processo fabril desta categoria de produto normalmente não inclui muitas etapas de purificação e redução de contaminantes, deve ser dada maior atenção a uma exaustiva certificação dos materiais biológicos de partida, incluindo os próprios substratos celulares, mas também os meios de cultivo, materiais derivados de animais como tripsina e soro, bem como os demais reagentes.

2.2 Biofármacos

Esta classe é representada pelas proteínas recombinantes produzidas em células modificadas geneticamente com a sequência de interesse. Estão incluídos os anticorpos monoclonais (biotecnológicos ou gerados pela técnica do hibridoma) e também os antígenos assim obtidos para comporem vacinas recombinantes.

O processo de fabricação dessas proteínas geralmente inclui etapas de redução dos contaminantes advindos das células e do processo, gerando um produto biológico terminado com alto grau de pureza. Conseqüentemente, a caracterização dos aspectos de segurança pode ser mais direcionada à validação das etapas de purificação do que aos substratos celulares.

3. ESTABELECIMENTO DE BANCOS DE CÉLULAS

3.1 Sistemas de bancos de células mestre e de trabalho

Todas as manipulações devem ser realizadas de acordo com a técnica asséptica e conforme as Boas Práticas em Cultura de Células, a fim de evitar contaminações adventícias e cruzadas.

Em geral, células parentais são pesquisadas como candidatas ao processo fabril e geram uma semente celular. Esta é expandida e dá origem ao BCM, que é ampliado por passagens seriais a fim de obter ampolas do BCT. As células deste banco podem ser inoculadas diretamente em biorreatores para a produção, ou podem ser subcultivadas para fornecer células de produção.

Devem ser definidos e documentados os reagentes e procedimentos realizados em cada estágio, bem como os detalhes para criopreservação das culturas.

3.2 Boas Práticas de Fabricação

O estabelecimento de um BCM a partir de certa semente celular, bem como do BCT a partir do BCM, deve ser realizado de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF), e tal verificação deve ser efetuada por inspeção por parte da Autoridade Sanitária competente (Vigilância Sanitária local e/ou Anvisa). O fabricante deve seguir a RDC 17/2010 (ou suas atualizações posteriores), com

especial atenção aos seguintes tópicos: registro e documentação; procedimentos operacionais padrão (POPs); calibrações de equipamentos; qualificações de equipamentos; validações de processo asséptico, limpeza e sistema de água.

As manipulações assépticas para estabelecimento de bancos celulares devem ser realizadas em ambiente classe A (cabine de fluxo laminar ou de biossegurança classe II) localizada em sala limpa de grau C. Alternativamente, se a manipulação for realizada em cabine classe III (isolador, sistema fechado), o ambiente circundante pode ser de classe D.

4. CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTRATOS CELULARES

Este guia apresenta as orientações sobre os testes disponíveis e recomendados a fim de avaliar os aspectos de identidade, segurança e estabilidade dos substratos celulares derivados de animais, usados na produção de medicamentos biológicos, incluindo culturas primárias, linhagens diplóides e contínuas (modificadas geneticamente ou não). Estes atributos devem ser avaliados como parte da garantia de que o medicamento terminado possua qualidade, eficácia e segurança¹⁵.

Com base no tipo de substrato escolhido e no processo de fabricação, o produtor deve estabelecer um programa de testagens a ser aplicado nos diferentes estágios de produção – semente celular, BCM, BCT e células do fim de produção (ou cultivadas um pouco além). Os métodos analíticos devem ser validados, quando aplicável, ou contar com controles a fim de demonstrar sua adequabilidade aos fins propostos. Os protocolos específicos podem ser adotados da Farmacopéia Brasileira, de outros compêndios reconhecidos pela Anvisa¹⁶ ou de documentos de projeção internacional, como os publicados pela OMS, ICH, EMA e FDA.

Em geral, os testes estão focados no BCM, que é representativo de todos os BCTs dele derivados. No entanto, o programa de qualificação pode ser concentrado em cada BCT, quando justificável (p.ex.: quando as reservas do BCM estiverem se esgotando).

4.1 Identidade

Culturas novas devem ser exaustivamente caracterizadas ao longo dos diversos estágios (semente celular, BCM, BCT, fim da produção). Já as linhagens bem caracterizadas e com procedência oficial podem passar por testes reduzidos ao fim da cultura.

Linhagens diplóides devem ser cariotipadas para averiguar sua estabilidade; devem ainda ser estudadas por algum método genético.

Linhagens contínuas e as humanas devem ter a autenticidade confirmada pela demonstração da espécie de origem e perfil genético.

¹⁵ A Lei 6360/76 define que um medicamento deve possuir identidade, atividade, qualidade, pureza e inocuidade, determinadas por comprovação científica e analítica.

¹⁶ Estão incluídas as Farmacopéias Alemã, Americana, Argentina, Britânica, Européia, Francesa, Internacional (OMS), Japonesa, Mexicana e Portuguesa, conforme RDC 37/2009 e suas atualizações.

Observações morfológicas e relativas às características de crescimento das células devem ser realizadas em todos os estágios.

4.1.1 Cariologia

O cariótipo determina a identidade no nível da espécie de origem, e é especialmente aplicável às linhagens diplóides novas. Contudo, a determinação do perfil citogenético pode ser empregada para avaliar possíveis marcadores específicos e acompanhar a estabilidade genética de linhagens contínuas (imortalizadas), pelo uso de técnicas como bandeamento G.

4.1.2 Análise de isoenzimas

Este teste fornece o perfil bioquímico e a identidade no nível de espécie de origem, com base no padrão eletroforético de formas variantes de enzimas (uso de 4 a 6 enzimas).

4.1.3 Perfil genético

Testes de DNA *profiling* ou *fingerprinting* são os mais específicos, fornecendo identidade no nível do indivíduo doador do tecido de origem. Exemplos de métodos incluem SNP, RAPD, RFLP e protocolos com PCR; técnicas com STR são especialmente úteis à autenticação de linhagens de células humanas.

4.1.4 Outros testes

Podem ser utilizados outros tipos de marcadores, especialmente para linhagens novas. Exemplos incluem o perfil imunológico de células humanas (HLA) e murinas (MHC); perfil antigênico por imunohistoquímica e imunocitoquímica; ensaios de hibridização de DNA e RNAm para detectar determinadas sequências específicas; pesquisa por proteínas características ou por atividade catalítica de enzimas particulares de determinado tecido.

4.2 Segurança

Deve ser investigada a presença de contaminantes exógenos (agentes adventícios) e endógenos (vírus e retrovírus), bem como a presença de resíduos da célula hospedeira com capacidade tumorigênica e oncogênica. Todas estas impurezas podem ser sujeitas a passos de redução, por inativação e/ou remoção, através do processo fabril, mas tais etapas devem ser validadas.

4.2.1 Bactérias, fungos e micoplasma

Os métodos microbiológicos devem ser empregados ao longo de todas as etapas (semente celular, BCM, BCT, fim da produção), e para todos os tipos de culturas (células primárias, linhagens diplóides e contínuas). Podem ser empregados os métodos oficiais que constam em farmacopéias e guias aceitos internacionalmente.

A pesquisa por *Micobacterium* pode ser realizada por métodos alternativos *in vitro*, com o uso de cultura ou PCR, devidamente validados. Estes testes devem, portanto, ser preferíveis, a menos que haja forte justificativa para manutenção do ensaio *in vivo*.

4.2.2 Vírus e retrovírus

Testes em camundongos adultos e neonatos

Podem ser adotadas as metodologias publicadas e reconhecidas internacionalmente; no entanto, devem ser adotados grupos controle para garantir a validade do ensaio.

Testes em cobaias

Estes ensaios são empregados a fim de detectar a presença principalmente de espécies de micobactéria (em especial *Mycobacterium tuberculosis*), mas também LCMV, paramyxovírus (como Sendai), reovírus e filovírus, a partir de células do BCM ou BCT; células do fim de produção devem ser testados uma vez por processo (e não a cada BCT).

Cinco porquinhos-da-índia por grupo (incluindo os grupos controle), pesando entre 350-450g, devem ser inoculados com 10^7 células viáveis em 5 mL pela via intraperitoneal e 0,1 mL pela rota intracerebral. Os animais devem ser monitorados para anormalidades diariamente por 42 dias. Os animais que morrem devem ser examinados por (histo)patologia e, se houver indício de infecção viral, é recomendável identificar o agente por métodos de cultura e/ou moleculares. Para a validade do ensaio, mais de 20% dos animais devem sobreviver nos grupos teste e controle; o critério de aprovação da amostra pressupõe que 80% das cobaias sobrevivam de forma saudável, e que nenhum apresente sinal de contaminação por agente transmissível ou infecção viral.

Testes em coelhos

A fim de detectar a presença do herpesvírus B em culturas primárias de macaco, é realizada inoculação de 1 mL pela via intradérmica (múltiplos locais) e ao menos 2 mL pela via subcutânea, contando com ao menos 10^7 células divididas igualmente entre cinco coelhos (por grupo) pesando entre 1,5-2,5 Kg. Os animais são observados diariamente por um mês para anormalidades; os que morrem devem ser examinados por (histo)patologia e, se houver indício de infecção viral, é recomendável identificar o agente por métodos de cultura e/ou moleculares. O ensaio deve contar com controles positivo e negativo, e mais de 20% dos animais devem sobreviver nos grupos teste e controle. Para a aprovação de uma amostra, 80% dos coelhos devem sobreviver de forma saudável, e nenhum deve apresentar sinal de contaminação por agente transmissível ou infecção viral.

Este ensaio *in vivo* deve ser realizado apenas quando houver forte justificativa para tal; caso contrário, deve ser substituído pelo teste em cultura celular contínua de rins de coelho.

Testes em ovos embrionados de galinha

Podem ser adotados os protocolos publicados e reconhecidos internacionalmente (OMS, FDA), os quais apresentam algumas diferenças. O ensaio deve ser realizado com 10 ovos por grupo, incluindo os que serão inoculados pela via alantóica, via do saco vitelínico e controles positivo e negativo. Não pode haver 20% de descarte em algum dos grupos (incluindo o controle negativo) por causa inespecífica, para fins de validade do ensaio. Devem ser usados, preferencialmente, ovos livres dos patógenos específicos (SPF) investigados pelo teste.

Testes para produção de anticorpos

Estes ensaios *in vivo* detectam uma ampla gama de patógenos espécie-específicos, em especial para células de roedores como *hamsters*, camundongos e ratos, mas também podem ser aplicáveis a

células de galinhas, e a culturas que possam ter sido expostas a agentes de roedores. Devem ser testados os bancos ou células ao fim da produção, referentes a um BCT, de culturas primárias, diplóides e imortalizadas, em animais SPF. É desejável que sejam desenvolvidos métodos de PCR para detecção dos vírus pesquisados, com a devida validação incluindo parâmetros como a sensibilidade, a fim de reduzir o uso de animais neste teste de controle de qualidade.

Testes em culturas de células indicadoras

Os lisados celulares e/ou o meio de cultura gasto, ou ainda as células intactas da amostra, são usados para inoculação direta ou para co-cultivo, respectivamente, pela inoculação em culturas de células indicadoras. Estas são apresentadas em monocamadas de células dos bancos ou do fim da produção, e permitem a detecção de várias famílias virais com atividade citopática, hemadsorvente e hemaglutinante. As células indicadoras devem contar com ao menos:

- uma cultura primária ou contínua derivada da mesma espécie e tecido que o substrato usado na produção;
- uma cultura de linhagem diplóide humana, especialmente para a detecção do vírus do sarampo;
- uma cultura de rim de macaco, para a detecção de vírus símios, especialmente se o substrato celular empregado na produção for de origem humana;

Devem ser usadas 10^7 células (ou o volume correspondente de lisado ou meio, ou ainda o volume equivalente a 500 doses ou 50 mL do granel ou coleta viral) em cada cultura indicadora, com observação para efeitos citopáticos por ao menos 2 semanas, e, opcionalmente, o sobrenadante pode ser inoculado novamente em culturas frescas para observação adicional por outras duas semanas, bem como mais ensaios para hemaglutinação e hemadsorção.

Estes testes supracitados devem ser realizados com o sobrenadante das culturas após o período de observação dos efeitos citopáticos. As hemácias usadas devem ser derivadas de galinhas, cobaias e macacos ou humanas do tipo O.

Quando houver susceptibilidade do substrato e suspeita de contaminação por citomegalovírus humano ou símio, as culturas indicadoras de células diplóides humanas devem ser observadas por no mínimo quatro semanas. Alternativamente, este método *in vitro* pode ser substituído por PCR.

A pesquisa por vírus de insetos deve ser realizada em adição aos testes anteriores, quando esse substrato celular for usado na produção. Possíveis contaminantes incluem os arbovírus, organismos transmitidos por artrópodes como os mosquitos, e que são potencialmente patogênicos ao homem. Podem ser adotados os protocolos publicados e de aceitação internacional.

Microscopia eletrônica de transmissão

Devem ser analisadas 200 células derivadas do BCM, BCT ou do final de produção, de linhagens diplóides e contínuas, por coloração negativa de cortes ultrafinos. Pode ser apropriado um pré-tratamento das culturas com agentes químicos capazes de estressar e induzir a produção de vírus endógenos e latentes. Células de insetos, além de passarem por esta indução, devem ser expostas a variações de temperatura e ser contadas em um número maior.

Retrovírus

(a) Ensaios para transcriptase reversa (TR)

Células de animais (como mamíferos) e insetos, obtidas do BCM ou BCT cultivado até o fim de produção (ou o sobrenadante destas culturas), devem ser testadas por PCR ou PERT. É possível adotar uma etapa de estresse para induzir a transcrição das sequências retrovirais integradas ao genoma da célula hospedeira. Por ser tratar de um método com alta sensibilidade, há chance de serem gerados resultados falso-positivos; neste sentido, um resultado positivo pode não ser conclusivo, sendo importante adotar controles (positivo e negativo), bem como avaliar a performance (pelos parâmetros de limite de quantificação, especificidade e reprodutibilidade) para a validade do ensaio. Um método para TR e o de infectividade se complementam, dado que os resultados (possivelmente falsos) positivos do primeiro podem ser confirmados pelo segundo.

(b) Testes de infectividade

A infecciosidade de retrovírus deve ser investigada usando-se células viáveis do banco, cultivadas até seu limite máximo *in vitro*, ou o sobrenadante. Isto é especialmente aplicável aos substratos de roedores, humanos e primatas não-humanos.

A amostra deve ser inoculada em culturas de células indicadoras apropriadas, a quais permitam o crescimento de uma ampla variedade de agentes virais. O protocolo pode prever ainda uma nova inoculação em culturas novas a fim de aumentar sua sensibilidade.

Este ensaio detecta apenas os contaminantes infecciosos; logo, um resultado negativo também pode ser complementado através da pesquisa pela enzima transcriptase reversa, pois tal ensaio detecta a presença dos retrovírus não infecciosos.

(c) Métodos moleculares

Métodos de PCR, acoplados ou não a *Southern Blot*, são aplicáveis à identificação específica de agentes virais conhecidos, em especial aqueles dificilmente cultiváveis e os sem efeito citopatogênico; vírus com genoma de RNA, através de PCR com a enzima TR; e técnicas de ELISA e imunofluorescência podem esclarecer resultados incertos obtidos por PERT. Podem ser detectados muitos vírus humanos e símios, bem como os vírus de inseto quando células desta origem forem utilizadas. O método deve ser validado.

4.2.3 Príons

O controle da encefalopatia espongiforme transmissível deve estar baseado no controle dos materiais de partida derivados de animais ruminantes, empregados no estabelecimento e manutenção das culturas de células. Exemplos de reagentes e suplementos incluem polissorbato, estearato, soro bovino e tripsina, para os quais toda documentação deve ser fornecida em conformidade à legislação vigente (RDC 305/2002, RDC 68/2003 e suas posteriores atualizações). Deve haver esforço para substituição das matérias-primas animais por outras de origem vegetal ou sintética.

4.2.4 Tumorigenicidade e Oncogenicidade

Este teste é especialmente aplicável a linhagens contínuas, a fim de investigar se a desregulação genética que sofreram a ponto de torná-las imortais tem a potencialidade de formar tumores *in vivo*. Tais linhagens devem ser consideradas tumorigênicas até que se prove o contrário;

não precisam ser testadas, no entanto, culturas sabidamente tumorigênicas, como hibridomas e aquelas derivadas de roedores. Devem ser usadas células do fim de produção (ou cultivadas por 3 duplicações populacionais adicionais).

Devem ser testadas células epiteliais humanas; linhagens diplóides novas e aquelas não caracterizadas previamente; e células em geral usadas na fabricação de biológicos pouco purificados, como vacinas de vírus vivos (atenuados).

Os estudos devem ser realizados em modelos animais imunossuprimidos e sem contaminações microbianas. As células usadas como o controle negativo (p.ex.: uma linhagem diploide bem caracterizada como MRC-5, WI-38) e o positivo (p.ex.: HeLa, com grande capacidade tumorigênica) devem ser submetidas às mesmas condições e procedimentos que as amostras investigadas. Devem ser injetadas 10^7 células em dez animais por grupo, com monitoramento por ao menos três meses (mas por até sete meses) para pesquisar a formação de tumores e metástases, com análise histológica da área injetada e de tecidos imunes proximais como nódulos linfáticos e baço, e ainda pulmões, rins, cérebro e fígado.

Linhagens identificadas como tumorigênicas devem ser investigadas quanto ao potencial oncogênico de suas substâncias intracelulares, como DNA (derivado da célula hospedeira ou de eventual vírus endógeno, latente ou retrovírus, bem como suas sequências genéticas) ou proteínas com atividade mitótica.

O protocolo inclui a inoculação do lisado de células ao fim de produção, ou preferencialmente com três duplicações populacionais extras. É inoculado o volume correspondente a 10^7 células em camundongos *nude*, ratos e *hamsters* recém-nascidos, com mais de dez animais por grupo, que são monitorados por ao menos seis meses para o desenvolvimento de nódulos no local de injeção e metástases. Deve-se avaliar a relação causal entre os nódulos surgidos com o material injetado, como base em exames histológicos (pois a malignidade formada deve ser derivada de tecido do animal em teste) e descontando os tumores que ocorrem espontaneamente em cada espécie, especialmente com a idade avançada dos animais.

4.3 Estabilidade

Devem-se caracterizar as células ao fim de produção (ou cultivadas um pouco além, a fim de representar o pior cenário possível) uma vez para cada processo ou produto. O objetivo da estabilidade é demonstrar a manutenção das características (como identidade e estabilidade genética) e ausência de introdução de agentes adventícios ao longo do processo fabril.

É fundamental que se defina e controle a idade máxima *in vitro* para cada cultura, como parte da qualificação de um determinado substrato celular, bem como da validação do seu processo de fabricação. Esta idade pode ser medida através de: (a) número de duplicações populacionais; (b) número de passagens (tripsinização de células aderentes ou diluição para as que crescem em suspensão); ou (c) tempo decorrido em cultura (mensurado em horas, dias, etc.).

4.4 Boas Práticas de Laboratório e Acreditação

Os laboratórios responsáveis pelos testes de certificação de substratos celulares devem ser auditados a fim de comprovar a existência e adesão a um programa de qualidade. Podem ser aceitas avaliações como o reconhecimento em BPL para os ensaios de segurança realizados por área de conhecimento; acreditação ISO 17025:2005 pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e

Qualidade Industrial (Inmetro) para cada ensaio analítico ou calibração; e certificação quanto às BPF pela GGIMP/Anvisa, para laboratório analítico inserido em indústria.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). **ABNT NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2 ed. Rio de Janeiro, 2005.
2. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada nº 17 de 16 de abril de 2010**. BPF. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 abr. 2010; Seção 1, n.73, p.94.
2. _____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 37 de 06 de julho de 2009**. Na ausência de monografia oficial de matéria-prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais inscritos na Farmacopéia Brasileira. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 08 jul. 2009; Seção 1, n.128, p.40.
3. _____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 55 de 16 de dezembro de 2010**. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 17 dez. 2010; Seção 1, n.241, p.110.
4. _____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº. 68 de 28/03/03**. Estabelece condições para importação, comercialização, exposição ao consumidor produtos incluídos na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 305, de 14 de novembro de 2002. Brasília, 2003.
5. _____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 249 de 13 de setembro de 2005**. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de produtos intermediários e insumos farmacêuticos ativos. República Federativa do Brasil. Brasília, 2005.
6. _____. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 305, de 14 de novembro de 2002**. Ficam proibidos, em todo o território nacional, enquanto persistirem as condições que configurem risco à saúde, o ingresso e a comercialização de matéria-prima e produtos acabados, semi-elaborados ou a granel para uso em seres humanos, cujo material de partida seja obtido a partir de tecidos/fluidos de animais ruminantes, relacionados às classes de medicamentos, cosméticos e produtos para a saúde, conforme discriminado. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 18 nov. 2002; Seção 1, n.222, p.60.
7. _____. **Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 02 jun. 2003; Seção 1, n.104, p.56.
8. Brasil. **Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976**. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 24 set. 1976.
9. Bretas RM. **Avaliação da capacidade instalada para produção e certificação de células animais**. Rio de Janeiro; 2011. Mestrado [Dissertação em Tecnologia de Imunobiológicos] – Fundação Oswaldo Cruz.
10. Food and Drug Administration (FDA). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). **Guidance for industry**: characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious diseases (versão final). Rockville, feb. 2010.

11. Organização Mundial da Saúde (OMS). **Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks (draft version)**. Geneva: WHO; 2010.
12. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). **Production and quality control of medicinal products derived by recombinant DNA technology (3AB1a)**. London, jul. 1995.
13. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). **Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products Q5D**. 16 jul 1997.