

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Rosane Cuber Guimarães

**PROPOSTA DE ARCABOUÇO REGULATÓRIO E AVALIAÇÃO DO RISCO
SANITÁRIO E DE BIOSSEGURANÇA PARA A PRODUÇÃO DE VACINA FEBRE
AMARELA DE SUBUNIDADE UTILIZANDO PLATAFORMA VEGETAL**

Rio de Janeiro

Junho, 2016

Rosane Cuber Guimarães

**PROPOSTA DE ARCABOUÇO REGULATÓRIO E AVALIAÇÃO DO RISCO
SANITÁRIO E DE BIOSSEGURANÇA PARA A PRODUÇÃO DE VACINA FEBRE
AMARELA DE SUBUNIDADE UTILIZANDO PLATAFORMA VEGETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Antônio Eugenio Castro Cardoso de Almeida

Marcos da Silva Freire

Rio de Janeiro

Junho, 2016

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Guimarães, Rosane Cuber

Proposta de Arcabouço Regulatório e Avaliação do Risco Sanitário e de Biossegurança para a Produção de Vacina Febre Amarela de Subunidade Utilizando Plataforma Vegetal / Rosane Cuber Guimarães. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2016

248 f., il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.
Orientadores: Antônio Eugenio Castro Cardoso de Almeida, Marcos da Silva Freire.

1. Plantas Produtoras de Biológicos. 2. Vacina de Febre Amarela de Subunidade. 3. Regulação. 4. Análise de Lacunas. 5. Análise de Risco à Qualidade. 6. Biossegurança. I. Título.

Proposed regulatory framework and evaluation of health risk and biosafety for Yellow Fever subunit vaccine production using plant-based platform.

Rosane Cuber Guimarães

PROPOSTA DE ARCABOUÇO REGULATÓRIO E AVALIAÇÃO DO RISCO SANITÁRIO E DE BIOSSEGURANÇA PARA A PRODUÇÃO DE VACINA FEBRE AMARELA DE SUBUNIDADE UTILIZANDO PLATAFORMA VEGETAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovada em ____/06/2016

BANCA EXAMINADORA

Fabio Coelho Amendoeira (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Elena Cristina Caride (Doutor)
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos / Fiocruz

Maritse Silveira (Doutor)
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

Antônio Eugenio Castro Cardoso de Almeida (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marcos da Silva Freire (Doutor) – Orientador
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos / Fiocruz

*Dedico este trabalho a Robson, Tomaz e Theo,
que são minha inspiração, minha motivação
e meu porto seguro.
Com muito amor e gratidão sincera.*

AGRADECIMENTOS

Segundo o pensador Thoreau, “O custo de uma coisa é a quantidade de vida trocada por ela, imediatamente ou a longo prazo”. Foram quatro anos ou melhor 1.550 dias dedicados a este projeto e tenho muitos agradecimentos a fazer:

Primeiro a Deus, por me proporcionar a perseverança necessária, a força para fazer melhor mantendo a simplicidade e a fé que me faz acreditar que tudo é possível.

Ao Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida, meu orientador, pela confiança e estímulo na realização deste trabalho.

Ao Dr. Marcos da Silva Freire, vice-diretor de desenvolvimento tecnológico de Bio-Manguinhos e meu co-orientador, pelo apoio e valiosa contribuição para a concretização deste trabalho.

À Dra. Elena Cristina Caride, Gerente do Programa de Vacinas Virais de Bio-Manguinhos, pelo acolhimento, confiança e suporte que dedicou a mim e a este trabalho; por incentivar e inspirar meu crescimento profissional com valores de competência, empatia e resiliência.

À Coordenação do Curso de Doutorado, em especial à Dra. Kátia Christina Leandro. Ao Dr. Fábio Coelho Amendoeira e demais professores, que contribuíram para enriquecer meu horizonte no campo da vigilância sanitária.

À equipe da Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology, em especial aos Doutores Vidadi Yusibov, Stephen J. Streatfield e Brian J. Green por me receberem com carinho e me proporcionarem todo o conhecimento do processo de fabricação e controle de qualidade de biológicos em plataforma vegetal.

Quero agradecer especialmente a todos os Gerentes do Programa de Vacinas Virais, pois eles muito cooperaram para que eu pudesse levar avante o meu crescimento profissional e minhas propostas e me proporcionam um convívio feliz e com muitas risadas.

Às minhas queridas Nanás: Marcia Denegri Lima, Alaíde Aline Xavier Leal, Debora Michele Morone D’Aiuto, Ester Ribeiro de Figueiredo, Patrícia Soares Pereira da Silva, pela amizade verdadeira, pelos conselhos valiosos e por simplesmente estarem presentes em todas as vitórias e percalços da minha jornada profissional na Fiocruz.

À equipe do LATEV, em especial ao André, a Marisol e a Carol por estarem sempre dispostos e a postos para o Projeto Vacina de Febre Amarela de Subunidade.

Ao Robson, meu marido, e aos meus filhos, Tomaz e Theo, pelo apoio e tolerância durante todo este período.

À minha mãe e ao meu pai (in memoriam), pela minha feliz existência.

Por fim, agradeço aos parentes e amigos, que, direta ou indiretamente, me apoiaram, incentivaram e torceram por mim em mais esta investida.

Os gregos tinham dois deuses da saúde: Esculápio e Hygieia, terapia e prevenção, respectivamente. A medicina no século XXI retém esses dois conceitos, e vacinação é um meio poderoso de prevenção. A informação sobre as vacinas que, juntamente com o saneamento, tornaram a sociedade moderna possível, é imprescindível e que, se sabiamente utilizada continuará a conceder à humanidade o dom da prevenção, que de acordo com o provérbio vale muito mais do que a cura.

Stanley A. Plotkin

RESUMO

O uso de células vegetais e plantas inteiras para sintetizar proteínas que são posteriormente processadas, reguladas e vendidas como medicamentos já é uma realidade mundial. Todavia, o arcabouço regulatório para a plataforma vegetal ainda não está bem estabelecido no mundo e muito menos no Brasil. Sendo uma vacina baseada na produção de antígenos em plantas e considerando que até 2016 nenhuma vacina produzida em plantas foi aprovada para uso em humanos, este estudo se propôs a analisar a produção de vacina de Febre Amarela de subunidade utilizando como inovação uma plataforma tecnológica vegetal, enfatizando o arcabouço regulatório e a legislação de Biossegurança. Neste trabalho foi realizada uma extensa revisão bibliográfica nas normas e diretrizes regulatórias e de biossegurança do Brasil que tratem da produção de biológicos em plataformas vegetais, foi feita uma comparação com a regulação de outros países como Estados Unidos, Canadá, União Europeia, Cuba e Argentina e uma análise das lacunas existentes na regulação brasileira. Utilizando como estudo de caso o desenvolvimento da vacina de Febre Amarela de subunidade, produzida em plataforma vegetal e através do uso da ferramenta HACCP, levantamos todos os pontos críticos de controle do processo de produção, com seus respectivos parâmetros críticos de processos, bem como os controles de qualidade recomendados, correlacionando-os com requisitos de BPF. Através do uso do software BioRAM fizemos uma análise dos riscos de biossegurança da produção da vacina de Febre Amarela de subunidade produzida em plataforma vegetal e nossos resultados demonstram um risco de biossegurança muito baixo para este processo. Além disso, desenvolvemos um Protocolo de Produção de Banco de Células Master e de Trabalho em BPF de forma a estabelecer e caracterizar os bancos de células de *Agrobacterium tumefaciens*. Sugerimos que algumas regulações sejam revisadas e concluímos que as entidades regulatórias brasileiras devem estabelecer um arcabouço regulatório conjunto e inter-relacionado que permita a produção industrial mantendo todavia a proteção à saúde humana e animal e a proteção ao meio ambiente.

Palavras-chave: Plantas Produtoras de Biológicos. Vacina de Febre Amarela de Subunidade. Regulação. Análise de Lacunas. Análise de Risco à Qualidade. Biossegurança

ABSTRACT

The use of plant cells and whole plants to synthesize proteins that are further processed, regulated and sold as drugs is already a worldwide reality. However, the regulatory framework for plant-based platform is not well established in the world, much less in Brazil. Being a vaccine based on the production of antigens in plants and considering that by 2016 none plant-based vaccine was approved for use in humans; this study was to analyze the production of yellow fever vaccine subunit using as innovation a plant-based platform technology, emphasizing the regulatory framework and the Biosafety law. This work was carried out an extensive literature review on the standards and regulatory guidelines and biosafety in Brazil dealing with the production of biological products in plant-based platforms, a comparison was made with the regulation of other countries like the United States, Canada, European Union, Cuba and Argentina and a gap analysis in Brazilian regulation. Using as a case study the development of yellow fever subunit vaccine, produced in plant-based platform and through the use of HACCP tool, raise all critical control points in the production process, with the respective critical processes parameters, as well as recommended quality control, correlating them with GMP requirements. By using the software BioRAM we performed an analysis of biosafety risks of production of yellow fever vaccine subunit produced in plant-based platform and our results demonstrate very low risk of biosecurity for this process. Furthermore, we have developed a GMP Master and Working Cell Bank Production Protocols in order to establish and characterize banks of *Agrobacterium tumefaciens* cells. We suggest that some regulations should be reviewed and concluded that the Brazilian regulatory authorities should establish a joint regulatory framework and interrelated to allow industrial production whilst maintaining the protection of human and animal health and environmental protection.

Key words: Plant Molecular Farming. Yellow Fever subunit vaccine. Regulation. Gap Analysis. Quality Risk Assessments. Biosafety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biorreatores de célula de cenoura na Protalix – Israel.....	26
Figura 2 – Foto de biorreatores de <i>Physcomitrella patens</i>	27
Figura 3 – Maiores marcos no desenvolvimento comercial de produtos na plataforma vegetal.....	28
Figura 4 – Agroinfiltração de folhas de <i>N. tabacum</i> e <i>N. benthamiana</i> para a expressão transiente de genes.....	34
Figura 5 – Igreja de Santelmo – Buenos Aires, Argentina. Memória as vítimas da epidemia de 1871.....	37
Figura 6 – Mapa de áreas com e sem recomendação de vacina contra febre amarela.....	39
Figura 7 – Visão geral de um processo de gerenciamento de risco.....	49
Figura 8 – Árvore de perguntas para determinação dos PCC.....	57
Figura 9 – Metodologia de Avaliação de Risco em Biossegurança.....	59
Figura 10 – Número de artigos encontrados.....	60
Figura 11 - Composição da biblioteca de artigos por tópicos.....	62
Figura 12 - Organização dos entes envolvidos na regulação da plataforma vegetal...78	
Figura 13 – Fluxograma de produção do antígeno proteico em tecnologia de expressão transiente.....	81
Figura 14 – Desenho esquemático do processo de preparo de nutrientes.....	83
Figura 15 - Desenho esquemático do processo de cultivo de sementes.....	84
Figura 16 - Desenho esquemático do processo de semeadura e nebulização.....	85
Figura 17 - Desenho esquemático do processo de crescimento das plantas pré-infiltração.....	87
Figura 18 - Desenho esquemático do processo de pré-inóculo.....	88
Figura 19 - Desenho esquemático do processo de fermentação.....	89
Figura 20 - Desenho esquemático do processo de agroinfiltração a vácuo.....	91
Figura 21 - Desenho esquemático do processo de crescimento das plantas pós-infiltração.....	92

Figura 22 - Desenho esquemático do processo de colheita das plantas.....	93
Figura 23 - Desenho esquemático do processo de homogeneização.....	94
Figura 24 - Desenho esquemático do processo de clarificação.....	95
Figura 25 - Desenho esquemático do processo de cromatografia 1 – captura.....	97
Figura 26 - Desenho esquemático do processo de cromatografia de polimento.....	98
Figura 27 - Desenho esquemático do processo de ultrafiltração / diafiltração final....	100
Figura 28 – Representação esquemática do vetor pGR-DN-PR-YFE1T-BZip 28.....	103
Figura 29 –Gráfico de risco do processo de Coleta e preparo de suspensão viral - Vírus vacinal da Febre Amarela 17DD.....	129
Figura 30 – Gráfico de risco do processo de Fermentação – <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	130
Figura 31 – Gráfico de risco do processo de Agroinfiltração – <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	131
Figura 32 – Gráfico de risco do processo de Crescimento Pós- infiltração – <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	132
Figura 33 – Gráfico de risco do processo de Colheita – <i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	133
Figura 34 - Gráfico de risco do processo de Homogeneização – <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	134
Figura 35 - Gráfico de risco do processo de Clarificação – <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	135
Figura 36- Comparação de risco de biossegurança do vírus da Febre Amarela.....	139
Figura 37 – Proposição de novo modelo – discussão em Plataforma Vegetal.....	141
Figura 38 – Proposta de aplicação de BPF e Supervisão pela ANVISA de medicamentos biológicos produzidos em plantas inteiras.....	166

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Relatório de Instrução de Proposição preenchido – Apêndice D do documento de Boas Práticas Regulatórias.....	72
Quadro 2 – Identificação da planta hospedeira.....	102
Quadro 3 – Construção do vetor de expressão.....	103
Quadro 4 – Parâmetros de Processos Críticos (PPC) para fase de manutenção do estoque da planta hospedeira.....	106
Quadro 5 - Parâmetros de Processos Críticos (PPC) para fase de manutenção do estoque do vetor.....	108
Quadro 6 – Parâmetros de Processos Críticos (PPC) para fase de produção upstream.....	112
Quadro 7 – Parâmetros de Processos Críticos (PPC) para fase de produção downstream.....	116
Quadro 8 – Métodos de caracterização e critérios de aceitação propostos aplicáveis a YFE-1T.....	118
Quadro 9 – Possibilidade de Infecção – Transmissibilidade.....	122
Quadro 10 – Possibilidade de Exposição.....	123
Quadro 11 – Medidas de Mitigação em Biossegurança.....	124
Quadro 12 – Consequência da doença.....	126
Quadro 13 – Consequência secundária da doença.....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produtos farmacêuticos em plataforma vegetal.....	21
Tabela 2 – Modelos de plantas usadas para produção de biológicos.....	47
Tabela 3 – Visão geral da regulação atual da EU, EUA, Canadá sobre plantas produtoras de biológicos.....	65
Tabela 4 – Legislação vigente no Brasil relacionada a plantas, transgênicos e produtos biológicos.....	67
Tabela 5 – Análise de Lacunas entre a Legislação vigente no Brasil e outros países.....	68
Tabela 6 - Comparação da pontuação balanceada entre todas as operações unitárias contendo OGM do processo de produção da vacina de Febre Amarela de subunidade.....	136

LISTA DE SIGLAS

ACP	Ar comprimido puro
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHIS	Animal and Plant Health Inspection Service (Serviço de Inspeção da Saúde Animal e Vegetal)
BCA	Bicinchoninic acid assay (Ácido bicinconínico)
BCM	Banco de Células Mestre
BCT	Banco de Células de Trabalho
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BY-2	Linhagem celular de <i>Nicotiana tabacum cv.</i>
CCAD	Citotoxicidade Celular Anticorpo Dependente
CD 18	Proteína integrina beta 2
CD16	Receptor de Fc expresso em células NK
CDC	Center for Diseases Control (Centro de Controle de Doenças)
CECMED	Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (Agencia Regulatória Cubana)
CFIA	Canadian Food Inspection Agency (Agência Canadense de Inspeção Alimentar)
CGAL	Coordenação Geral de Apoio Laboratorial
CG-MS	Gas chromatography–mass spectrometry (Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa);
CHO	Célula de Ovário de Hamster
CIP	Cleaning in Place (Limpeza no local)
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DIECA	Diethyldithiocarbamic acid (Ácido dietilditiocarbâmico)
DO	Densidade óptica

EFSA	European Food Safety Authority (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
EMA	European Medicines Agency (Agência Regulatória Europeia)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	Environment Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental)
EU	Unidades de endotoxina
EUA	Estados Unidos da América
FA	Febre Amarela
FAS	Febre Amarela Silvestre
FAU	Febre Amarela Urbana
FCMB	Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology
FDA	Food and Drug Administration (Agência Regulatória Americana)
FMEA	Failure Mode and Effects Analysis (Análise do Efeito e Modo de Falha)
FMECA	Failure Mode, Effects and Criticality Analysis (Análise dos Efeitos e Criticidades dos Modos de Falha)
FTA	Fault Tree Analysis (Análise de Árvore de Falhas)
GCD	Glucocerebroside humana
GRAS	Generally Recognized as Safe (Artigo reconhecido com seguro)
H1N1	Vírus da influenza A
H5N1	Vírus da gripe aviária
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle)
HAZOP	Hazard Operability Analysis (Análise de Perigos e Operabilidade)
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
ICH	International Conference on Harmonisation (Conferência Internacional de Harmonização)

ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry (Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente);
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
IgG	Imunoglobulina G humana
IgM	Imunoglobulina M humana
IMAC	Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography (Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados)
ISTA	International Seed Testing Association (Associação Internacional de Testagem de Sementes)
LPI	Local Provável de Infecção
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mbar	milibar
MCD	Análise de sistema Multi Critérios de Decisão
MCTI	Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação
MS	Ministério da Saúde
NR	Nível de Risco
NT-1	Linhagem celular transgênica de <i>N.tabacum-1</i>
OD	Oxigênio dissolvido
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBO	Plant Biosafety Office (Escritório de Biossegurança de Plantas)
PCC	Ponto Crítico de Controle
pg	Picograma
PHA	Preliminary Hazard Analysis (Análise Preliminar de Perigos)
PMF	Plant Molecular Farming (conceito de produção de biológicos em plantas ou células de plantas)
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PPC	Parâmetro de Processo Crítico

ppm	Partes Por Milhão
PW	Purified Water (Água purificada)
RAS	Regras para Análise de Sementes
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rDNA	Ácido Desoxirribonucléico recombinante
RNA	Ácido Ribonucléico
RP-HPLC	Reversed-phase high-performance liquid chromatography (Cromatografia Líquida de alta performance em fase reversa).
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (eletroforese em gel de poliacrilamida)
SEC	Size Exclusion Chromatography (Cromatografia de exclusão por tamanho)
SIgA	Imunoglobulina A secretória humana
SIP	Steam in Place (Esterilização no Local)
TCD4+	Linfócitos T auxiliares efetores
T-DNA	DNA de transferência
TMV	Vírus do Mosaico do Tabaco
UE	União Européia
USDA	United States Department of Agriculture
USP	United States Pharmacopeia (Farmacopéia Americana)
VLP	Virus Like Particle (Partícula tipo Vírus)
WFI	Water For Injection (Água para injeção)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 – Produção de Biológicos em Plataformas Vegetais	19
1.1.1. Biorreatores de células de plantas.....	24
1.1.2. Expressão em tecido vegetal.....	27
1.2. Febre Amarela	36
1.2.1 A doença.....	36
1.2.1. Vacina de Febre Amarela de Subunidade.....	40
1.3. Aspectos Regulatórios e de Biossegurança em Plataformas Vegetais.....	42
1.3.1. Regulação em Plataformas Vegetais.....	42
1.3.2. Biossegurança em Plataformas Vegetais.....	44
1.4. Análise de Riscos.....	48
1.4.1. Análise de risco à Qualidade	48
1.4.2. Processo de avaliação de riscos	50
2. OBJETIVOS	52
2.1. Objetivo Geral	52
2.2. Objetivos Específicos.....	52
3. METODOLOGIA	53
3.1 – Revisão Bibliográfica.....	53
3.2 – Estudo Avaliativo – Análise de Lacunas	54
3.3 – Avaliação dos Riscos do Processo Produtivo.....	55
3.3.1. Ferramenta HACCP (<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>) Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle	56
3.3.2. Avaliação do risco de biossegurança.....	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1. Revisão Bibliográfica.....	60
4.2. Análise de lacunas na regulação brasileira	63
4.3. Análise de Risco – Expressão Transiente – Vacina Febre amarela Subunitária como modelo - estudo de caso.....	80
4.3.1. Descrição do processo de expressão transiente do antígeno proteico em vegetais.....	80
4.3.2. Aplicação do HACCP para identificação dos pontos críticos de controle e aplicação de BPF – requisitos propostos	101
4.3.3. Avaliação dos Riscos em Biossegurança.....	119
4.4. Proposições Regulatórias	140

4.4.1. Proposta de revisão da RDC 69 – Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos	140
4.4.2. Proposta de um Guia para Orientações de fabricação de vacinas e biofarmacêuticos produzidos em sistemas de expressão transiente totalmente aderidos as BPF para uso em Humanos.....	143
4.4.3 Arcabouço regulatório para registro de produtos biológicos produzidos em sistemas de expressão transiente totalmente aderidos as BPF para uso em Humanos.....	164
5. CONCLUSÕES	167
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169
7. APÊNDICE A - PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE BANCO DE CÉLULAS MESTRE E BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EM BPF.....	185
8. APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA VIGILÂNCIA SANITÁRIA EM DEBATE.....	220
9. APÊNDICE C - ARTIGO SUBMETIDO AO THE AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE	231
Dear Editor,	232
10. ANEXO A – Tabela de Pontuação de Riscos para todos os critérios.....	234

1. INTRODUÇÃO

1.1 – PRODUÇÃO DE BIOLÓGICOS EM PLATAFORMAS VEGETAIS

A produção de proteínas heterólogas através da tecnologia do DNA recombinante (rDNA) teve um profundo impacto na produção de proteínas industriais e farmacêuticas (EGELKROUT, et al, 2012). As proteínas recombinantes podem ser usadas como reagentes para diagnóstico, vacinas e biofármacos, e isto cria uma grande demanda para a produção das mesmas em escala industrial. A produção comercial de proteínas recombinantes tem sido tradicionalmente realizada através de fermentação microbiana ou através do uso de linhagens celulares de mamíferos, porém, estes sistemas possuem desvantagens em termos de custo, produção em escala e segurança, características que levaram pesquisadores a buscar novas alternativas (FISCHER, et al, 2004).

As plantas produzem uma vasta gama de produtos farmacologicamente ativos que têm sido usados há milhares de anos para prevenir e curar doenças como, por exemplo, os glicosídeos cardiotônicos obtidos da *Digitalis*, usados para insuficiência cardíaca, os alcalóides da vinca, com atividade antileucêmica, ou do jaborandi, com atividade antiglaucoma, ou fármacos como a emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina. A cada momento são relacionadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica como a forskolina, o taxol e a artemisinina (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Todavia, nos últimos 20 anos também se tornou possível usar plantas como uma plataforma de expressão heteróloga para proteínas recombinantes (FISCHER, et al, 2012).

O enorme progresso feito no genoma das plantas abriu a possibilidade de utilização de plantas como biorreatores para a fabricação de produtos farmacêuticos recombinantes, que podem variar desde imunógenos (peptídeos solúveis individuais ou estruturas mais complexas, tais como partículas semelhantes a vírus) aos adjuvantes, microbicidas e anticorpos monoclonais (BUONAGURO, 2011, In: *Plant-derived Vaccines: Technologies & Applications*).

A habilidade das plantas em expressar genes humanos foi estabelecida quando Barta e colaboradores em 1986 mostraram que tecido de calos indiferenciados de tabaco e girassol poderiam produzir transcritos de um gene fusionado de hormônio

do crescimento humano, embora neste caso nenhuma proteína fosse detectada. As primeiras proteínas terapêuticas potencialmente expressas em plantas foram a soroalbumina humana expressa em folhas de tabaco, folhas de batata e células em suspensão em 1990 (SIJMONS, et al, 1990 APUD FISHER, et al, 2012) e um anticorpo monoclonal que foi expresso em folhas de tabaco em 1989 (HIATT, et al, 1990 APUD FISHER, et al, 2012). Destes estudos pioneiros emergiu o conceito de “*molecular farming*”¹ que é a produção de proteínas recombinantes valiosas em plantas e células de plantas (Revisto por FISCHER et al, 2012).

De acordo com vários trabalhos publicados, embora ainda haja uma certa insegurança e conservadorismo na área industrial, as plantas vem emergindo como uma das mais promissoras plataformas de produção para os biológicos do futuro (Revisto por FISCHER, et al, 2004; BASARAN; RODRÍGUEZ-CEREZO, 2008; FAYE; GOMORD, 2015).

O entusiasmo pelo uso da plataforma vegetal pela comunidade científica retrata as várias vantagens previstas e percebidas do uso de plantas em comparação a outras plataformas de produção bem estabelecidas como a fermentação. Dentre estas vantagens podemos citar (i) o baixo custo de estabelecimento e manutenção de plantações farmacêuticas comparado a construção e operação de infraestrutura para fermentação em escala industrial; (ii) a escalonabilidade das plantas comparadas aos fermentadores; e (iii) o perfil de segurança favorável, dado pelo fato de que plantas não suportam a replicação de patógenos de mamíferos e muitas plantações podem ser classificadas na definição de “GRAS” do inglês “*generally regarded as safe*” baseada em gerações de experiência tanto de produtores, como de consumidores. Estes fatores levaram a um grande número de estudos de prova-de-princípio envolvendo uma faixa diversa e eclética de diferentes espécies de plantas e plataformas, e também a fundação de numerosas empresas *start-up* focando em uma única tecnologia (FISCHER et al, 2013).

Existem hoje cerca de 20 produtos farmacêuticos feitos de plantas em desenvolvimento como produtos potenciais (ver Tabela 1). Após 20 anos de pesquisa e desenvolvimento, os candidatos agora estão começando a fazer uma aparição no mercado.

¹ Molecular farming ou Molecular pharming é o conceito de produção de biológicos (anticorpos recombinantes monoclonais, vacinas de subunidades, imunomoduladores e enzimas humanas) em plantas ou células de plantas.

A Biotecnologia vegetal para a expressão de proteínas recombinantes agora engloba uma gama de diferentes tecnologias. As primeiras abordagens utilizando plantas transgênicas foram complementadas por novas técnicas, tendo em vista melhorar dramaticamente o rendimento e a consistência do produto (PAUL; MA, 2011).

Tabela 1 – Produtos farmacêuticos em plataforma vegetal

Produto	Classe	Indicação/ aplicação	Organização	Plataforma	Status em 2010	Status em 2016
Apo-A1 ^{Milano}	Proteína terapêutica	Doença Cardiovascular	SemBioSys Genetics, (Calgary, Canada)	Cártamo	Pré-clínico. Ainda em fase de desenvolvimento a partir de 03/2010.	Falência em 2012 Tasly-SemBioSys Pharmaceuticals, Ltd
			Plantechno srl. (Vicomoscano, Cremona, Itália)	Arroz transgênico	Pré-clínico. Pedido de Patente nos EUA (US2010/0168006 ^{a1}).	Ainda em desenvolvimento pré-clínico.
Insulina (SBS-1000)	Proteína terapêutica	Diabetes	SemBioSys Genetics	Cártamo	Fase I/II completada Q1 2009.	Falência em 2012 Tasly-SemBioSys Pharmaceuticals, Ltd
Glucocerebrosidase (UPLYSO)	Enzima terapêutica	Doença de Gaucher	Protalix (Carmiel, Israel)	Cultura de células de cenoura	Ensaio de Fase III completo setembro 2009. Atualmente disponível no programa de acesso expandido do FDA, o registro pleno sendo solicitado.	Aprovado e registrado em vários países incluindo EUA e Brasil como ELELYSO TM Taliglucerase alfa
Alpha-galactosidase (PRX-102)	Enzima terapêutica	Doença de Fabry	Protalix (Carmiel, Israel)	Cultura de células de cenoura	Pré-clínico.	Fase I/II em andamento (início agosto 2012) http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01678898
Glucocerebrosidase oral (PRX-112)	Enzima terapêutica	Doença de Gaucher	Protalix (Carmiel, Israel)	Cultura de células de cenoura	NA	Fase I em andamento (iniciada junho 2014)
Acetylcholinesterase (PRX-105)	Enzima terapêutica	Biodefesa	Protalix	Cultura de células de cenoura	Fase I (Março 2010)	Não aparece no pipeline da companhia em 2016.
Antitumor necrosis 21ator (Pr-anti-TNF)	Anticorpo	Artrite	Protalix (Carmiel, Israel)	Cultura de células de cenoura	Pré-clínico	Não aparece no pipeline da companhia em 2016.
Proteína de fusão anti-TNF (PRX-106)	Proteína terapêutica	Doenças inflamatórias	Protalix (Carmiel, Israel)	Cultura de células de cenoura	NA	Fase I concluída. Estudo de eficácia previsto para 2016.
DNase I (PRX-110)	Enzima terapêutica	Fibrose cística	Protalix (Carmiel, Israel)	Cultura de células de cenoura	NA	Fase I no 4º. Trimestre de 2015. Estudo de eficácia previsto para 2016.

Produto	Classe	Indicação/ aplicação	Organização	Plataforma	Status em 2010	Status em 2016
B-Glucosidase	Proteína terapêutica	Doença de Gaucher	Plantechno srl	Sementes de tabaco	Pré-clínico	Pré-clínico. Pedido de patente nos EUA (US 2006/0031965 A1. WO 03/073839 A2).
			TransPharma srl (Trieste, Italy)	Tabaco transgênico	Fase I	Não foi possível localizar site na internet.
2G12 IgG	Anticorpo	Profilaxia para HIV	Consórcio Pharmaplanta	Tabaco transgênico	Fase I (início Q2 2009)	Fase I concluído. Em desenvolvimento de formulações mais complexas para início de Fase II/III.
Interferon-alpha modified release (Locteron®)	Citocina	Hepatite C	Biolex Therapeutics (Pittsboro, NC, USA)	<i>Lemna</i> (Lentilha-d'água)	Fase IIb (Abril 2009- em andamento)	Pedido de falência em junho de 2012. A Synthon Biopharmaceuticals adquiriu os ativos da Biolex e atualmente tem monitorado a tecnologia a espera de sua maturação.
Plasma recombinante (BLX-155)	Enzima terapêutica	Profilaxia de trombose	Biolex Therapeutics	<i>Lemna</i> (Lentilha-d'água)	Pré-clínico	
Anti-CD20 mAb (BLX-301)	Anticorpo	Linfoma Não-Hodgkin's	Biolex Therapeutics	<i>Lemna</i> (Lentilha-d'água)	Pré-clínico	
Soro albumina humana	Proteína terapêutica	Manutenção da pressão plasmática do sangue	Agragen (Cincinnati, OH, USA)	Flax (Linho)	Pré-clínico	Agora atua na área de biocombustíveis utilizando <i>Camelina sativa</i> .
rHLF-Lactoferrina humana recombinante (VEN 100)	Proteína terapêutica	Diarreia associada a antibióticos	Ventria Bioscience (Fort Collins, CO, USA)	Arroz transgênico (Plataforma tecnológica ExpressTec)	Aplicação FDA GRAS retirado	Estudo Multicentrico de Fase III, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo em andamento https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01382199 As patentes referentes a lactoferrina humana foram todas adquiridas pela Ventria em 2012, para serem utilizadas em sua plataforma tecnológica ExpressTec.
			Meristem therapeutics (Clarmont-Ferrand, France)	Milho transgênico	Fase I	
Lysozyme (VEN 120)	Proteína terapêutica	Doença inflamatória intestinal (colite ulcerativa)	Ventria Bioscience	Arroz transgênico (Plataforma tecnológica ExpressTec)	Aplicação FDA GRAS retirado	Estudo clínico de Fase I em andamento. http://www.ventria.com/medicines
VEN 150	Proteína terapêutica	Inflamação crônica em pacientes HIV-positivos	Ventria Bioscience	Arroz transgênico (Plataforma tecnológica ExpressTec)	NA	Estudo clínico de Fase II. http://www.ventria.com/medicines
(RhinoRx)	Anticorpo monoclonal IgA secretório	Profilaxia de Rhinovirus	Planet Biotechnology (Hayward, CA, USA)	Folhas de Tabaco Transgênico	Fase II	Fase II
Guy's 13 SlgA (CaroRx)	Anticorpo monoclonal IgA secretório	Cáries dentárias	Planet Biotechnology	Folhas de Tabaco Transgênico	Fase II completa. Aprovado para uso na União Europeia, mas não comercializado	CaroRx™ está atualmente em um estudo clínico de Fase II nos EUA.

Produto	Classe	Indicação/ aplicação	Organização	Plataforma	Status em 2010	Status em 2016
Fator Intrínseco humano	Proteína terapêutica	Deficiência de vitamina B12	Cobento Biotech AS (Aarhus, Denmark)	<i>Arabidopsis</i> transgênica	Fase II completa. Comercializado na UE.	Site retirado do servidor.
Vacinas contra a gripe pandêmica e sazonal	Vacina (VLP)	Risco de transmissão de gripe	Medicago (Quebec City, Canada)	Proficia™ Expressão transiente <i>N. benthamiana</i>	Fase I completa Dec. 2009. Fase II Q4 2010.	Pandêmica H5 Fase II/III – autorização para uso em emergências. Sazonal quadrivalente Fase I/II Continua na próxima página
Vacina contra a gripe pandêmica intradérmica	Vacina (VLP)	Risco de transmissão de gripe	Medicago (Quebec City, Canada)	Proficia™ Expressão transiente <i>N. benthamiana</i>	NA	Fase I em andamento
Vacina contra raiva	Vacina (VLP)	Raiva	Medicago (Quebec City, Canada)	Proficia™ Expressão transiente <i>N. benthamiana</i>	NA	Desenvolvimento pré-clínico
ZMapp™	Anticorpos monoclonais	Ebola	Mapp Bio Inc e KBP	Expressão transiente <i>N. benthamiana</i>	NA	Fase II / III. Com status de Fast Track pelo FDA
MB66	Anticorpo monoclonal	Microbicida HIV / HSV	Mapp Bio Inc e KBP	Expressão transiente <i>N. benthamiana</i>	NA	Fase I em janeiro de 2016
Monômero recombinante HAC1	Vacina	Influenza H1N1	Fraunhofer USA CMB	Expressão transiente <i>N. benthamiana</i>	NA	Fase I concluída em colaboração com WRAIR/DARPA https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01177202
Antígeno Pfs 25	Vacina de Bloqueio de transmissão	Malária	Fraunhofer USA CMB	Expressão transiente <i>N. benthamiana</i>	NA	Fase I em andamento https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02013687
Antígeno PA-83	Vacina	Anthrax	Fraunhofer USA CMB	Expressão transiente <i>N. benthamiana</i>	NA	Fase I em andamento https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02239172
Vários anticorpos IgG anti-idiotipo	Vacina	Linfoma Não-Hodgkin's	ICON Genetics and NOMAD Bioscience	MagnICON Expressão transiente <i>N. benthamiana</i>	Fase I	Fase II/ III
Proteína do capsídeo do vírus Norwalk	Vacina Comestível (VLP)	Vacina para Norovirus	Grupo do Prof. Arntzen, Arizona State University	MagnICON Expressão transiente <i>N. benthamiana</i>	Fase I	Sem informações adicionais

Produto	Classe	Indicação/ aplicação	Organização	Plataforma	Status em 2010	Status em 2016
Moss-aGal (agalsidase)	Enzima terapêutica	Doença de Fabry	Greenovation	BryoTechnology <i>Physcomitrella patens</i>	Desenvolvimento inicial	Estudo clínico de Fase I
Vários	Fatores de crescimento e citocinas	Para cultura de células tronco	ORF Genetics	Orfeus™ Grão de cevada ou <i>N. tabacum</i>	Produtos comercializados	Produtos comercializados

FIM

O desenvolvimento tecnológico nesta área conduziu a um aumento do número de sistemas disponíveis bem desenvolvidos para a produção de medicamentos recombinantes em plantas. Muitas espécies de plantas são agora passíveis de manipulação genética. O uso de um determinado conjunto de elementos genéticos em combinação com o transgene de interesse tem permitido a expressão com alto rendimento tanto em raízes e folhas de linhagens de plantas transgênicas, bem como em expressão transiente em linhagens de *Nicotiana benthamiana* não transgênicas (PAUL; MA, 2011).

A seguir, destacam-se as características chave das principais plataformas de produção usando como exemplos produtos que estão em desenvolvimento. Estas plataformas de produção são os biorreatores de células de plantas e as formas de expressão em tecido vegetal – sementes, plantas transgênicas e expressão transiente.

1.1.1. Biorreatores de células de plantas

A maioria dos fármacos proteicos recombinantes disponíveis atualmente são produzidos em biorreatores de células de mamíferos, insetos, ou células microbianas. Os biorreatores de células vegetais possuem várias vantagens importantes de produção em relação aos sistemas convencionais: eles não abrigam patógenos humanos, e eles são geralmente mais baratos de operar e escalonar, devido à natureza robusta e exigências mais simples em relação aos meios de crescimento das células vegetais. Estes sistemas não estão sujeitos as várias desvantagens percebidas na produção de biológicos em sistemas de plantas inteiras, tais como: um potencial muito reduzido para o fluxo gênico de uma contaminação para o meio ambiente e para a cadeia alimentar, e uma maior compatibilidade com as normas de Boas Práticas de Fabricação vigentes. Mais importante, o processamento à jusante

(“*downstream*”) do produto pode ser simplificado pela comparativa falta de metabólitos secundários, fibras e óleos ou ceras, em comparação com a produção em plantas inteiras. Os desafios permanecem sobre o rendimento de muitos produtos em biorreatores de células de plantas, com rendimentos reportados para anticorpos recombinantes muito aquém daqueles relatados em sistemas de células (CHO) de mamíferos. Uma pesquisa recente sugere que essa disparidade pode ser pelo menos em parte, devido à falta de maturidade comparativa de sistemas de células de plantas no que diz respeito à composição do meio de cultura, design dos fermentadores, e engenharia molecular de linhagem de células (HOLLAND et al., 2010; DORAN, 2006).

Duas empresas estão ativamente envolvidas na produção de biológicos em sistemas baseados em cultura de células. A Dow Agrosiences (Indianapolis, IN, EUA) desenvolveu um sistema de biorreator de células de plantas (Concerto™) para a produção de vacinas veterinárias. O produto principal, uma vacina de subunidade contra a doença de Newcastle em aves, é produzido utilizando células transformadas de *N. tabacum-1* (NT-1), cultivadas em um biorreator não descartável tradicional (EUA pedido de patente US2008/0076177). Apesar de ter recebido aprovação regulatória em 2006 (Dowagro, 2006), nenhuma tentativa de comercializar este produto ainda foi feita, apesar de uma segunda vacina empregando esta tecnologia estar em desenvolvimento (Dowagro, 2007). Acredita-se que o baixo rendimento do produto. [8 ug / mL em meio de cultura, (EUA pedido de patente US2008/0076177)] possa ser o fator limitante para a produção comercial, com este sistema (PHAN et al, 2013).

A Protalix Biotherapeutics (Carmiel, Israel) empregou um sistema de utilização de células de cenoura em biorreatores descartáveis, de polietileno altamente escalonáveis para produzir três produtos candidatos (figura 1). A produção do principal candidato, glucocerebrosidase humana (GCD), foi descrito por SHAALTIEL et al, 2007 e é hoje, considerada o primeiro biofármaco de uso humano produzido em planta, aprovado pelo FDA e várias outras agências regulatórias incluindo a ANVISA. A GCD recombinante purificada a partir de células CHO (Cerezyme®; Genzyme, Cambridge, MA, EUA) está atualmente sendo utilizada como um tratamento eficaz para a doença de Gaucher, uma doença de armazenamento lisossomal que afeta principalmente os macrófagos. O uso de Cerezyme® é limitada pelo custo elevado associado com a produção e a modificação pós-produção enzimática de resíduos de glicanos necessárias para a absorção eficaz pelos macrófagos. A Protalix fez modificações

significativas na proteína para modificar a sua acumulação subcelular no interior das células, revelando a presença de glicanos adequados para a captação de macrófago, eliminando, portanto, o requisito de processamento adicional para expor estes ligantes (SHAALTIEL et al, 2007).

Figura 1 – Biorreatores de célula de cenoura na Protalix - Israel



Legenda: Sistema de utilização de células de cenoura em biorreatores descartáveis, de polietileno para produzir glucocerebrosidade humana

Fonte: (RATNER, 2010)

Outra abordagem ainda em desenvolvimento experimental é o uso do musgo *Physcomitrella patens*, que é adaptável ao crescimento em tanques de cultura e tem sido desenvolvido como uma plataforma de expressão para biológicos pela empresa Greenovation GmbH (Heilbronn, Alemanha; <http://www.greenovation.com>).

A *Physcomitrella patens*, como todas as outras plantas, é capaz de usar a luz como uma única fonte de energia. A Greenovation faz uso desta capacidade para cultivar este musgo em fotobiorreatores, que tem fontes de luz de alta performance instalados do lado de fora do tanque de cultura conforme figura 2.

Em contraste com os sistemas heterotróficos como culturas de células microbianas ou culturas de células de mamíferos, que requerem meios de cultura

muito mais complexos, este processo foto autotrófico se baseia no uso de meios bastante simples, puramente minerais. O benefício econômico é óbvio, não só devido ao próprio custo do meio, mas também se reflete no processamento à jusante em alta pureza inicial e etapas de purificação genéricas (DECKER; RESKI, 2007).

Sendo um eucariota superior, a *Physcomitrella* possui a maquinaria enzimática capaz de realizar modificações pós-traducionais complexas. Estas enzimas, por exemplo chaperones e glicosil-transferases, estão alinhadas ao longo da via de secreção, que é a via padrão utilizada para a produção da proteína recombinante pela tecnologia proprietária da Greenovation (SCHAAF et al, 2005).

Como resultado, os produtos são totalmente N-glicosilados com uma estrutura de N-glicanos que possuem alguns benefícios importantes tais como a ausência de α -1-6-fucose. Esta ausência foi comprovada como capaz de aumentar drasticamente a eficácia de produtos ligantes-IgG, aumentando a CCAD (citotoxicidade celular anticorpo dependente). Mecanicamente, este efeito é devido ao aumento de ligação a CD16 e tem grande potencial em aplicações oncológicas (BUETTNER-MAINIK et al., 2010; SCHUSTER et al., 2007).

Figura 2 – Fotobiorreatores de *Physcomitrella patens*



Legenda: Cultivo do musgo *Physcomitrella patens* em fotobiorreatores com fonte de luz de alta performance. Greenovation GmbH (Heilbronn, Alemanha). Acesso em 29/07/2014.

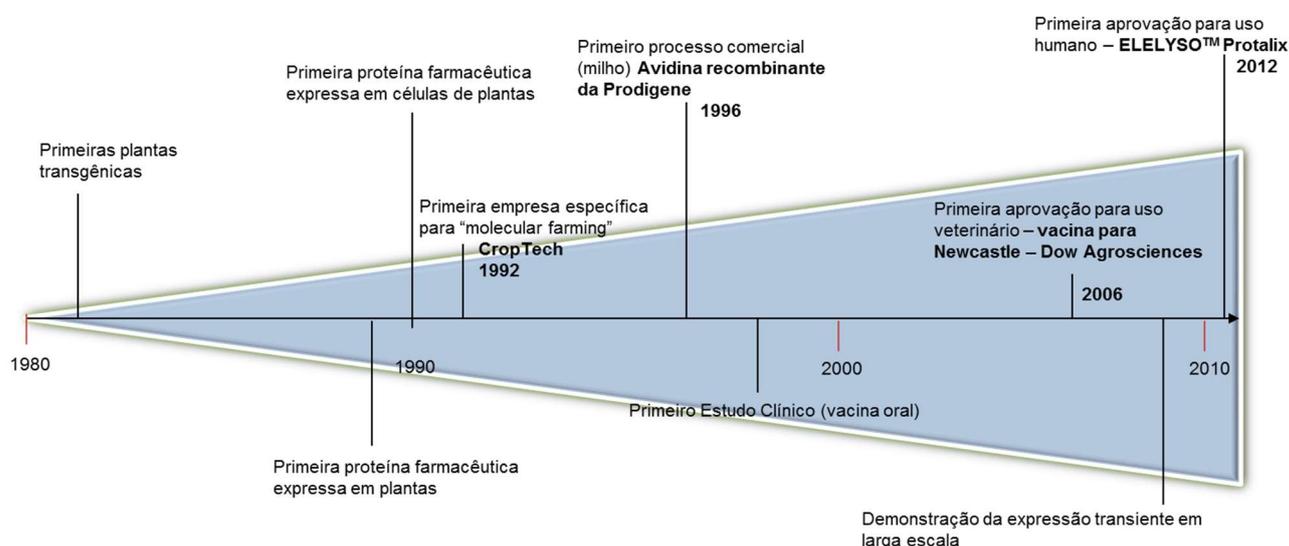
1.1.2. Expressão em tecido vegetal

Os primeiros produtos de proteínas recombinantes produzidos por biotecnologia vegetal que chegaram ao mercado não foram farmacêuticos e sim enzimas e reagentes para diagnóstico. Os processos de produção e purificação de avidina e beta-glucuronidase bacteriana para propósitos comerciais foram inicialmente

publicados em 1998 e comercializados através de uma colaboração entre as empresas Prodigene (College Station, TX, EUA) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) (Ver figura 3). Ambos os produtos são expressos em plantações transgênicas de milho em campo aberto, de forma a ter como vantagem competitiva o alto rendimento proteico desta plantação e a escala e economia das práticas agrônomas convencionais (EVANGELISTA, 1998; KUSNADI, 1998).

Embora várias empresas existentes tenham se interessado pela tecnologia no início dos anos 1990, o primeiro novo lançamento baseado em uma tecnologia vegetal específica foi da *CropTech Development Corp.* (Blacksburg, EUA) em 1992, seguida de perto pela *Applied Phytologics* (Sacramento, EUA) em 1993 (hoje *Ventria Bioscience*) e *SemBioSys Genetics Inc.* (Calgary, Canadá) em 1994. Isto foi seguido por uma enxurrada de lançamentos porém, poucas destas empresas continuam ativas atualmente. Uma destas empresas iniciais foi a *Prodigene Inc.* (College Station, EUA), fundada em 1996 e a primeira empresa a desenvolver um processo comercial e lançar um produto em plataforma vegetal (avidina recombinante de sementes de milho). A primeiras proteínas farmacêuticas para uso animal e humano foram aprovadas em 2006 e 2012 respectivamente (FISCHER et al., 2013). Os maiores marcos no desenvolvimento comercial de produtos em plataformas vegetais estão descritos na figura 3.

Figura 3 – Maiores marcos no desenvolvimento comercial de produtos na plataforma vegetal



Legenda: A primeira empresa com base na tecnologia de plataforma vegetal foi CropTech Development Corp. (Blacksburg, EUA), em 1992, seguida de perto pela Applied Phytologics (Sacramento, EUA), em 1993 (agora Ventria Bioscience) e SemBioSys Genetics Inc. (Calgary, Canada) em 1994. A Prodigene Inc. (College Station, EUA), foi a primeira empresa a desenvolver um processo comercial e lançar um produto na plataforma vegetal (avidina recombinante a partir de sementes de milho). As primeiras proteínas farmacêuticas para uso animal e humano foram aprovados em 2006 e 2012, respectivamente.

Fonte: (FISCHER et al., 2013) Adaptação e tradução da autora.

1.1.2.1. Sistemas baseados em sementes

A evolução do sistema de sementes proporciona uma enorme capacidade de adaptação as plantas gymnospermas e angiospermas, por causa das propriedades de dormência, armazenamento de nutrientes e do vigor da germinação. Muitas das propriedades únicas das sementes podem ser exploradas em aplicações de “*molecular farming*”, especialmente quando é desejável produzir grandes quantidades de uma proteína recombinante. Sementes de plantas transgênicas têm sido amplamente utilizadas para gerar matéria-prima para a extração e isolamento de proteínas e polipeptídeos, bem como proteínas complexas, como anticorpos e outras imunoglobulinas, os quais podem ser processados em produtos biofarmacêuticos valiosos (BOOTHE et al., 2010; SABALZA et al., 2013).

A extração e recuperação de proteínas recombinantes a partir de sementes é muito facilitada pelas suas propriedades de dormência, porque isto permite a estabilidade a longo prazo de produtos armazenados, incluindo proteínas recombinantes e uma dissociação de transformação a partir dos ciclos de crescimento e colheita. Além disso, o baixo teor de água e a relativamente baixa carga biológica das sementes pode ajudar muito na elaboração de processos de fabricação de baixo custo para o ingrediente farmacêutico ativo desejado (BOOTHE et al., 2010; SABALZA et al., 2013).

Neste sistema temos como exemplos de utilização a Cobento Biotech AS (Aarhus, Dinamarca) que desenvolveu um sistema de produção para o fator intrínseco humano recombinante (rhIF) baseado em *Arabidopsis thaliana*. (BOOTHE et al., 2010; PAUL; MA, 2011; SABALZA et al., 2013).

Uma abordagem orientada para a produção em sementes também foi demonstrada para outras plantas, incluindo cereais (milho, arroz, cevada e trigo), legumes (ervilha e soja), e na oleaginosa cártamo. A empresa Ventria Biosciences (Fort Collins, EUA) desenvolveu uma lisozima humana e a proteína lactoferrina como produtos derivados de grãos de arroz na sua plataforma tecnológica denominada

ExpressTec. Através de uma combinação de tecnologias, incluindo otimização de códons para arroz e o uso de promotores tecido-específicos altamente transcritos, pesquisadores foram capazes de obter um rendimento de 5 g/kg de grão de arroz descascado para lactoferrina, que pode ser considerado um rendimento ótimo quando comparado a tecnologias de produção tradicionais (BOOTHE et al., 2010; PAUL; MA, 2011; SABALZA et al., 2013).

A Ventria Biosciences, através de sua divisão de produtos não terapêuticos inVitria atualmente produz na sua plataforma tecnológica ExpressTec em BPF e comercializa sete (7) suplementos para cultura de células (Disponível em: <http://www.ventria.com/bioreagents>).

No Brasil, a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) que tem larga experiência no desenvolvimento de plantas transgênicas, está através do grupo de pesquisa do Professor Elibio Rech, expressando e caracterizando proteínas recombinantes funcionais com atividade farmacêutica em sementes de soja. Dentre estas moléculas podemos destacar as proteínas terapêuticas humanas: proinsulina, hormônio de crescimento humano e fator de coagulação IX; os anticorpos recombinantes: IgG1 humanizado anti-vírus herpes simplex, o anticorpo monoclonal IgM AcM 83D4 conhecido como scFvDIR83D4 usado no combate a células tumorais em glândulas mamárias e o anticorpo anti-CD18 usado para prevenção de injúrias cardíacas e por último os microbicidas recombinantes: cianovirina-N, griffithsina e scytovirina, todos utilizados na prevenção da transmissão do vírus HIV (CUNHA et al., 2013).

1.1.2.2. *Sistemas baseados em plantas transgênicas*

No início do uso de produção de proteínas farmacêuticas recombinantes usando a biotecnologia de plantas, a estratégia mais utilizada para a expressão destas proteínas era a introdução estável de construtos de expressão no genoma nuclear para originar linhagens de plantas transformadas de forma estável. Esta abordagem é vantajosa porque a transformação é um procedimento simples utilizado em muitas culturas domesticadas. É geralmente realizada por um ou dois métodos a saber: transformação mediada por *Agrobacterium* ou bombeamento de partículas de ouro revestidas com DNA. Uma vez que uma linhagem de planta transgênica seja estabelecida, ela se torna um recurso genético permanente (LUSSER et al, 2011).

As plantas transgênicas são consideradas por diversos autores em última instância, as mais escalonáveis dentre todas as tecnologias em plataformas vegetais. Isto se deve ao fato de que a linhagem transgênica utilizada pode ser utilizada para produzir sementes, que aumentam o número de plantas em cada geração. As sementes também podem ser usadas para estabelecer o banco de sementes mestre e de trabalho, que servem ao mesmo propósito dos bancos mestre e de trabalho das plataformas de cultura de células. A maior desvantagem das plantas transgênicas são os longos tempos para seu desenvolvimento e escalonamento, os rendimentos não-confiáveis de proteínas recombinantes por lote e as preocupações acerca do espalhamento de plantações farmacêuticas no meio ambiente e na cadeia alimentar pelo cruzamento e dispersão de sementes (MA et al, 2003; TWYMAN et al, 2003; TWYMAN et al, 2005).

A diversidade da plataforma transgênica é limitada apenas pelo número das diferentes espécies de plantas mundiais, mas o benefício de algumas espécies sobre outras já foi reconhecido (ALDERBORN et al, 2010; PAUL; MA, 2011,).

Este sistema consiste de plantações folhosas que geram uma grande quantidade de biomassa, sendo o exemplo principal o tabaco (*Nicotiana tabacum*). Esta espécie produz de 1-100 toneladas de biomassa de folha por hectare por ano dependendo do cultivar e método agrícola utilizado, e uma vez que não pertence a cadeia alimentar, possui um baixo risco de contaminação cruzada. Tabaco também é o modelo de laboratório preferido, por já ter as técnicas de transformação, regeneração e expressão transgênica bem caracterizadas e realizadas de modo eficiente (TWYMAN et al, 2005).

A empresa Planet Biotechnology (Hayward, California, EUA) tem obtido progresso no desenvolvimento do CaroRX™, uma imunoglobulina A secretória (SIgA) desenhada para bloquear a colonização da cavidade oral por *Streptococcus mutans* através da ligação com a proteína de superfície bacteriana adesina (ver tabela 1). SIgA é um complexo heterodecamérico consistindo de quatro cadeias pesadas, quatro cadeias leves, a cadeia j, e o componente secretório do receptor da poli imunoglobulina. O desenvolvimento da linhagem de tabaco transgênico expressando cada uma das quatro cadeias de proteína foi alcançado utilizando-se técnicas de cultivo convencionais. Neste exemplo, os anticorpos são produzidos a partir das folhas

em uma plantação em campo aberto no Kentucky, EUA (PLANET BIOTECHNOLOGY, 2008).

Os benefícios da produção de proteínas farmacêuticas recombinantes usando a biotecnologia de plantas – “*Molecular Farming*” em plantas transgênicas, também foram considerados como parte do projeto da União Europeia Pharma-Planta, em que oito produtos alvos foram inicialmente selecionados, indicados para uma série de doenças (HIV/AIDS, tuberculose, raiva e diabetes), todos caracterizados por terem uma grande população afetada e por isso a necessidade de produzir as proteínas correspondentes de forma barata e em uma escala maciça – de 100 kg a 1 ton. (ver <http://www.pharma-planta.net/>).

Dois anticorpos neutralizantes para HIV (2G12 e 2F5) foram escolhidos como produtos candidatos “*fast-track*” e tiveram seu desenvolvimento para produção priorizados. Ambas plantas transgênicas de tabaco e milho foram desenvolvidas como plataforma, tabaco devido ao grande rendimento de biomassa e milho devido a estabilidade do produto que poderia ser de grande valia no contexto de seu uso em países em desenvolvimento. Altos rendimentos de ambos os anticorpos foram alcançados nas duas plataformas utilizadas e também em células de tabaco BY-2 (RADEMACHER et al, 2008; RAMESSAR et al, 2008) *apud* (PAUL et al, 2013).

Um dos objetivos chave do projeto Pharma-Planta é levar um produto candidato do gene à clínica, definindo o caminho regulatório ao longo do processo pela consulta as autoridades apropriadas. Fato este que acabou por ser bem sucedido, resultando no estabelecimento de um processo aderente as Boas Práticas de Fabricação para a produção de 2G12 em folhas de tabaco transgênico e a conclusão bem sucedida de um estudo clínico de fase I para demonstrar a segurança (ver tabela 1) (FISCHER et al, 2012; MA et al, 2015).

1.1.2.3. Sistemas baseados em expressão transiente

Expressão transiente é um fenômeno que acontece quando genes são introduzidos nos tecidos das plantas e são expressos por um curto período sem a integração estável do DNA no genoma (JANSSEN; GARDNER, 1990) *apud* (PAUL et al, 2013).

Todos os processos de transferência dos genes levam a expressão transiente, e em cada caso o vetor que carrega o transgene – um plasmídeo no caso de

bombardeamento de partículas, uma sequência de T-DNA no caso de transformação mediada por *Agrobacterium*, e um genoma de vírus quimérico no caso de transdução viral – permanece episomal por um período variável de tempo, até que seja degradado. O único requerimento para alcançar a expressão transiente é que o transgene esteja colocado em um construto de expressão funcional, minimamente consistindo de um promotor e uma sequência de poliadenilação flanqueando a região codificadora, mas geralmente também contendo sequências adicionais desenhadas para aumentar a expressão do transgene ou para direcionar a proteína expressa para um compartimento subcelular específico (TWYMAN et al, 2013).

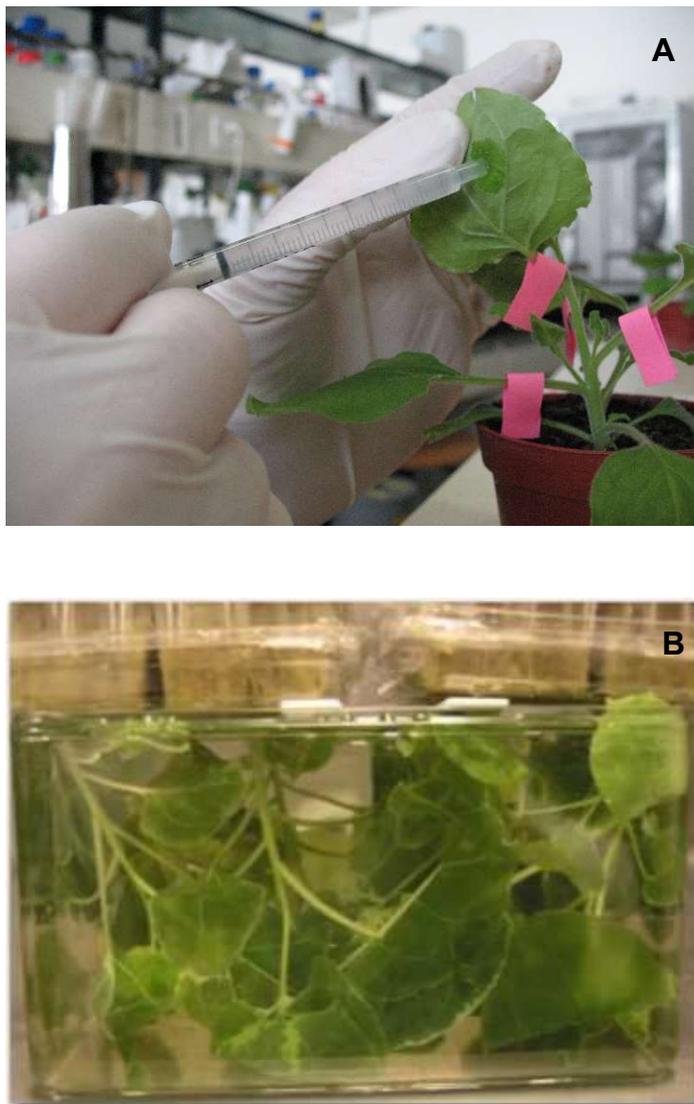
Muitas plataformas de expressão transiente são baseadas parcial ou totalmente em genomas de vírus de plantas porque estes possuem sequências que promovem a expressão do transgene, a replicação do vetor e/ou espalhamento sistêmico, com isso proporcionando um aumento no rendimento. O desenvolvimento comercial foi focado em sistema híbridos que incorporam componentes do sistema de transferência de T-DNA e função de replicação do vírus. Como exemplo pode-se citar a plataforma “*iBioLaunch*” da empresa iBio Inc. (Newark, EUA), que é um vetor auto-replicativo baseado no vírus do mosaico do tabaco (TMV) que é integrado em um sistema de plasmídeo binário típico utilizado pela *Agrobacterium tumefaciens*. A bactéria começa a infecção inicial das células da planta e o componente viral então, promove o espalhamento célula-á-célula e a amplificação do transcrito inicial (SHAMLOUL et al, 2014).

Uma das vantagens da estratégia de uso da expressão transiente é que ela pode ser usada para produzir dois ou mais produtos de genes diferentes ao mesmo tempo. Isto é alcançado utilizando cassetes de multi-expressão na plataforma *iBioLaunch* e também na plataforma *Proficia* desenvolvida pela empresa Medicago Inc. (Quebec City, Canadá) para a expressão transiente em alfafa (D’Aoust et al, 2010).

A bactéria recombinante carreando o vetor para a expressão transiente pode ser introduzida nas plantas usando uma seringa sem agulha, ferindo os tecidos das plantas com uma escova de aço antes da infiltração (ANDREWS; CURTIS, 2005) ou por inoculação pelo solo, porém a infiltração a vácuo precedida da imersão das folhas em uma suspensão de bactéria (ver figura 4) permanece como o método preferencial porque pode ser efetivamente escalonado e o processo inteiro pode ser realizado em

um ambiente BPF. As empresas: Icon Genetics, Medicago, e iBio Inc. usam infiltração a vácuo automatizada em suas linhas de produção (PAUL et al, 2013).

Figura 4 – Agroinfiltração de folhas de *N. tabacum* e *N. benthamiana* para a expressão transiente de genes.



Legenda: A figura **A** mostra a utilização de seringa sem agulha para infiltração da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* na folha de tabaco. Fonte: (DUGDALE, 2014). A figura **B** demonstra a utilização da infiltração a vácuo em uma solução de bactéria *Agrobacterium tumefaciens* em câmara de vácuo. Fonte: (SHAMLOUL et al, 2014).

A tecnologia de expressão transiente é comercialmente vantajosa apesar da ausência de recurso genético permanente porque os tempos de produção são muito menores do que as culturas celulares e culturas transgênicas e os rendimentos são excepcionais, da ordem de até 4 g/kg de folha fresca (30% do total de proteínas solúveis). A ausência de patógenos humanos é uma vantagem compartilhada por todas as tecnologias de plataforma vegetal, porém é uma força particular no caso de sistemas de expressão transiente porque estes podem ser utilizados no fornecimento de vacinas emergenciais em resposta a pandemias ou bioterrorismo (YUSIBOV; RABINDRAN, 2008).

A habilidade de produzir grandes quantidades de proteínas em um curto período de tempo e rapidamente escalar o processo de manufatura torna a tecnologia de expressão transiente ideal para atender o aumento da capacidade necessária para a fabricação de vacinas para doenças infecciosas emergentes. Durante a pandemia de H1N1, a Medicago avaliou a capacidade de seu sistema *Proficia* de fabricar vacina influenza e descreveu que os primeiros lotes de VLP poderiam ser produzidos três semanas após o Centro de Controle de Doenças (CDC, EUA) liberasse a sequência de hemaglutinina do vírus circulante ou do vírus pandêmico. Recentemente a Medicago anunciou resultados positivos do estudo clínico fase II canadense para sua vacina H5N1 e estudo clínico fase I americano para a vacina sazonal H1N1, com planos de prosseguir para um estudo de fase II com uma vacina trivalente sazonal (PILLET et al, 2016).

Em colaboração com a Fraunhofer Centro para Biotecnologia Molecular (Newark, EUA) a iBio Inc está investigando o potencial de sua plataforma para a produção vacina pandêmica e sazonal de gripe e está em fase de estudos clínicos para H5N1 e H1N1 (CUMMINGS et al, 2014). Além desses, outros alvos também estão em desenvolvimento e estudos clínicos conforme descrito na tabela 1.

Mais recentemente, durante a epidemia do vírus Ebola na África, a empresa Mapp Biopharmaceutical (San Diego, EUA) anunciou a produção em colaboração com a Kentucky BioProcessing (KBP) sediada em Owensboro, EUA de um coquetel de anticorpos monoclonais denominado ZMappTM produzido transientemente em *N. benthamiana* que foi capaz de curar americanos infectados com o vírus e tratados em território americano (ZEITLIN et al, 2016).

De acordo com Paul e colaboradores (2013) a tecnologia de expressão transiente não é só vantajosa para situações de necessidade de resposta rápida. Ela também se aplica para o desenvolvimento de medicamentos personalizados como por exemplo vacinas idiotípicas paciente-específicas para o tratamento de linfoma não-Hodgkins e o FDA já aprovou o uso destas vacinas em estudos clínicos de fase I. Outro nicho de mercado onde esta tecnologia pode ser aplicada é na produção de drogas órfãs para o tratamento de doenças raras. Como exemplo, o sistema *iBioLaunch* tem sido usado com sucesso para expressar o inibidor de esterase C1 que é indicado no tratamento de angioedema hereditário, e α 1-antitripsina, que é indicado para o tratamento de enfisema causado por deficiência de α 1-antitripsina.

A tecnologia de expressão transiente é muito promissora porque pode propiciar uma produção extremamente rápida e escalonável, que é importante para ambos os lados do mercado. De um lado, ela é adequada para a rápida produção de grandes quantidades de vacinas, para atender a pandemias emergentes ou atos de bioterrorismo. No outro extremo da escala, é uma tecnologia econômica para a produção de biomedicamentos para mercados muito pequenos, tais como doenças órfãs e terapias individualizadas (KLYMIUK et al, 2014).

1.2. FEBRE AMARELA

1.2.1 A doença

A febre amarela (FA) é um dos maiores desafios para as autoridades de saúde pública por se tratar de uma zoonose e, portanto, de difícil erradicação.

Trata-se de uma doença infecciosa não contagiosa de curta duração causada por um vírus. Existem duas formas da doença: a febre amarela urbana (FAU) e a febre amarela silvestre (FAS), tendo como vetores os gêneros *Aedes* e *Haemagogus*, respectivamente. Tanto a FAU como a FAS podem variar de assintomática a grave (FERREIRA et al, 2011).

As primeiras descrições de epidemias de FA datam de 1648, em manuscritos maias, que se referem a uma doença que evoluía com hematêmese, chamada “vômito negro” ou “xekik”, sugerindo que tanto o vírus quanto o mosquito vetor fossem originários da África e tenham sido introduzidos nas Américas durante o período do tráfico de escravos. Após a sua introdução nas Américas, o vírus da febre amarela

causou diversas epidemias que assolaram cidades da América do Sul como revelado na figura 5, na grande epidemia de Buenos Aires, Argentina em 1871, América Central e Estados Unidos durante os séculos XVIII e XIX (revisto por MONATH, 2008).

Fig. 5 –Igreja de Santelmo - Buenos Aires, Argentina. Memória as vítimas da epidemia de 1871



Fonte: própria autora

A reemergência da febre amarela fora da região amazônica a partir de 2007 reacendeu a preocupação das autoridades de saúde com a expansão das áreas de circulação viral no Brasil, documentada durante a última década. As áreas mais recentemente atingidas nas regiões sudeste e sul do país, são objetos de destaque em virtude da proximidade com grandes centros urbanos densamente povoados, cuja população não era vacinada, conseqüentemente, com estimativa reduzida de cobertura vacinal. Em diversos grandes centros urbanos dessas regiões, destaca-se a infestação por *Aedes aegypti*, onde diversos municípios enfrentam períodos de elevada transmissão, sucessivos, para outras arboviroses. Essa realidade trouxe à tona a discussão sobre o risco da reurbanização da FA por *Aedes aegypti* no Brasil. Na última década, entre 2000 e 2010 com dados atualizados até a semana epidemiológica 47 (21/11/2010) registraram-se 324 casos humanos confirmados de febre amarela silvestre, com 155 óbitos (letalidade de 47,8%). Entre os casos registrados, 261 (80,6%) tiveram local provável de infecção (LPI) em área fora da

região amazônica, ressaltando a característica da expansão das áreas de ocorrência da febre amarela no Brasil, além da região amazônica (ROMANO et al, 2011).

A partir de julho de 2014, o vírus da Febre Amarela reemergiu no Brasil. Epizootias de FA em primatas não humanos (PNH) foram registradas desde então, em parte associadas à ocorrência de casos humanos. No período de monitoramento, que foi de julho de 2014 a junho de 2015, foram confirmados sete casos humanos da doença: 5 em Goiás, 1 no Pará e 1 em Mato Grosso do Sul e quatro epizootias em PNH: 2 animais em Tocantins e 1 animal em Goiás e 1 no Pará. Recentemente, durante a retomada do monitoramento para o período 2015/2016, iniciado em julho/2015, outras epizootias em PNH foram confirmadas em Tocantins (Porto Nacional [1] e Palmas [1]), Goiás (Novo Brasil [1]) e no Distrito Federal (Regiões Administrativas de Ceilândia [1] e da Candangolândia [1]), evidenciando a intensa atividade do vírus amarílico no país, principalmente na região Centro-Oeste (BRASIL, 2015).

A principal medida de controle da infecção, após o controle dos vetores, é realizada através da imunização com a vacina contendo a cepa viral 17D. A vacina é constituída por vírus atenuado e é efetiva contra a reinfecção pelos vírus selvagens, confere imunidade por, pelo menos, dez anos, e não é recomendada a imunossuprimidos e crianças abaixo de 9 meses de idade. O mecanismo protetor desencadeado pela vacina está associado à produção de anticorpos neutralizantes, ativação de linfócitos TCD4+ e adequada integração entre as imunidades inata e adaptativa. A vacinação tem importância na prevenção e controle da doença, já que interrompe o ciclo de transmissão da forma silvestre para a forma urbana através da geração de uma barreira de imunidade coletiva (FERREIRA et al, 2011; AKONDY et al, 2009).

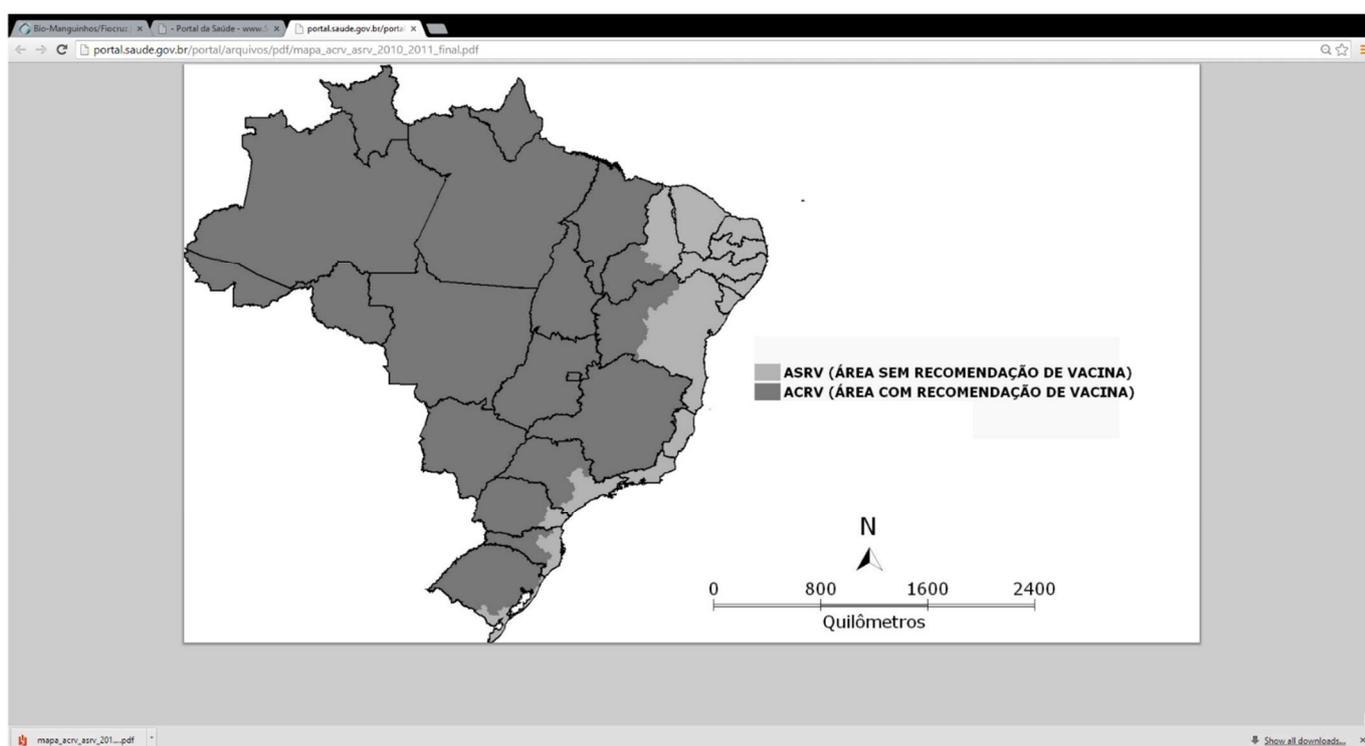
No Brasil a vacina de febre amarela é produzida em Bio-Manguinhos / FIOCRUZ desde 1940 e pré-qualificada pela OMS desde 2001. O Programa Nacional de Imunizações (PNI) recomenda a vacinação para Febre Amarela de todos os residentes de regiões endêmicas ou áreas de transição incluindo crianças acima de 9 meses de idade (Figura 6).

Embora a vacina atenuada apresente um histórico de eficiência e segurança muito consistente, em 2001 foram relatados eventos adversos graves fatais temporalmente associados a esta vacina. Tais eventos foram descritos como:

doenças viscerotrópicas e neurotrópicas associadas à vacina de febre amarela “*Vaccine associated viscerotropic disease*” (YEL-AVD) e “*Vaccine associated neurotropic adverse events*” (YEL-AND), respectivamente (HAYES, 2007; LINDSEY *et al.*, 2008; GUIMARD *et al.*, 2009; BARRET & TEUWEN, 2009). Outros eventos adversos incluem hipersensibilidade às proteínas do ovo, utilizado no cultivo do vírus, e hipersensibilidade à gelatina, utilizada como estabilizante da vacina atenuada (MONATH *et al.*, 2012).

Desta forma, uma nova vacina ideal deve induzir um nível de proteção semelhante ao observado após uma dose da vacina atenuada 17D, ser segura para uso em crianças abaixo de 9 meses de idade, indivíduos imunodeprimidos, idosos, mulheres grávidas e demais situações para os quais a atual vacina antiamarílica atenuada é contraindicada (MONATH *et al.*, 2010).

Figura 6: Mapa de áreas com e sem recomendação de vacina contra febre amarela.



Fonte: Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância Sanitária através do Portal da Saúde.

1.2.1. Vacina de Febre Amarela de Subunidade

É imperativo o desenvolvimento de uma vacina para febre amarela que não contenha vírus vivo (HAYES, 2010). Uma das estratégias mais utilizadas nas pesquisas científicas atuais consiste no desenvolvimento de vacinas de subunidades. A estratégia atualmente proposta, consiste em identificar e isolar dentre as complexas proteínas e glicoproteínas do agente patogênico àquelas que induzem proteção. Dentre as vantagens dessa plataforma, destaca-se a facilidade de escalonamento da produção da vacina possibilitando respostas rápidas ao aumento de demandas ou epidemias.

Diversos sistemas recombinantes de expressão têm sido utilizados na produção de vacinas de subunidade, incluindo plantas, as quais oferecem vantagens no custo e no escalonamento da produção (CHICHESTER & YUSIBOV, 2007; METT et al.,2008).

Devido à importância econômica e social do desenvolvimento de uma vacina para febre amarela de subunidade, Bio-Manguinhos assinou, em janeiro de 2011, um contrato de co-desenvolvimento desta vacina em plataforma vegetal com a Fraunhofer Centro para Biotecnologia Molecular (FCMB) e a empresa iBio, ambas dos Estados Unidos da América.

A FCMB desenvolveu um sistema de expressão baseado em um “vetor de lançamento” que consiste em dois componentes-chave: um plasmídeo binário da agrobactéria *Agrobacterium tumefaciens* e um vetor de expressão de RNA viral de planta. Sequências alvo para expressão são incorporadas entre as sequências definidas de um dos segmentos do plasmídeo binário que será introduzido na célula da planta. O vetor de lançamento é transferido por agroinfiltração, para plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) não modificadas geneticamente, onde a agrobactéria é forçada artificialmente para dentro dos espaços intercelulares dos tecidos por infiltração a vácuo (ROY et al 2011).

Em consequência da introdução da agrobactéria nos tecidos da planta, são sintetizadas e liberadas múltiplas cópias de fitas simples de DNA da sequência introduzida. A sequência que codifica a molécula alvo é transcrita a partir de um promotor sub-genômico localizado no RNA do vetor viral e a tradução dessa

mensagem permite a síntese e o acúmulo de centenas de miligramas da proteína alvo por quilograma de tecido da planta, em menos de uma semana. Esta abordagem pode ser aplicada a proteínas grandes, domínios de proteínas fusionados com moléculas carreadoras, pequenos peptídeos e VLPs (*Virus Like Particles*). Essa combinação de vetor de lançamento e plantas não modificadas geneticamente cria uma capacidade incomparável de construção e produção em larga escala de antígenos alvo de uma maneira temporal altamente eficiente (ROY et al, 2011).

A glicoproteína E é a maior proteína do envelope do vírus e representa o antígeno viral dominante, desempenhando importantes funções como ligação ao receptor, fusão específica de membrana e montagem viral (GUZMAN; KOURI, 2004; LEITMEYER et al., 1999). Além disso, contém a maioria dos determinantes envolvidos na adsorção e penetração nas células do hospedeiro, bem como os epítomos envolvidos em sua neutralização, desempenhando um papel importante na geração de anticorpos neutralizantes e na indução de uma resposta imune protetora (REY et al., 1995; BIELEFELDT-OHMANN et al., 1997).

Com o objetivo de se obter uma prova preliminar da adequação do sistema para a expressão do antígeno da febre amarela, a sequência do ectodomínio da proteína E do vírus vacinal da cepa 17DD foi desenhada e enviada a Fraunhofer, onde foi inserida no sistema de expressão em plantas. A proteína resultante foi purificada por cromatografia e utilizada em experimentos de imunogenicidade e desafio intracerebral em camundongos suíços e C57BL6. Os resultados demonstraram que 5 µg da proteína expressa em plantas, na presença de um adjuvante a base de saponina, fosfolípidios e colesterol, são capazes de proteger os camundongos contra um desafio letal com o vírus de febre amarela 17DD (dados ainda não publicados).

1.3. ASPECTOS REGULATÓRIOS E DE BIOSSEGURANÇA EM PLATAFORMAS VEGETAIS

1.3.1. Regulação em Plataformas Vegetais

Embora progressos significativos tenham sido feitos nos anos 1990 para desenvolver modelos econômicos viáveis para produtos não-farmacêuticos em plataforma vegetal, a produção comercial de proteínas farmacêuticas foi impedida, até recentemente, pela ausência de um quadro regulamentar coerente. Legislações preliminares desenvolvidas em conjunto pelo Departamento Americano de Agricultura (USDA) e a Agência Regulatória Americana *Food and Drug Administration* (FDA) são flexíveis em termos das plataformas envolvidas e da interpretação de guias de BPF (FDA / USDA, 2002).

Todavia, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) baseou fortemente suas diretrizes preliminares em modelos existentes para células de mamíferos, o que é muito ineficiente quando aplicado a plantas transgênicas visto que estas diretrizes baseiam-se em conceitos incompatíveis tais como banco de células e consistência lote-a lote baseado na identidade clonal (EMA, 2002; SPOK et al, 2008).

Diante deste cenário, muitas empresas optaram pela tecnologia de cultivo de células de plantas em biorreatores conforme descrito no item 1.1.1 para a produção de suas proteínas recombinantes. Esta decisão foi baseada no racional de que células de plantas podem ser manuseadas da mesma maneira que células de mamíferos e podem ser reguladas pelos mesmos guias e diretrizes, mas a passagem de animais a plantas, no entanto, representa um avanço gradual no sentido da aceitação para a plataforma vegetal como um processo comercialmente viável para a fabricação de produtos farmacêuticos. Como exemplo desta abordagem podemos citar a plataforma de produção CONCERT™ da Dow AgroSciences, baseada em células de tabaco BY-2 e a plataforma ProCellEx baseada em células de cenoura da Protalix. Em ambos os casos, os sistemas são análogos a células de mamíferos tanto em termos conceituais como práticos e então estão aderidos na maioria dos requisitos aos guias de BPF da FDA e EMA e isso possibilita e facilita a chegada de produtos ao mercado (FISCHER, 2013).

Todavia, células de plantas possuem as mesmas limitações de células animais no que se refere a infraestrutura de fermentadores o que significa que este sistema

tem baixa capacidade de escalonamento. Para conseguir as vantagens que o uso de plantas inteiras possibilitam, tanto transgênicas como expressão transiente, é necessário o desenvolvimento de um arcabouço regulatório integrando as propriedades que são únicas de plantas e as diversidades de características dos diferentes sistemas de tecnologia e produção das plataformas vegetais. Neste aspecto existe uma lacuna entre as práticas regulatórias na Europa e nos Estados Unidos e Canadá. Enquanto os guias da FDA e Health Canadá (Agencia Regulatória Canadense) tem a flexibilidade para aceitar todas as tecnologias produtivas em plataformas vegetais (FDA, 2002; HEALTH CANADA, 2014), as diretrizes da EMA que se tornaram efetivas em 2009 consideram apenas plantas transgênicas estáveis e não reconhecem a existência de plataformas de expressão transiente (EMEA, 2008).

Por esta razão, a produção em BPF baseada na tecnologia de expressão transiente, principalmente tabaco e alfafa está florescendo nos EUA e Canadá e praticamente está banida da Europa.

Em março de 2012 foi publicado no periódico *Plant Cell Report* um artigo original sobre a produção de VLP (*Virus-Like Particles*) da proteína do capsídeo do vírus Norwalk utilizando-se a mesma plataforma proposta por Bio-Manguinhos e Fraunhofer, produzida sob condições de BPF e submetida a estudo clínico humano de fase I (LAI; CHEN, 2012).

Da mesma forma, uma vacina candidata para gripe aviária H5N1 está em estudo clínico humano de fase I no Canadá e já teve publicado seu protocolo de estudo em dezembro de 2010 (LANDRY et al, 2010).

É importante ressaltar que uma nova diretriz para estudos clínicos foi publicada na UE, estipulando que todos os produtos biofarmacêuticos destinados a estudos clínicos de fase I devem ser fabricados de acordo com as BPF. A importância de conformidade com as BPF é agora então relevante desde o momento inicial do desenvolvimento clínico. Alguns dos produtos derivados de plataformas vegetais que já entraram em estudos de fase I não tiveram a necessidade de produção em BPF, mas todos os produtos de agora em diante deverão estar em conformidade com as BPF antes dos estudos clínicos serem autorizados. O êxito do desenvolvimento de diretrizes de BPF para expressão transiente e transgênicos é sem dúvida o avanço mais importante no desenvolvimento comercial da plataforma vegetal, porque isso

agora oferece o caminho aceito para seguir para a fabricação de proteínas farmacêuticas em diferentes tecnologias de plantas inteiras (FISCHER et al, 2012).

Atividades de Pesquisa e Desenvolvimento também foram rastreadas na África do Sul e Austrália, mas isso ainda não resultou em atividades regulatórias visíveis. Algumas iniciativas de pesquisas e desenvolvimento com vistas comerciais também estão sendo realizadas em outros países como por exemplo, a Coreia do Sul, Japão, China, Chile, mas a informação de regulação disponível é escassa no domínio público (SPOK et al 2008). Em Cuba já existe regulação aprovada para registro de produtos farmacêuticos e biológicos obtidos a partir apenas de plantas transgênicas (CECMED, 2006). No Brasil ainda não há regulamentação aprovada.

1.3.2. Biossegurança em Plataformas Vegetais

O uso de culturas alimentares para a produção de proteínas recombinantes tem sido associado mundialmente a um sentimento negativo entre grupos de consumidores e a indústria alimentícia, o que levou a agência regulatória americana FDA a adotar uma política de “tolerância zero” com relação a liberação de transgenes de plantas produtoras de biológicos e contaminação de plantações de culturas alimentares (FDA, 2002). O fato que levou a adoção de regras mais estritas e rígidas pelo Serviço de Inspeção de Saúde Animal e Vegetal (APHIS) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, foi a perda do alto nível de contenção de culturas de milho geneticamente modificadas para produção de biológicos, plantadas em campos de teste e colhidas em 2001, pela empresa ProdiGene Inc. A evidência da perda de contenção deu-se no ano seguinte (2002), quando agricultores plantaram soja para consumo humano nas áreas usadas pela ProdiGene e sobras de sementes de milho transgênico do campo de teste brotaram em meio a soja. Este acontecimento, levou o APHIS a impor exigências adicionais em todos os futuros lançamentos de campo de plantas produtoras de biológicos nos EUA (APHIS/ USDA, 2007).

Sparrow e colaboradores publicaram em 2013 uma extensa revisão sobre o assunto, comparando a legislação vigente entre União Europeia e Estados Unidos. Neste artigo também é explorada a necessidade de se realizar uma extensa avaliação do risco para se determinar o impacto da planta geneticamente modificada na saúde humana e animal e no meio-ambiente em comparação com a mesma espécie não modificada, levando-se em conta entre outras coisas as seguintes características: (1)

a caracterização molecular da planta geneticamente modificada, que informa a estrutura e expressão do(s) inserto(s) e sua estabilidade; (2) a análise comparativa da composição fenotípica e característica agrônômica para que se possam identificar mudanças pretendidas e não pretendidas na planta geneticamente modificada; (3) a avaliação toxicológica da modificação genética, que determina o impacto na saúde humana e animal da mudança biológica relevante na planta geneticamente modificada; (4) a avaliação do potencial alergênico da(s) nova(s) proteína(s) que, no caso das plantas produtoras de biológicos, deve ser determinado antes da liberação para plantação em campo aberto; (5) a avaliação nutricional, cujo objetivo é demonstrar que o alimento derivado da planta geneticamente modificada não é nutricionalmente desvantajoso para humanos e/ou animais; (6) mudanças potenciais na habilidade de persistência e invasividade da planta geneticamente modificada; (7) potencial de transferência gênica; (8) interações entre a planta geneticamente modificada e organismos alvos; (9) interações entre a planta modificada e organismos não-alvos; (10) efeitos adversos potenciais nos processos biogeoquímicos; (11) impactos da alteração de práticas de manejo agrícola associados ao cultivo de plantas geneticamente modificadas; (12) interações potenciais com o ambiente abiótico; e (13) a qualidade científica do plano de monitoramento ambiental pós-venda proposto (SPARROW et al, 2013).

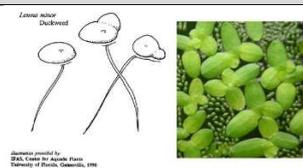
Além disso, uma avaliação dos efeitos diretos e indiretos, bem como imediatos e tardios, incluindo efeitos cumulativos de longo prazo são necessários em diversos países (KIRK et al, 2005).

Pode-se argumentar que muitos dos critérios acima referidos, não seriam aplicáveis a plantas produtoras de biológicos uma vez que estas culturas não são projetadas para entrar na cadeia alimentar. No entanto, se estas plantas produtoras de biológicos são também espécies de culturas alimentares, então, será necessária a realização de avaliações completas, como parte do Princípio de Precaução - ou seja, o que aconteceria se estas plantas geneticamente modificadas se misturassem na cadeia alimentar (SPARROW et al, 2007; ALDERBORN et al, 2010).

Neste interim, a escolha do sistema de produção, ou melhor a biologia da planta hospedeira precisa ser considerada tanto pela perspectiva de produção quanto por como ela impacta no meio-ambiente, segurança alimentar e saúde humana. É muito improvável que uma única espécie satisfaça todos os critérios requeridos. Existem,

algumas vezes, considerações conflitantes que necessitam serem balanceadas para selecionar a melhor espécie para uma aplicação particular. Segundo Sparrow e colaboradores publicaram em 2007, três classes de espécies de plantas podem ser potencialmente utilizadas: espécies não-cultivadas, culturas não alimentares e culturas alimentares. As culturas alimentares também podem ser divididas em três grupos principais: (a) sementes; (b) hortaliças e (c) frutas/folhas verdes. A tabela 2 sintetiza para cada classe e grupo de plantas as vantagens e desvantagens do ponto de vista de biossegurança e produção (SPARROW et al, 2007).

Tabela 2 – Modelos de plantas usadas para produção de biológicos

Espécie	Exemplo	Vantagens	Desvantagens	Imagem
Não-cultivadas	<i>Lemna minor</i>	Não é parte da cadeia alimentar humana; podem ser cultivadas em contenção ou em biorreatores	Pouco conhecimento da genética e biologia destas espécies se produzem ou não toxinas e seu potencial para cruzamento	 <p><small>Lemna minor Duckweed</small></p> <p><small>Illustration provided by DRA, Center for Aquatic Biotech, University of Illinois, Urbana-Champaign, 1990</small></p>
Culturas não alimentares	Tabaco	Não é parte da cadeia alimentar humana nem animal; métodos eficientes e bem estabelecidos para transferência de genes e expressão, alto rendimento de biomassa e boa produção de sementes	Muitos cultivares de tabaco produzem alto nível de alcaloides tóxicos, presença de substâncias fenólicas	
	Linho	Não é parte da cadeia alimentar humana nem animal; mudas transgênicas podem ser cultivadas em biorreatores e completamente contidas	Baixo rendimento, necessidade de remoção de fibras e óleos no processo de purificação	
Culturas alimentares (Sementes)	Arroz, trigo, cevada, milho, ervilha, soja, cártamo e canola	A expressão de proteínas em sementes permite a estocagem por longo tempo, mesmo a temperatura ambiente, sistemas eficientes já estabelecidos para produção e processamento e a proteína recombinante não está presente em folhas, brotos ou raízes	Parte da cadeia alimentar humana e animal, necessidade de floração levando a possibilidade de transferência de pólen, possibilidade de perdas de sementes e mistura durante o transporte e manuseio	
Culturas Alimentares (Hortaliças)	Batata, cenoura	Estabilidade da proteína recombinante, produção de vacina oral (batata) e cultivo de células em suspensão em completa contenção (cenoura)	Parte da cadeia alimentar humana e animal, potencial influência no meio-ambiente, diferenciação entre transgênico e não-transgênico	
Culturas Alimentares (Frutas e folhas verdes)	Banana, tomate, alface e espinafre	Vacinas comestíveis que podem ser consumidas sem necessidade de processamento (cruas)	Parte da cadeia alimentar humana e animal, inconsistência lote-a-lote, instável, baixo rendimento, potencial exposição a herbívoros.	

Embora Estados Unidos, União Europeia e Canadá estejam à frente das discussões regulatórias, bem como possuam consistência na avaliação e gerenciamento do risco para a produção de biológicos em plataformas vegetais (ALDERBORN et al, 2010), um número expressivo de países incluindo África do Sul, Brasil e Argentina tem desenvolvido extensiva experiência e expertise na avaliação do risco e no gerenciamento do risco de plantações geneticamente modificadas e estão em uma forte posição para determinar os riscos ambientais associados a transgenia quando comparados a outros países onde os cultivos transgênicos são muito mais limitados (SPARROW et al, 2007).

Finardi Filho no documento: CTNBio: rigor e transparência na avaliação de biossegurança de OGM no Brasil, declara que o Brasil é hoje o vice-líder global na adoção da biotecnologia agrícola e tem 37 eventos agrônômicos transgênicos² aprovados para consumo e plantio. Além de algodão, milho e soja, há também o feijão transgênico resistente ao vírus do mosaico dourado, único produto geneticamente modificado do mundo desenvolvido inteiramente por uma instituição pública de pesquisa, a Embrapa. Cabe também ressaltar as 17 vacinas para uso animal e as duas leveduras para produção de biocombustíveis também avaliadas e liberadas. (Disponível em: http://bch.ctnbio.gov.br/upd_blob/0001/1789.pdf)

No entanto, a questão de desenvolvimento tecnológico e produção industrial de produtos biológicos sendo expressos em plantas transgênicas e seu impacto na segurança pode e deve ser discutida em todos os setores envolvidos incluindo o terceiro setor.

1.4. ANÁLISE DE RISCOS

1.4.1. Análise de risco à Qualidade

Segundo o ICH Q9, a fabricação e uso de um produto, incluindo os seus componentes, implicam necessariamente em certo grau de risco. O risco para a qualidade é apenas um componente do risco global. É importante entender que a qualidade do produto deve ser mantida durante todo o ciclo de vida, de modo que as características que são relevantes para a qualidade do produto, bem como seu

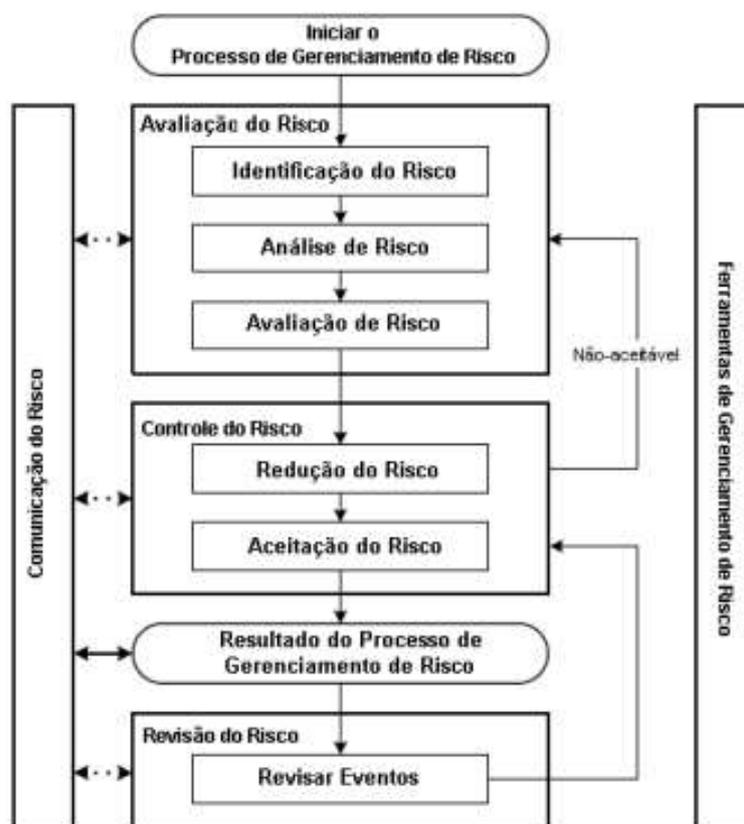
² Define-se genericamente evento transgênico como sendo o grupo de características obtidas através de transformações sofridas por um organismo que foi modificado utilizando-se diferentes técnicas de Engenharia Genética baseadas na transferência isolada de um ou mais genes de interesse. Nota da Autora.

desempenho, permaneçam consistentes com as que são utilizadas nos estudos clínicos.

Dois princípios chave de gestão dos riscos de qualidade são: a estimativa dos riscos para a qualidade deve basear-se no conhecimento científico e estar fundamentalmente ligada à proteção da pessoa; e o nível de esforço, formalidade e documentação do processo de gestão dos riscos de qualidade deve ser proporcional ao nível de risco.

O gerenciamento de riscos à qualidade consiste de um processo sistemático para avaliação, controle, comunicação e revisão dos riscos à qualidade de um medicamento ao longo de seu ciclo de vida. Um modelo de gestão dos riscos de qualidade está delineado na figura 7.

Figura 7 – Visão geral de um processo de gerenciamento de risco



Fonte: ICH Q9 (2005), adaptado pela autora

A gestão dos riscos de qualidade deve possuir processos sistemáticos concebidos para coordenar, facilitar e melhorar a tomada de decisões baseadas na ciência no que se refere ao risco. As possíveis etapas utilizadas para iniciar e estabelecer um plano de processo de gestão dos riscos de qualidade devem abordar a definição do problema e/ou questão do risco, incluindo pressupostos pertinentes que identifiquem o potencial de risco, recolher informações e/ou dados de fundo sobre o potencial perigo, dano ou impacto na saúde humana relevante para a avaliação de riscos e identificar um líder e recursos necessários. Com base no objetivo e no escopo da avaliação de risco, seleciona-se a ferramenta mais apropriada para sua realização. Dentre as ferramentas mais utilizadas, destacam-se: Failure Mode and Effects Analysis – FMEA; Failure Mode, Effects and Criticality Analysis – FMECA; Fault Tree Analysis – FTA; Hazard Analysis and Critical Control Points – HACCP; Hazard Operability Analysis – HAZOP; Preliminary Hazard Analysis – PHA (ICH Q9, 2005).

1.4.2. Processo de avaliação de riscos

A avaliação dos riscos consiste na identificação de perigos e na análise e estimativa dos riscos associados à exposição a esses perigos. As avaliações dos riscos de qualidade principiam por uma definição adequada da descrição do problema ou da questão do risco. É um processo qualitativo ou quantitativo de vinculação da probabilidade de ocorrência e gravidade de danos. A ocorrência é definida em função de dados históricos, mas quando estes não estão disponíveis, utiliza-se um valor estimado de probabilidade de ocorrência, com base no parecer de especialistas. Os valores atribuídos para ocorrência e severidade multiplicados geram o risco NR (nível de risco).

A classificação de riscos é o processo de comparação dos valores de risco com os critérios de risco, a fim de determinar o nível do risco (alto, médio e baixo). Com base no nível estabelecido, é tomada a decisão de aceitar ou reduzir o risco. O objetivo dessa verificação é a determinação de alterações dos riscos. Caso a ação sugerida para mitigar o risco não tenha sido eficaz, quando não há alteração do status ou ocorra aumento da frequência do desvio, o sistema deve apoiar o proprietário do risco na definição de novas ações.

Segundo a Conferencia Internacional de Harmonização (ICH Q8, 2009) a Gestão de Riscos à Qualidade como parte do desenvolvimento é utilizada para projetar um produto de qualidade e seu processo de fabricação; para entregar consistentemente o desempenho a que se destina o produto; para aumentar o conhecimento do desempenho do produto ao longo de um vasto leque de atributos de materiais como por exemplo, distribuição granulométrica, teor de umidade, propriedades de fluxo, opções de processamento e parâmetros de processo; para avaliar os atributos críticos de matérias-primas, solventes, Ingredientes farmacêuticos ativos (IFA) matérias-primas, excipientes, ou materiais de embalagem. Além disso se aplica também para estabelecer as especificações adequadas, identificar parâmetros críticos do processo e estabelecer controles de fabricação, usando as informações dos estudos de desenvolvimento farmacêutico em relação ao significado clínico de atributos de qualidade e da capacidade para controlá-los durante o processamento e finalmente para diminuir a variabilidade dos atributos de qualidade, reduzindo defeitos de produtos e materiais e / ou reduzindo defeitos de fabricação. Pode ser usada também para avaliar a necessidade de estudos adicionais, relativos ao aumento de escala e transferência de tecnologia e para fazer uso do conceito de "espaço de design" (ICH Q8, 2009).

A Vigilância Sanitária tem como missão a proteção e promoção à saúde da população e defesa da vida, possuindo um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e da circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo o controle de bens de consumo que direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas de processo, da produção ao consumo; e o controle da prestação de serviços que relacionam direta ou indiretamente com a saúde (EDUARDO, 1998, p.3).

Neste contexto nosso trabalho propõe através do projeto de obtenção da vacina de febre amarela subunitária, o estudo e a proposição de um arcabouço regulatório para a plataforma vegetal no Brasil, demonstrando a relevância para o sistema de Vigilância Sanitária do levantamento dos riscos desta nova plataforma tecnológica do ponto de vista de Boas Práticas de Fabricação e Biossegurança.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este projeto de tese se propõe a estudar o arcabouço regulatório e a legislação de Biossegurança em plataforma tecnológica vegetal utilizando o projeto de produção de vacina de febre amarela de subunidade como modelo, de modo a permitir que um projeto deste porte tenha seus riscos regulatórios e sanitários avaliados, e fornecer subsídios aos tomadores de decisão, sejam eles de órgãos regulatórios competentes, produtores ou mesmo fornecedores de recursos financeiros para que seja possível a obtenção do registro do produto junto a ANVISA.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão bibliográfica a respeito da produção de vacinas / biofarmacêuticos em células vegetais (plantações, sementes, estufas e sistemas em contenção - fechados);
- Realizar uma revisão bibliográfica na literatura regulatória e de Biossegurança;
- Promover um estudo avaliativo relacionados a regulação em Plataforma Vegetal para produção de biológicos, a fim de identificar lacunas na Legislação Brasileira;
- Avaliar o risco da produção do antígeno de febre amarela em plantas, através de ferramentas de análise de risco a qualidade e análise de risco de biossegurança;
- Propor o estabelecimento e caracterização do banco semente e de trabalho da agrobactéria e sementes de tabaco visando à produção de medicamentos biológicos;
- Elaborar de proposições regulatórias para o Brasil utilizando este projeto de pesquisa como experiência prática;

3. METODOLOGIA

Conforme Silva e Menezes (2001), do ponto de vista da sua natureza, este consistiu de um trabalho de pesquisa aplicada, porque teve por objetivo a geração de conhecimentos com aplicação prática e estes conhecimentos estão relacionados à solução de determinados problemas. Foi também uma pesquisa longitudinal, isto é, a coleta dos dados ocorreu ao longo do tempo em períodos ou pontos especificados, buscando estudar a evolução ou as mudanças de determinadas variáveis ou, ainda, as relações entre elas (SAMPIERI; COLLADO E LUCIO, 2006).

Considerando as definições de Gil 1991 *Apud* (SILVA; MENEZES, 2001), do ponto de vista dos procedimentos técnicos, a pesquisa desta tese foi: Bibliográfica, pois foi elaborada a partir de material já publicado, como livros, artigos de periódicos e recentemente com material disponibilizado na Internet para a fundamentação teórico-metodológica; Documental, pois foi elaborada a partir de materiais internos das empresas Fraunhofer CMB e Bio-Manguinhos; Levantamento, pois envolveu a interrogação direta das pessoas com a finalidade de conhecer o comportamento do processo e Estudo de caso, pois envolveu o estudo profundo e exaustivo de alguns objetos de maneira que se permitiu o seu amplo e detalhado conhecimento.

3.1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A pesquisa bibliográfica a respeito da produção de vacinas / biofarmacêuticos em células vegetais (plantações, sementes, estufas e sistemas em contenção - fechados) foi realizada utilizando as bases de dados online “ISI Web of Knowledge”; Scopus, Scirus, “Web of Science” “PubMed”.

Assim, inicialmente foi realizada uma busca sobre a produção do conhecimento referente a “*Molecular Farming*”, tendo como objetivo identificar a produção de proteínas recombinantes em plataformas vegetais distintas, através da revisão de literatura sobre o tema. Na busca inicial foram considerados os títulos e os resumos dos artigos para a seleção ampla de prováveis trabalhos de interesse, sendo destacados os resumos (dos artigos que não tinham texto acessível) e os textos completos dos artigos, utilizando-se como palavras chave os termos “*Plant Molecular Farming*”; “*Plant-made Pharmaceuticals*”; “*Vegetal Platform*”. Foram utilizados como critérios de inclusão os textos que abordavam a produção de biológicos farmacêuticos (vacinas, anticorpos, proteínas plasmáticas, hormônios, citocinas e enzimas), e textos

publicados entre 2000 e 2016 (pela preferência em pesquisar publicações recentes). Foram utilizados como critério de exclusão os artigos referentes a técnicas moleculares e/ ou bioquímicas muito específicas de obtenção dos biológicos em plataforma vegetal, por fugirem do contexto da Tese e artigos em língua não inglesa.

O levantamento do arcabouço regulatório e de biossegurança foi também realizado através de busca de artigos científicos em base de dados acadêmicos como, “ISI Web of Knowledge”; Scopus, Scirus, “Web of Science” “PubMed”. Neste contexto, além das palavras-chave citadas acima acrescentamos também: “*Regulatory*”; “*Regulation*”; “*Biosafety*”; “*GMP*”. Foram utilizados como critérios de inclusão os textos que abordavam questões regulatórias, análise de riscos e biossegurança na produção de biológicos farmacêuticos (vacinas, anticorpos, proteínas plasmáticas, hormônios, citocinas e enzimas), e a data não foi utilizada como critério de exclusão, pela preferência do levantamento histórico da regulação nesta plataforma produtiva.

Também foram consultadas os web sites da ANVISA; CTNBio e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os web sites internacionais consultados foram nos Estados Unidos: USDA-APHIS www.aphis.usda.gov/; US permits for pharmaceutical plants http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.html; FDA www.fda.gov/; EPA <http://www.epa.gov/>; no Canadá: CFIA <http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/mf/fracad/commerce.shtml#3>; na União Europeia: EFSA <http://www.efsa.europa.eu>; EMA <http://www.ema.europa.eu>; ICH <http://www.ich.org/home.html> e Internacional Cartagena Biosafety Protocol : <http://www.cbd.int/biosafety/>

3.2 – ESTUDO AVALIATIVO – ANÁLISE DE LACUNAS

O estudo avaliativo relacionado a regulação em Plataforma Vegetal para produção de biológicos na Legislação Brasileira foi realizado através da metodologia de análise de lacunas.

A análise de lacunas é uma técnica que surgiu na década de 1980 quando o alcance da Qualidade em produtos e serviços tornou-se uma preocupação central (PARASURAMAN, et al, 1985; PARASURAMAN, et al., 1988). Atualmente é uma técnica que as empresas usam para determinar que medidas devem ser tomadas a fim de mover-se de seu estado atual para o estado futuro desejado. Também é chamada de análise de necessidades, e avaliação de necessidades.

Neste trabalho, a análise de lacunas consistiu em:

- (1) Ler todos os guias e diretrizes publicados pelas principais agências reguladoras mundiais que estão citados na tabela 3 em Resultados, além dos artigos referentes a expressão de biológicos em plataforma vegetal
- (2) Listar os fatores característicos (como atributos, competências, níveis de desempenho) da situação atual ("o que é"), que foram determinados a partir da leitura das legislações existentes para produção de biológicos em plataforma vegetal.
- (3) Avaliar a legislação brasileira no contexto de produção de biológicos e controles sanitários que estão citados na tabela 4 em Resultados.
- (4) Listar os fatores necessários para atingir objetivos futuros ("o que deveria ser"), e
- (5) Destacar as lacunas que existem e precisam ser preenchidas.

Esta ferramenta de análise de lacunas foi então utilizada para comparar o estado da arte da regulação mundial realizado através do levantamento bibliográfico, com as leis, normas e diretrizes brasileiras existentes na área de produção de biológicos em Plataformas Vegetais, incluindo produção em plantas transgênicas, produção em expressão transiente em tecidos específicos e produção em cultivos de células vegetais. A partir desta comparação foram estabelecidas as lacunas no arcabouço regulatório existente no Brasil.

3.3 – AVALIAÇÃO DOS RISCOS DO PROCESSO PRODUTIVO

A avaliação do risco à Qualidade da produção de uma vacina em plataforma vegetal usando como estudo de caso o desenvolvimento da vacina de Febre Amarela na plataforma de expressão transiente em *Nicotiana benthamiana*, foi realizada através do uso da ferramenta HACCP para estabelecer principalmente, as especificações adequadas, identificar parâmetros críticos do processo e estabelecer os controles de fabricação.

3.3.1. Ferramenta HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

A ferramenta HACCP foi desenvolvida originalmente como uma técnica para o sistema de gerenciamento de segurança alimentar do programa aeroespacial norte-americano (HULEBAK, SCHLOSSER, 2002; GRIMM, 2008). A ferramenta é relativamente nova para a indústria farmacêutica e deve ser embasada em princípios técnicos e científicos. De característica proativa e preventiva, possibilita a identificação sistemática de riscos específicos à qualidade de um produto, medidas de controle e monitoramento (COSTA NETO, FIGUEIREDO, 2001; WHO, 2003). Trata-se de uma abordagem estruturada que aplica técnicas e princípios científicos para analisar, avaliar, prevenir e controlar os riscos ou consequência(s) adversa(s) dos perigos devido à concepção, desenvolvimento, produção ou uso dos produtos (ICH Q9, 2005).

Para a aplicação da metodologia HACCP neste trabalho, a primeira etapa foi elaborar um fluxograma detalhado da sequência de todas as etapas do processo conforme preconizado em FDA, 1997. Após a elaboração do fluxograma foi feita a descrição detalhada do processo, incluindo as medidas de biossegurança inseridas.

O fluxograma elaborado foi comparado com as respectivas operações através do acompanhamento *in loco* dos processos realizados em três visitas a planta piloto da Fraunhofer nas datas 03/2012; 01/2013; 08/2013.

Usando o fluxograma e a descrição do processo como guia foram listados todos os pontos críticos de controle (PCC), que é uma etapa; operação ou procedimento, que deve ser monitorado de modo a eliminar ou reduzir a ocorrência de um perigo e onde a falta de controle conduz a um risco inaceitável sem possibilidade de correção posterior.

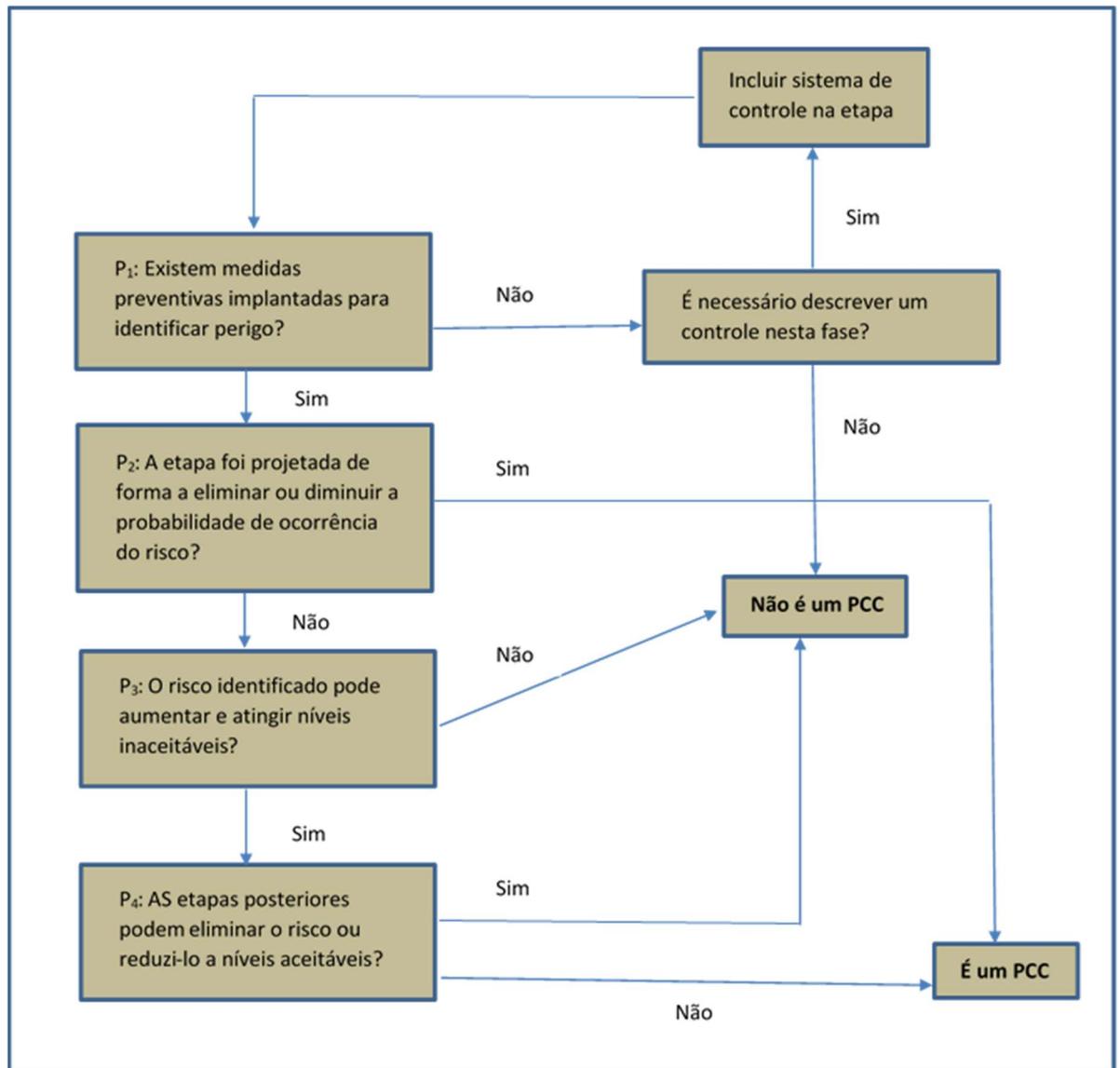
Para classificar um ponto de controle como crítico é condição indispensável que se possa atuar sobre ele através da aplicação de uma medida preventiva.

A identificação dos riscos nas operações e dos PCC durante a execução da ferramenta HACCP foi feita com o auxílio da árvore de decisão demonstrada figura 8, através das respostas as 4 perguntas-chave da técnica.

Após o levantamento, para cada PCC, parâmetros de controle e limites críticos foram especificados. Estes valores foram obtidos por: (1) Valores já determinados previamente para produtos biológicos e considerados mandatórios pelas Agências Regulatórias; (2) Referências bibliográficas de processos similares; (3)

Reprodutibilidade do processo após a realização pela equipe da Fraunhofer da produção de 3 lotes da proteína YFE-1T, antígeno da vacina de febre amarela de subunidade, na escala de 5 kg.

Figura 8 – Árvore de perguntas para determinação dos PCC



Fonte: (FAO / WHO, 1997) Adaptação e tradução da autora.

3.3.2. Avaliação do risco de biossegurança

A avaliação do risco de Biossegurança da produção de uma vacina em plataforma vegetal usando como estudo de caso o desenvolvimento da vacina de Febre Amarela na plataforma de expressão transiente em *Nicotiana benthamiana*, foi realizada através do uso do software BioRAM.exe versão 1.0 beta gentilmente cedido pelo Sandia National Laboratories - Departamento Internacional de Redução de Riscos Biológicos (SNL / IBTR). Este software está completamente aderido as medidas preconizadas pela Organização Mundial da Saúde para a realização de avaliação de biossegurança laboratorial e avaliação de riscos de biossegurança (BioRAM Introduction White Paper, 2008) e também a Norma Internacional CWA 15793 – “Laboratory biorisk management”.

A avaliação do risco de Biossegurança foi feita nas áreas em que se tem a presença de OGM no processo desenvolvimento da vacina de Febre Amarela na plataforma de expressão transiente em *Nicotiana benthamiana*. E, como base de comparação, o processo de produção da vacina de Febre Amarela contendo o vírus vivo e atenuado.

No processo da plataforma de expressão transiente foram avaliadas separadamente as áreas de: pré-inóculo /fermentação; agroinfiltração; crescimento de plantas pós infiltração; colheita e homogeneização e a área de clarificação e o agente biológico avaliado foi o *Agrobacterium tumefaciens*, microrganismo este classificado como de risco biológico 1, contendo o vetor da proteína E.

No processo de produção da vacina de vírus vivo atenuado foi avaliado o processo de coleta e preparo da suspensão viral.

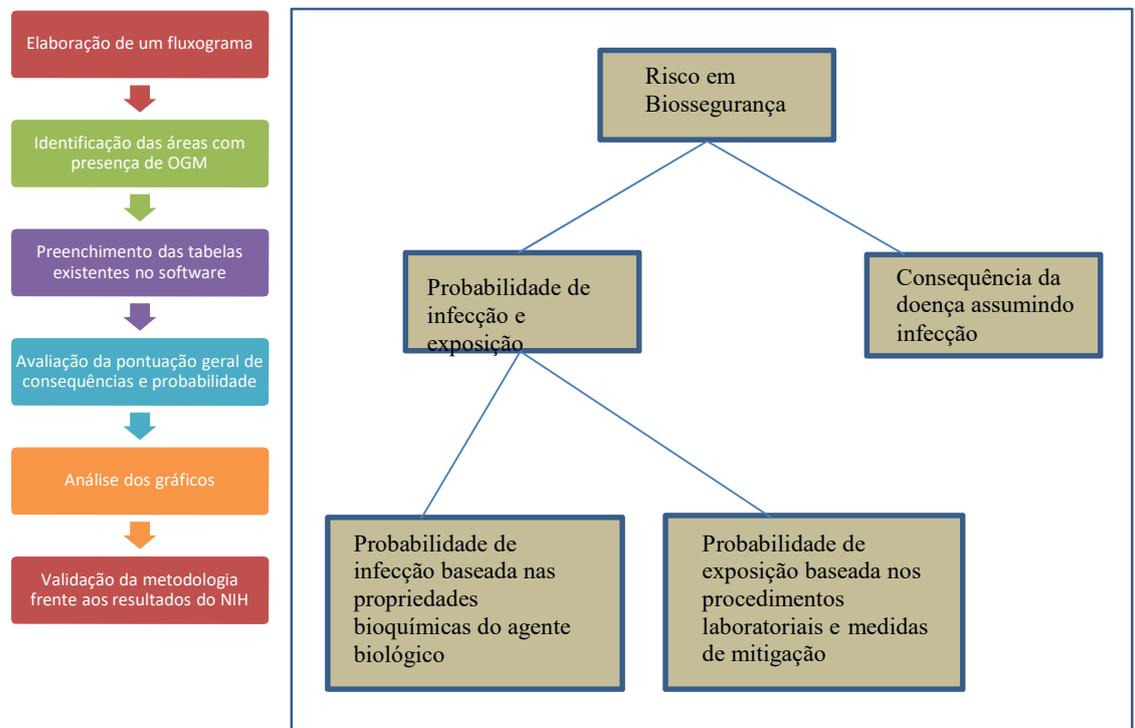
Para a validação da metodologia, realizamos uma análise neste software utilizando o vírus da Febre Amarela, e comparamos com o resultado obtido pelo NIH.

O processo de avaliação foi realizado através do preenchimento de tabelas existentes no software que são divididas em componentes que tem por objetivo avaliar os agentes biológicos que existem na área/instalação; avaliar os processos e procedimentos da área/ instalação; avaliar as medidas de mitigação risco biológico em prática.

Dentro de cada componente existem vários critérios e subcritérios que são pontuados de forma independente. Estas pontuações foram ponderadas e depois compiladas para fornecer uma pontuação geral de consequência e probabilidade. Este método é baseado em uma análise de sistema Multi Critérios de Decisão (MCDA), quantificando os vários aspectos do risco biológico usando definições qualitativas. Os resultados finais mostram o risco relativo de agentes na instalação dada, e dão ao gestor do programa de Biossegurança um mecanismo para determinar os riscos que são inaceitáveis (CASKEY et al, 2010). Esta pontuação foi dada com base em: a observação do processo através das visitas realizadas na Fraunhofer nos anos de 2012 e 2013, da descrição do processo resultante destas observações, de comunicações pessoais entre a autora e técnicos da Fraunhofer e da literatura citada.

A tabela de pontuação do software está descrita no ANEXO A e a visão geral da metodologia do software BioRAM está demonstrada na figura 9.

Figura 9 – Metodologia de Avaliação de Risco em Biossegurança.



Fonte: (CASKEY et al., 2010) Adaptação e tradução da autora.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

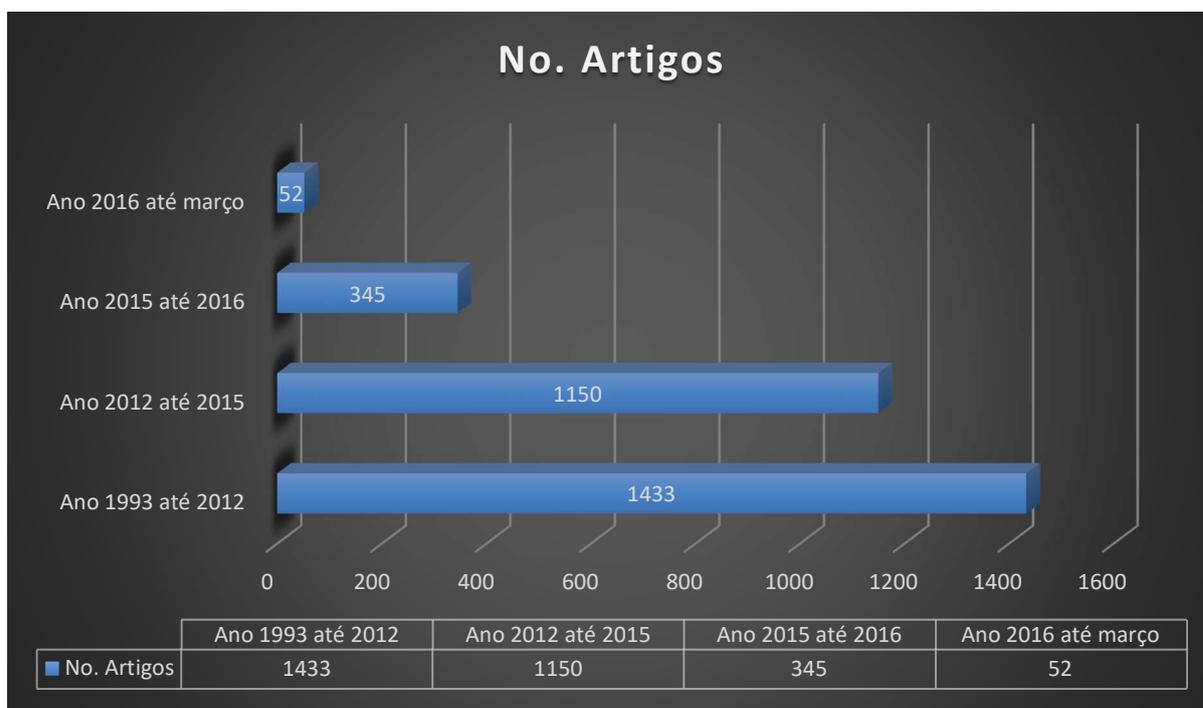
4.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Utilizando o buscador Carrot2 na base de dados do PubMed e utilizando como palavra-chave: “*Plant Molecular farming*”, encontramos 419 artigos. Utilizando o mesmo buscador Carrot2 na base de dados do PubMed, mas utilizando como palavra-chave: “*Plant-made pharmaceuticals*”, encontramos 58 artigos. Ao realizarmos nova busca, agora utilizando “*Vegetal platform*” como palavra-chave, encontramos 24 artigos.

Na busca de citações nas bases de dados [ISI Web of Knowledge](#), [SCOPUS](#), [SciELO](#) e no [Google Acadêmico](#), e obtivemos os seguintes resultados:

Usando a palavra-chave: “*Plant-made Pharmaceuticals*” um total de 2.980 resultados, sendo a citação mais antiga de 1993 e a mais recente busca em 29 de março de 2016, conforme figura 10.

Figura 10 –Número de artigos encontrados



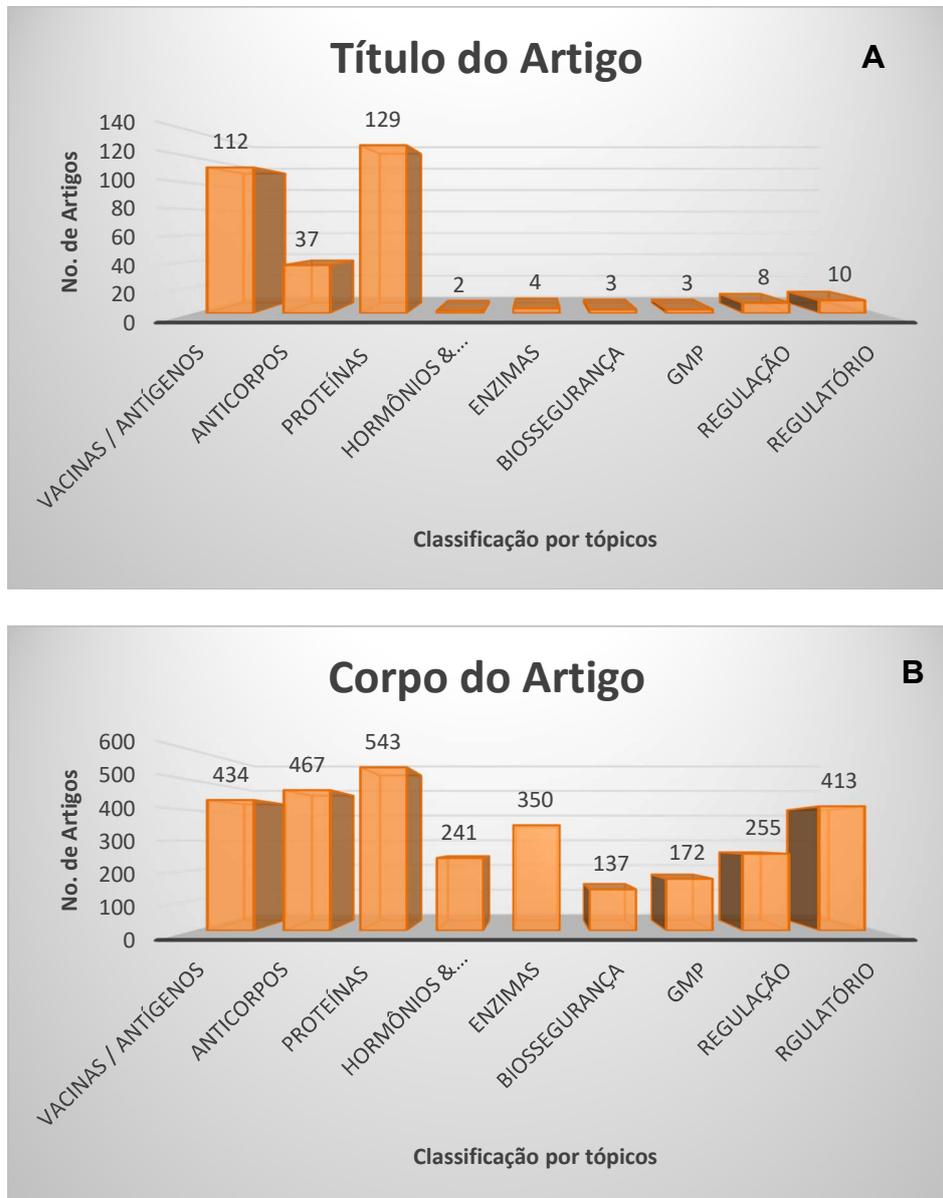
Legenda: Número de artigos encontrados nas bases de dados pesquisadas agrupados por ano de publicação.

Destes artigos, realizamos uma pesquisa booleana (AND, OR, NOT) "Plant molecular pharming" AND (vaccine* OR antibody OR antibodies + medicine* OR therapeutic* OR diagnostic* OR protein* OR biopharmaceutical*) "Plant molecular pharming" AND ("expression system" OR "production system" OR platform)

"Plant produced" OR "plant based" OR "plant-based" OR "plant made" OR "plant-made" AND (vaccine OR antibody OR antibodies + medicine* OR therapeutic* OR diagnostic* OR protein* OR biopharmaceutical*) e foram selecionados para a biblioteca desta Tese 584 artigos sendo que, quando analisamos nossa biblioteca por tipo de produto no título do artigo encontramos 112 artigos em cujo título tinha a palavra vacina ou antígeno; 37 com a palavra anticorpo(s); 129 com a palavra proteína e em menor número 2 artigos sobre hormônios e citocinas; 4 sobre enzimas; 3 com a palavra biossegurança no título e com as palavras GMP, regulação e regulatório 3, 8 e 10 artigos respectivamente, conforme apresentado na figura 11A.

Quando analisamos nossa biblioteca por tipo de produto no corpo do artigo encontramos 434 artigos em cujo corpo tinha a palavra vacina ou antígeno; 467 com a palavra anticorpo(s); 543 com a palavra proteína, 241 artigos citando hormônios e citocinas; 350 citando enzimas; 137 com a palavra biossegurança no corpo do artigo e com as palavras GMP, regulação e regulatório 172, 225 e 413 artigos respectivamente, conforme a composição apresentada na figura 11B.

Figura 11 –Composição da biblioteca de artigos por tópicos



Legenda: (A) Composição da biblioteca da tese por tipo de produto/assunto no título do artigo e (B) Composição da biblioteca da tese por tipo de produto/assunto no corpo do artigo.

Também podemos destacar que os periódicos: *Plant Biotechnology Journal* e *Current Pharmaceutical Design* são os periódicos que mais publicam artigos em “*Plant Molecular Farming*” já tendo dedicado volumes inteiros neste assunto como o PBJ o fez em 2010 e 2015 e o CPD em 2013.

Vale ressaltar que nesta busca de dados citada acima, apenas 6 patentes foram evidenciadas. Para busca por patentes a melhor ferramenta é o Derwent World

Patents Index (DWPI). Porém como patentes são referências mais tecnológicas, não foram utilizadas para este trabalho dado o contexto mais regulatório da Tese.

Da análise dos artigos podemos observar que as tecnologias tem características e aplicações distintas. Muitas companhias estão produzindo biológicos em sementes. Plataformas de expressão baseadas em sementes são mais competitivas em aplicações que requerem um grande volume de proteínas recombinantes por ano. Uma segunda vantagem é que a produção de biológicos em sementes permite que na produção os processos de extração e purificação possam ser dissociados por causa da propriedade de dormência e armazenamento de sementes.

Em contraste, os sistemas de expressão à base de sementes são menos adequados para certas aplicações, tais como a produção de vacinas contra a gripe, que mudam cada ano, devido à quantidade de tempo necessário para produzir quantidades suficientes de sementes, para processamento.

É nesse cenário que a produção transiente em *Nicotiana benthamiana* ganha vigor em número de publicações, devido a tecnologia de manufatura permitindo o desenvolvimento rápido para chegar a uma vacina ou a anticorpos monoclonais para doenças emergentes. Um grande número de publicações sobre produção de vacinas para Influenza e anticorpos monoclonais estão presentes na nossa biblioteca.

A plataforma de expressão em células vegetais em suspensão também é uma plataforma com muitas publicações, principalmente devido ao sucesso da α -galactosidase da Protalix e das tecnologias de glicosilação que esta plataforma permitiu explorar.

Da análise dos artigos referentes aos aspectos regulatórios e de biossegurança e também das legislações pesquisadas nos sites citados, tiramos a base teórica e metodológica para os resultados de análise de lacunas, análise de risco de biossegurança e risco à qualidade e proposições que compõe os resultados deste trabalho, e que serão apresentados nos itens a seguir.

4.2. ANÁLISE DE LACUNAS NA REGULAÇÃO BRASILEIRA

Uma intensa pesquisa exploratória foi realizada nas legislações dos Estados Unidos, União Europeia e Canadá.

Nos Estados Unidos, após a publicação em 1984 da Nota de Registro Federal: “Proposta de um Arcabouço Coordenado para a Regulação da Biotecnologia”, três agências federais estruturaram uma matriz de leis e regulações que governam a avaliação, produção e a distribuição de produtos finais biológicos derivados de plantas transgênicas. Tais produtos estão sob a autoridade do FDA, Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) e da agência de Proteção Ambiental (EPA), dependendo da natureza do produto e sua intenção de uso (BERBERICH; DEVINE, 2005; BREYER et al, 2009). Estes órgãos reguladores norte-americanos e a indústria de biotecnologia consideram os produtos biológicos derivados de plantas transgênicas como uma categoria distinta de culturas geneticamente modificadas para consumo humano e animal, com requisitos de manuseio e controle muito mais rígidos (BERBERICH; DEVINE, 2005; BREYER et al, 2009). No Canadá, atualmente a Agência de inspeção Alimentar Canadense (CFIA) regula as plantas transgênicas produtoras de biológicos da mesma maneira que regula as outras plantas transgênicas (com características inéditas), usando regulamentações que estão sob a Lei Canadense de Sementes e sua regulação - parte 5. Todavia, o Canadá está também revisando estas regulamentações de forma a cobrir questões de liberação ambiental destas plantas transgênicas produtoras de biológicos, especificamente as que serão comercializadas. A CFIA está desenvolvendo uma abordagem que enfoca que estas plantas produtoras de biológicos constituem um risco potencial para a segurança da cadeia alimentar e/ou para o meio-ambiente. Esta nova abordagem reforça a necessidade de um sistema de produção que seja segregado de qualquer outro sistema de produção pertencente à cadeia alimentar e onde apropriado, minimize sua exposição ao meio-ambiente (SPÖK et al, 2008).

Na União Europeia não existe um único órgão ou uma única regulação que contemple as plantas transgênicas produtoras de biológico sem todo seu ciclo produtivo. O uso de plantas transgênicas na Europa está inicialmente, sob a regulação de seus países de origem e com isso submetido ao cumprimento de exigências de uma série de órgãos reguladores. A produção de biológicos em transgênicos têm que aderir aos regulamentos que cobrem desde a utilização confinada de organismos geneticamente modificados (2009/41/ EC), para as fases iniciais de Pesquisa e Desenvolvimento, até material geneticamente modificado

usado em biorreatores bem como o crescimento de plantas inteiras para produção de biológicos em instalações confinadas como casas de vegetação.

A supervisão regulatória para plantas produtoras de biológicos no campo é abrangida pela Diretiva 2001/18 / EC, que regula a liberação deliberada no ambiente de organismos geneticamente modificados. A parte B desta diretiva regula a liberação em campo experimental. A parte C da presente diretiva regula a importação, o cultivo, processamento e a comercialização. A EFSA, que supervisiona a avaliação das plantas geneticamente modificadas para serem liberadas no ambiente, publicou notas de orientação em 2009, sobre a avaliação de riscos de plantas geneticamente modificadas utilizadas para fins não alimentares, incluindo plantas transgênicas como plataforma de produção para biológicos e insumos industriais, como pode ser visto na tabela 3.

Tabela 3 – Visão geral da regulação atual da EU, EUA e Canadá sobre Plantas Produtoras de Biológicos.

Pais	Autoridade	Escopo da regulação	Leis e regulações	Regulações específicas e guias para plantações farmacêuticas
Estados Unidos	USDA-APHIS Serviço Regulatório de Biotecnologia (BRS)	Desenvolvimento e produção no campo, da semente ao grão.	Lei de Proteção a Planta (PPA)	Teste de campo de plantas transgênicas para produção de compostos farmacêuticos e industriais.
		Incluindo o transporte e liberação ambiental	Lei de Proteção Ambiental Nacional (NEPA)	Introdução de plantas geneticamente modificadas para produção de compostos industriais (regra interna).
	FDA Administração de Alimentos e Medicamentos	Supervisão adicional para segurança alimentar	Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (FFDCA)	Guia para Indústria: Medicamentos, biológicos e componentes médicos derivados de plantas transgênicas para uso em humanos e animais.
	EPA Agência de Proteção Ambiental	Revisando a avaliação ambiental da APHIS e suas regulações	Lei Federal de Inseticidas, Fungicidas e Rodenticidas (FIFRA). Lei Nacional de Proteção Ambiental (NEPA) Lei de Controle de Substâncias Tóxicas	Não disponível
Canadá	CFIA Agencia de inspeção alimentar canadense Plant Biosafety Office (PBO)	Liberação ambiental	Lei das sementes e regulação de sementes	Diretiva 2000-07 (conduzindo pesquisa em estudos de campo confinado em plantas com características inéditas no Canadá) e seu aditivo provisório para plantas produtoras de biológicos no campo. Os critérios de avaliação para a avaliação da segurança ambiental de plantas com características inéditas destinados a produção comercial de biológicos.

Pais	Autoridade	Escopo da regulação	Leis e regulações	Regulações específicas e guias para plantações farmacêuticas
	CFIA Sessão de Sementes	Vendas, propaganda, importação, exportação de sementes de plantações farmacêuticas	Lei das sementes e regulação de sementes	Embora não haja nenhum guia específico para plantações farmacêuticas, para a maioria das plantações agrícolas no Canadá o registro da variedade é requerido antes da venda (Seeds Regulation Part III)
	HC	Supervisão adicional para a segurança alimentar		Apresentação de dados de exposição e de risco para que os impactos sobre a saúde humana e animal resultantes da exposição à planta em análise. Além disso, os riscos potenciais decorrentes da introdução acidental de material vegetal para as cadeias alimentares e pecuária será avaliado.
	Produtos para Saúde e Alimentos	Segurança, eficácia e qualidade de medicamentos para autorização para o mercado	Lei de Alimentos e Medicamentos	Diretrizes para Registro e BPF de biológicos produzidos em Plataforma Vegetal.
União Europeia	Autoridades competentes nacionais dos Estados Membros	Fases iniciais de P&D em laboratório; OGM crescido em sistemas fechados de cultura de células (Biorreatores); plantas GM crescidas em confinamento tais como estufas ou salas de ambiente controlado.	Diretiva 2009/41/EC	Uso de OGM em confinamento
União Europeia	Autoridades competentes nacionais dos Estados Membros	Parte B Liberação de estudos de campo experimentais	Diretiva 2001/18/EC	Liberação deliberada no meio-ambiente de organismos geneticamente modificados
	Autoridades competentes nacionais dos Estados Membros, Comissão Europeia e Autoridade de segurança alimentar europeia	Parte C Importação, cultivo, processamento, comercialização		
	Autoridades competentes nacionais dos Estados Membros, Comissão Europeia e Autoridade de segurança alimentar europeia	Aplica-se somente se partes da planta GM vão entrar na cadeia alimentar humana ou animal ou pode também se aplicar se uma cultura alimentar é usada para a produção, mesmo que para fins não alimentares / alimentação	Regulação (EC) 1829/2003	Regulação em alimentos geneticamente modificados

Legenda: BRS: Biotechnology Regulatory Service; FDA: Food and Drug Administration; EPA: Environmental Protection Agency; CFIA: Canadian Food Inspection Agency; HC: Health Canada; PPA: Plant Protection Act; NEPA: National Environmental Protection Act; FFDCA: Federal Food Drug and Cosmetic Act; FIFRA: Federal Insecticide Fungicide and Rodenticide Act; EC: European Community.

Fonte: Revisto e adaptado de (SPARROW et al, 2013; SPOK et al, 2008; BREYER et al, 2009).

No Brasil, foi feita uma busca nos sites dos órgãos que possuem ligação direta com este assunto: (a) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); (b) Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e (c) Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS), e as leis, decretos, resoluções, instruções normativas e diretrizes relacionadas a plantas, sementes, OGM e produtos biológicos foram analisadas. A lista dos documentos analisados e seu escopo estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4 – Legislação vigente no Brasil relacionada a plantas; transgênicos e produtos biológicos.

	Legislação	Disposição
Plantas		
MAPA	Lei 10.711 de 05 de agosto de 2003	Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências.
	Decreto 5.153 de 23 de julho de 2004	Aprova o Regulamento da Lei 10.711 de 05 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças-SNSM, e dá outras providências.
	Instrução Normativa No. 9, de 02 de junho de 2005	Aprovar as Normas para Produção, Comercialização e Utilização de Sementes, e seus respectivos anexos.
Biossegurança		
CTNBio (MCT)	Lei 11.105 de 24 de março de 2005	Estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam OGM e seus derivados.
	Resolução Normativa No. 2, de 27 de novembro de 2006	Dispõe sobre a classificação de riscos de OGM e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção.
	Resolução Normativa Nº 5, de 12 de março de 2008	Dispõe sobre normas para liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados e seus derivados.
MS	Diretrizes Gerais para Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos, 3ª. Edição - 2010	Orientar a estruturação física, recursos humanos e materiais que permitam o procedimento seguro dos serviços e práticas em laboratórios e unidades de saúde que manipulem agentes biológicos.
Produtos Biológicos		
ANVISA	RDC 55, de 16 de dezembro de 2010.	Registro de Produtos Biológicos Novos e Produtos Biológicos.
	RDC 17, de 16 de abril de 2010.	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.
	RDC 69, de 8 de dezembro de 2014.	Regulamento Técnico das Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança; MCT – Ministério da Ciência e Tecnologia; MS – Ministério da Saúde; ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária; RDC – Resolução da Diretoria Colegiada.

Fonte: Elaboração da autora

A análise de lacunas foi realizada, primeiro, analisando todas as referências dos Estados Unidos, Canadá e União Europeia que estão descritas na tabela 3 e elencando quais os critérios importantes que todas as regulações citavam como itens a serem discutidos, inspecionados e ou regulados. Depois, foram lidos todos os documentos brasileiros citados na tabela 4 e pesquisados se estes documentos continham ou faziam menção aos critérios elencados, considerados importantes para a biossegurança na produção de biológicos em plataformas vegetais e o impacto na segurança alimentar, saúde e meio ambiente. As lacunas na regulação brasileira quando comparada com a regulação dos Estados Unidos, Canadá e União Europeia estão representadas na tabela 5.

Tabela 5 – Análise de Lacunas entre a Legislação vigente no Brasil e outros países

Critério	União Européia	Estados Unidos	Canada	Brasil	Lacuna observada
Uso de OGM em contenção	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Legislação específica para plantas geneticamente modificadas produzindo biológicos	Sim¹	Sim	Sim	Não	Sim
Diretrizes para sementes transgênicas	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Hospedeiro e caracterização da planta fonte	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Banco de sementes	Não	Sim	Sim	Não	Sim
Confinamento	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
BPF específica para plataforma vegetal	Não	Não²	Sim	Não	Sim

¹ Apenas para transgênicos. A legislação europeia não contempla a tecnologia de expressão transiente.

² Embora não tenha diretrizes específicas de BPF para plataforma vegetal, adota os critérios de BPF para células animais de uma maneira mais flexível.

Fonte: Elaboração da autora

Da análise das lacunas observadas pode-se dizer que embora a legislação de Biossegurança seja muito abrangente, ainda não há no arcabouço regulatório, regulações ou diretrizes específicas para plantas transgênicas produtoras de biológicos, sejam estas pertencentes à cadeia alimentar ou não.

A CTNBio dispõe na Resolução Normativa No. 5 de 12 de março de 2008 sobre a liberação de OGM. A resolução em vigor atribui à necessidade de avaliar e identificar os riscos, os efeitos adversos potenciais do OGM e seus derivados na saúde humana e animal, assim como no meio-ambiente e nos vegetais, mantendo a transparência, o método científico e o Princípio da Precaução. Todavia, as demais providências citadas nas regulações internacionais quando do uso de plantas transgênicas para a produção de biológicos não estão contempladas nestas resoluções.

O mesmo pode ser avaliado com relação às leis, decretos e instruções normativas sob a responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Em sua regulação do uso e comércio de sementes, não há menção as sementes transgênicas para sistemas de produção em campo aberto de produtos biológicos. Também não há qualquer menção aos controles de qualidade necessários, quando as sementes possuem DNA exógeno.

Já na avaliação das resoluções da ANVISA pode-se ressaltar que não há menção na resolução de registro de produtos biológicos e produtos biológicos novos - RDC 55 de 2010, a produtos biológicos que sejam produzidos em plataformas vegetais. Também não há requerimentos para o preparo e manutenção de bancos de células mestre (BCM) e banco de células trabalho (BCT) quando aplicados a produtos provenientes de plataformas vegetais. A diferença entre um BCM para células cultiváveis e um BCM para plantas é que sementes não podem ser congeladas em nitrogênio líquido. Sementes devem ser estocadas em uma temperatura e umidade que mantenham sua viabilidade. Na RDC 69 de 2014 que dispõe sobre o regulamento técnico de Boas Práticas de Fabricação para produtos intermediários e insumos farmacêuticos ativos também não há menção aos sistemas de produção baseados em plantas transgênicas e ou expressão transiente e assim, não há critérios para a escolha da planta fonte e sua caracterização.

Quando avaliamos a posição do Brasil frente a outros países da América Latina evidenciamos que Cuba, através de seu órgão regulador para medicamentos

(CECMED) já possui uma regulação para registro de produtos biofarmacêuticos obtidos através de plantas transgênicas e que a Diretoria de Biotecnologia do Ministério da Agricultura da Argentina já reconheceu a necessidade de desenvolver regulação específica para plantas transgênicas produtoras de biológicos, já que a regulação argentina atual cobre apenas testes experimentais e não é adequada para requerimentos de atividades de produção contínua após os testes de fase experimental em campo aberto (CECMED, 2006; MA et al, 2013).

Neste cenário vale a pena ressaltar a posição do Canadá que estruturou um arcabouço regulatório para biológicos derivados de plataforma vegetal através de sua Agência Regulatória de Medicamentos (Health Canada) da Área de Meio Ambiente (Environment Canada) e da Agência de Inspeção de Alimentos (Canadian Food Inspection Agency CFIA). A Health Canada também estabeleceu os critérios de BPF que devem ser adotados para cada tipo de sistema tecnológico em plataforma vegetal (HEALTH CANADA, 2014).

A vigilância sanitária tem papel fundamental na promoção e proteção da saúde, suas ações garantem o acesso a produtos e serviços de saúde com padrões adequados de qualidade, segurança e eficácia. Um dos principais instrumentos da vigilância sanitária para exercer o seu papel de controle e fiscalização sobre os produtos e serviços relacionados à saúde é a edição de normas sanitárias. Neste contexto, os produtos biológicos ressaltam-se como um dos segmentos da indústria farmacêutica que mais se desenvolvem, e que necessitam de regulação sanitária específica.

É evidente a necessidade de a regulação sanitária acompanhar a evolução tecnológica das técnicas empregadas na fabricação dos produtos biológicos, deste modo, as RDCs são submetidas à constante revisão e incorporação de novos requisitos. Apesar do inquestionável avanço das autoridades sanitárias no aperfeiçoamento das normas para o registro e alterações pós-registro dos produtos biológicos, alguns ajustes devem ser feitos, como no caso dos produtos derivados de plataforma vegetal que irão despontar no mercado, numa tentativa de abreviar o longo processo de registro aos quais são submetidos os produtos biológicos e melhorar o acesso da população a esses produtos, que são de alto custo, na maioria das vezes.

Segundo o documento de Boas Práticas Regulatórias, a ANVISA já prevê um mecanismo para justificar a revisão ou edição de uma nova RDC. Esta é uma atividade exclusiva da Agência, mais a iniciativa pode partir de vários atores conforme abaixo:

Este é o primeiro passo para a elaboração de um regulamento. A iniciativa deve ser compreendida no Programa como a manifestação expressa da intenção de regulamentar, expedida pela autoridade competente. A finalidade desta etapa é proporcionar maior transparência e integração institucional, além de subsidiar a construção, o acompanhamento e a atualização da Agenda Regulatória a ser oportunamente compartilhada com toda sociedade, segundo prioridades estabelecidas pela direção da Anvisa.

A prerrogativa para editar normas sobre matérias de competência da Agência é atribuição da Dicol e, portanto, deve estar sujeita à iniciativa de seus membros. Em outras palavras, a edição de uma RDC somente poderá se oficializar por ato de um de seus diretores.

Isso não significa que a iniciativa não possa partir da demanda ou de uma proposta dos demais dirigentes de qualquer das unidades organizacionais da Anvisa ou até mesmo de um servidor ou de atores externos, integrantes de outros órgãos e instituições do governo ou da sociedade. Apenas significa que a formalização e a tramitação interna de uma proposta de RDC dependerá da anuência e da autorização de um dos diretores da Agência. (ANVISA, 2008, p.14).

Neste trabalho fizemos a simulação do preenchimento do formulário presente no apêndice D do documento de Boas Práticas Regulatórias (Relatório de Instrução de Proposição) para demonstrarmos que a revisão e/ ou elaboração de uma RDC para registro de produtos biológicos derivados de tecnologias da plataforma vegetal é amplamente justificada (Quadro 1).

Quadro 1 – Relatório de Instrução de Proposição preenchido – Apêndice D do documento de Boas Práticas Regulatórias

1. Descreva brevemente qual o problema ou a situação que a proposta pretende solucionar.

(Por favor, elabore um texto de cinco a dez linhas).

Na avaliação das resoluções da ANVISA pode-se ressaltar que não há nenhuma resolução que contemple registro produtos biológicos que sejam produzidos em plataformas vegetais. Também não há requerimentos para o preparo e manutenção de bancos de células mestre (BCM) e banco de células trabalho (BCT) quando aplicados a produtos provenientes de plataformas vegetais. No regulamento técnico de Boas Práticas de Fabricação para produtos intermediários e insumos farmacêuticos ativos também não há menção aos sistemas de produção baseados em plantas transgênicas e ou expressão transiente e assim, não há critérios para a escolha da planta fonte e sua caracterização.

2. O problema ou situação está no âmbito de atribuições legais e regulamentares da Anvisa? (Se sim, indicar os artigos e parágrafos da lei ou decreto correspondente).

0 () Não.

1 (X) Sim.

Por favor, aponte o(s) dispositivo(s) legal(is) e regulamentar(es):

Lei 6.360 de 23 de setembro de 1976;

Resolução RDC no. 55 de 16 de dezembro de 2010;

Resolução RDC no. 69 de 8 de dezembro de 2014.

3. Em sua opinião, esse problema ou situação pode ser considerado como uma prioridade institucional? (Se sim, indicar objetivamente as razões).

0 () Não.

1 (X) Sim.

Por quê? Vários novos produtos produzidos em plataforma vegetal (seja cultivo de células vegetais, expressão transiente ou transgênicos) estão em desenvolvimento pré-clínico e clínico no mundo inteiro. Um produto desta natureza já foi inclusive registrado na FDA, EMA e Brasil, porém, dada a sua complexidade e natureza peculiar, não há uma regulação específica no Brasil que suporte o registro de produtos desta natureza, bem como contemple sua produção em Boas Práticas de Fabricação.

4. Em sua opinião, se a Anvisa não adotar alguma medida para resolver o problema ou situação qual seria a tendência com relação às consequências? (Marque apenas uma opção)

0 () Agrava-se rapidamente.

1 (X) Agrava-se lentamente.

2 () Mantém-se estável.

3 () Resolve-se lentamente.

4 () Resolve-se rapidamente.

5 () Imprevisível

Continua na próxima página

Quadro 1 – Relatório de Instrução de Proposição preenchido – continuação

5. **O problema ou situação já foi regulamentado por autoridades sanitárias em outros países?** (Se sim, especificar as autoridade e o modo como regulamentaram o assunto em seus países)).

0 () Não.

1 () Desconheço

2 (X) Sim.

Por favor, aponte a(s) autoridades(s) e anexe a documentação correspondente ou indique a referência. WHO; FDA; EMA; Health Canada e CECMED. As referências encontram-se citadas no corpo da tese e no item 6. Referências.

6. **Existem normas vigentes no Brasil que são aplicáveis ao problema ou situação?** (Se sim, indicar as principais normas vigentes: leis, decretos, resoluções, portarias, etc.).

0 () Não.

1 () Desconheço

2 (X) Sim.

Por favor, indique as normas aplicáveis.

Resolução RDC no. 55 de 16 de dezembro de 2010;
Resolução RDC no. 69 de 8 de dezembro de 2014.

7. **Você poderia apontar medidas regulatórias alternativas, além da regulamentação, para a solução desse problema ou situação?** (Escreva as medidas alternativas em forma de tópicos)

- **Não poderia apontar essas medidas alternativas.**

8. **Em sua opinião, entre as alternativas apontadas há uma medida regulatória mais adequada que a regulamentação para solucionar esse problema ou situação?** (Se sim, indicar a medida mais adequada).

0 (X) Não há medida mais adequada.

1 () Sim, há uma medida mais adequada.

Por favor, aponte a medida que você considera mais adequada:

Fonte: Formulário ANVISA preenchido pela autora

A análise da regulação de outros países e a análise de lacunas em relação ao arcabouço regulatório brasileiro também nos permitiu identificar que diferentemente de países como Estados Unidos e Canadá e membros da União Europeia, o Brasil não possui um arcabouço regulatório que reúna todos os órgãos competentes no assunto (MAPA, ANVISA e CTNBio) e uma matriz regulatória que permita uma articulação entre as leis, normas, resoluções, instruções normativas já existentes.

Tomando por base apenas o exemplo do Canadá no que concerne a fiscalização de medicamentos biológicos derivados de plantas podemos observar que a avaliação pré-comercialização da segurança, qualidade e eficácia dos medicamentos biológicos derivados de plantas é da responsabilidade do Health Canada, em particular, da Diretoria de Biológicos e Genética (Biologics and Genetic Therapies Directorate - BGTD). A Lei de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drugs Act*) e regulamentos são administrados em parceria com outras áreas dentro da Agência Regulatória, como a Diretoria de Produtos de Saúde Comercializados (Marketed Health Products Directorate - MHPD) e Inspeção dos Produtos de Saúde e Alimentação (Health Products and Food Branch Inspectorate - HPFBI).

Health Canada (HC), Environment Canada (CE), e a Agência Canadense de Inspeção de Alimentos (CFIA) compartilham responsabilidades regulatórias para medicamentos biológicos derivados de plantas, com base em seus papéis diferentes no que diz respeito ao organismo de produção, ou seja, como o medicamento biológico derivado de planta é produzido e o produto final, o medicamento biológico derivado de plantas. Produtores de medicamentos biológicos derivados de plantas devem consultar estes 3 departamentos / agências com base nas seguintes considerações:

1. Medicamento biológico derivado de planta

- A Divisão de Produtos para Saúde e Alimentos da Agência Regulatória do Canadá (*Health Canada's HC Health Products and Food Branch (HPFB)*) supervisiona a segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos para a autorização de comercialização no Canadá cuja legislação aplicável é a Lei de Alimentos e Medicamentos e as regulações de Alimentos e Medicamentos.

- Environment Canada's (EC) and HC's Healthy Environments and Consumer Safety Branch (HECSB) administram conjuntamente o Programa de Novas Substâncias, que supervisiona a avaliação ambiental e avaliação indireta à saúde humana de drogas no Canadá (legislação aplicável é a Lei de Proteção Ambiental do Canadá de 1999 e os regulamentos de notificação de novas substâncias (produtos químicos e polímeros)). A droga derivada da tecnologia de *Molecular Farming* (PMF) pode exigir a notificação prévia para importar ou fabricar acima de certos volumes. Essa avaliação será feita pela Unidade de Avaliação Ambiental (EAU), dentro do Escritório de Avaliação e Controle das Novas Substâncias (NSACB) no HC-HECSB. Um produtor deve entrar em contato com o Programa de novas substâncias para determinar se e / ou quando a avaliação ambiental é necessária para a droga PMF.

2. Organismo de Produção PMF

- O Escritório de Biossegurança de Plantas (PBO) da Agência de Inspeção Alimentar do Canadá (CFIA) supervisiona as plantas com características inéditas (PNT), plantadas no ambiente, incluindo plantas que produzem medicamentos biológicos derivados de plantas (a legislação aplicável é a Lei de Sementes e Regulamentos de Sementes, ou a Lei de Proteção das Plantas e os Regulamentos de proteção fitossanitária). Além disso, a Divisão de Alimentação Animal da CFIA regula a fabricação, venda e importação de alimentos para gado no Canadá (legislação aplicável é a Lei de Ração e Regulamentações de alimentação animal). Um produtor deve entrar em contato com PBO da CFIA quando a fabricação do medicamento envolve a liberação ambiental ou seja, importação, ensaios de campo de pesquisa, resíduos de colheitas e produção comercial nos campos. Um produtor deve entrar em contato com a Divisão de Alimentação Animal da CFIA se pensando em usar a cultura PMF, no todo ou em parte, ou seus derivados, em campos de produção de alimentação para criação de animais no Canadá. Isto também se aplica aos ensaios de pesquisa de produção de alimentação de gado realizados no Canadá, utilizando ingredientes de rações não aprovados.
- EC e o Programa de Novas Substâncias da HC-HECSB supervisionam a avaliação ambiental e a avaliação indireta à saúde humana de novas

substâncias, incluindo os organismos de produção à base de plantas que caem fora do âmbito da Lei de Sementes e Regulamentos de sementes (legislação aplicável é a Lei de Proteção Ambiental do Canadá de 1999, e Regulamentos de Notificação de Novas Substâncias (organismos)). Um produtor deve entrar em contato com o Programa de Novas Substâncias antes da importação ou fabricação desses organismos produtores PMF, quando a fabricação da droga ou a importação envolve células vegetais cultivadas em biorreatores ou para tecidos de plantas cultivados em laboratório.

- Agência Regulatória de Gerenciamento de Pestes (PMRA) da HC supervisiona a regulação de pesticidas, o que significa a sua aprovação e registro (legislação aplicável é a Lei de Produtos para Controle de Peste). Um produtor deve entrar em contato com a PMRA quando fabricação de medicamentos envolve o uso de pesticidas aplicados à cultura / planta da qual o medicamento foi derivado.

Em resumo, HC-HPFB e o Programa de Substâncias Novas (que é EC e HC-HECSB) e estão interessados no **medicamento** derivado da planta, quer seja a partir de células / tecidos / plantas inteiras; CFIA está interessado nos **organismos de produção**, ou seja, plantas inteiras que se enquadrem no âmbito da Lei de Sementes, dos Regulamentos de Sementes, da Lei de Proteção das Plantas e os Regulamentos de proteção fitossanitária ou Lei de Ração e Regulamentações de alimentação animal; o Programa de Substâncias Novas (que é EC e HC-HECSB) está interessado nos **organismos de produção** por exemplo, uma linhagem de células de plantas, que estão fora do âmbito da Lei de Sementes e Regulamentos de Sementes; e PMRA está interessado nos **pesticidas** utilizados no organismo de produção.

Agriculture and Agri-Food Canada, Industry Canada e Natural Resources Canada não tem autoridade reguladora direta sobre medicamentos biológicos derivados de plantas. No entanto, os produtores de medicamentos biológicos derivados de plantas são convidados a consultar estes departamentos para o seguinte:

- *Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC)* fornece programas, como o Programa de Agri-Inovação (AIP), para o qual as empresas podem considerar a aplicação para obtenção de financiamento para ajudar com pesquisa e desenvolvimento ou desenvolvimento de vias comerciais. O interesse da AAFC é do ponto de vista da inovação, relacionado P & D com os aspectos

económicos das novas tecnologias agrícolas, como a PMF, que são um importante motor de inovação no setor da agricultura no Canadá.

- *Industry Canada* (IC) trabalha para transmitir os pontos de vista e os impactos na a indústria sobre questões políticas e regulatórias que afetam a competitividade do setor das ciências da vida. Ela também atua como um ponto focal para ajudar as empresas na compreensão de como o governo pode ajudar a apoiar seus negócios. IC está envolvida em questões relacionadas com a PMF, dada a importância desta plataforma tecnológica emergente para a indústria farmacêutica canadense.
- *Natural Resources Canada* (NRCan) fornece informações sobre o uso potencial de espécies florestais como plataformas para a PMF e seu impacto sobre o setor florestal. Os interesses do NRCan, mais especificamente, do Serviço de Florestas Canadense, são fundados na competitividade e sustentabilidade de recursos por meio da inovação e diversificação do setor, pela construção de uma bioeconomia e pela produção de produtos de valor agregado a partir de espécies florestais. NRCan tem conhecimento e experiência em ecologia, genética e produtividade das espécies florestais.

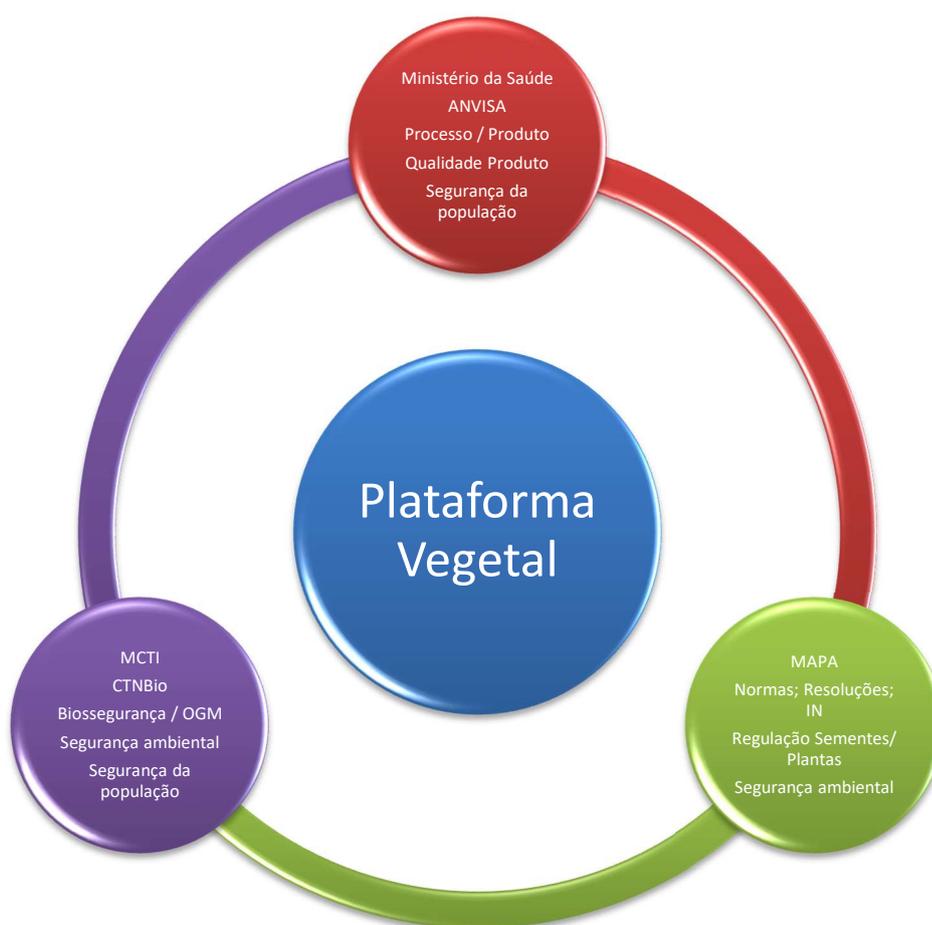
No artigo já publicado pelo nosso grupo (GUIMARÃES et al, 2014) destacamos nossa proposta de organização dos entes envolvidos, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); Ministério da Saúde (MS) e Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) para que comecem a discutir a plataforma vegetal na produção de biológicos de maneira integrada, incluindo nesta discussão todos os representantes envolvidos como a sociedade civil, instituições de pesquisa na área e empresas produtoras objetivando a elaboração de arcabouço regulatório para plataforma vegetal.

Mais especificamente a atuação do MAPA se daria através da elaboração de normas, resoluções ou instruções normativas na área de regulação de sementes e plantas para plataforma vegetal, visando a dimensão da segurança ambiental. O MS, através da ANVISA, regularia o processo produtivo e o produto biológico, visando sua qualidade e a dimensão da segurança sanitária da população e o MCTI, através da CTNBio regularia as questões de biossegurança, como a liberação do uso de OGM

para plataforma vegetal, visando ambas as dimensões de segurança ambiental e segurança da população (figura 12).

O assunto é vasto e complexo, pois além de representar um desenvolvimento tecnológico significativo e uma produção industrial considerável, o uso desta plataforma deve ser bem avaliado a fim de que sejam preservadas a saúde e o bem estar humano e animal, além do impacto que possa causar no meio ambiente.

Figura 12 – Organização dos entes envolvidos na regulação da plataforma vegetal



Fonte: Elaboração da autora – GUIMARÃES et al, 2014

Esta proposta foi corroborada muito recentemente em abril de 2016, quando a Anvisa decidiu que os mosquitos geneticamente modificados, utilizados para controle de vetores em saúde pública, são objeto de regulação sanitária, no que diz respeito à segurança sanitária de seu uso e em relação à sua eficácia. Essa é uma nova tecnologia que tem sido apresentada como um instrumento para controle de vetores.

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) já havia aprovado, preliminarmente, a liberação comercial da linhagem OX513A do *Aedes aegypti*, mosquito geneticamente modificado para controlar a população do vetor do vírus da dengue.

Entretanto, a própria Lei de Biossegurança, a Lei 11.105 de 2005, prevê que, além da análise da CTNBio relativa aos aspectos de biossegurança, caberá aos órgãos específicos dos Ministérios o registro e a fiscalização comercial dos organismos geneticamente modificados (OGM).

No caso dos mosquitos transgênicos para uso em controle de vetores, a Anvisa analisará e concederá o registro desses produtos após avaliação de sua segurança e eficácia. Para dotar o país de um marco regulatório capaz de avaliar esse e outros produtos semelhantes que venham a ser desenvolvidos, a Agência já vem elaborando novas regras, sob o tema 54.1 da Agenda Regulatória 2015-2016, “Avaliação de Macroorganismos para fins de controle biológico de vetores e patógenos em ambiente urbano” (ANVISA, 2016).

Desta forma, a fim de subsidiar um possível registro de produtos biológicos produzidos em plataforma vegetal, neste caso especificamente a vacina de Febre Amarela Subunitária, em um ambiente BPF, este trabalho realizou uma análise de risco à qualidade, utilizando a ferramenta HACCP através do levantamento do fluxograma de produção, da descrição detalhada de cada operação unitária de processo e do levantamento de pontos críticos de controle do processo. As tabelas apresentadas tem como função expor e consolidar os pontos críticos elencados, os parâmetros de processo e os parâmetros operacionais críticos, bem como os controles de qualidade sugeridos, além das especificações para cada teste de controle.

4.3. ANÁLISE DE RISCO – EXPRESSÃO TRANSIENTE – VACINA FEBRE AMARELA SUBUNITÁRIA COMO MODELO - ESTUDO DE CASO

4.3.1. Descrição do processo de expressão transiente do antígeno proteico em vegetais

O processo descrito neste item é baseado na tecnologia de expressão transiente de proteínas em vegetais da Fraunhofer/iBio e, mais especificamente, de produção de antígenos do vírus causador da febre amarela para o preparo de vacinas, que nesta tese é utilizado como Estudo de Caso e configura-se um detalhamento do fluxograma de produção descrito na figura 13.

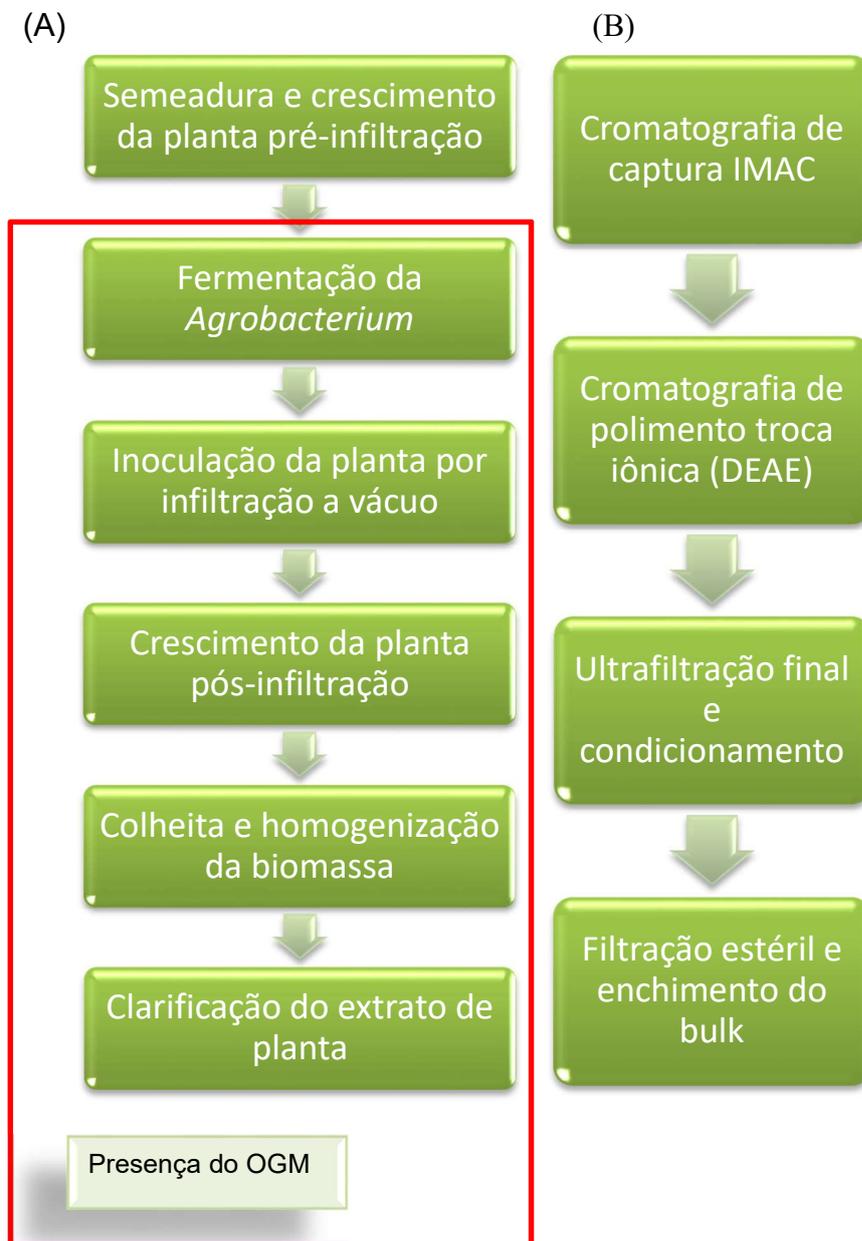
Esta descrição é baseada em observações da autora quando de sua ida à Fraunhofer em três oportunidades distintas: março de 2012; janeiro de 2013 e agosto de 2013, e também das análises dos relatórios de desenvolvimento do produto.

Nestas ocasiões a autora teve a oportunidade de visitar as instalações da planta piloto BPF e acompanhar e discutir as etapas de processo. Como consequência todas as especificações de processo listadas abaixo são baseadas no conhecimento atual do processo existente na Fraunhofer para produção em escala de 50 kilogramas de biomassa.

Vale ressaltar que como a vacina ainda está em processo de desenvolvimento a exata métrica para escalonamento futuro, bem como desempenho operacional não podem ser garantidos. A estratégia empregada para as etapas de purificação em colunas cromatográficas pode variar consideravelmente de produto para produto, tipo de resina assim como para o tipo de operação da coluna (ligação-eluição / fluxo contínuo).

O fluxograma de produção está demonstrado nas figuras 13A e 13B.

Figura 13 – Fluxograma de produção do antígeno proteico em tecnologia de expressão transiente



Legenda: 13A - O processo de fabricação à montante (*upstream*) para produzir o Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA). As etapas circundadas de vermelho representam os processos onde há presença do Organismo Geneticamente Modificado OGM. 13B - O processo de fabricação à jusante (*downstream*) para produzir o Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA).

4.3.1.1. O processo de fabrico à montante (*upstream*) para produzir o Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA)

Os sistemas para irrigação e preparo de nutrientes para as plantas, estão instalados na área de Crescimento de Plantas. Cada sistema de irrigação é dedicado a uma linha idêntica de módulos de crescimento. Cada sistema de irrigação fornece um fluxo de solução de nutriente circulante a partir dos tanques de solução de nutrientes que proporciona toda a água e nutrientes necessários para os módulos de crescimento das plantas. Existem tanques separados que fornecem irrigação para os módulos de crescimento pré-infiltração por meio de bombas, dos tanques que fornecem irrigação para os módulos de crescimento pós-infiltração também por meio de bombas.

Esses tanques são continuamente e individualmente alimentados com a solução de nutrientes e com nitrato de cálcio por meio das unidades de mistura em linhas, onde as soluções encontram-se 100x concentradas e são misturadas e diluídas em água purificada (Purified Water - PW). Considera-se, neste processo, que essa solução de nutriente consiste de uma solução hidropônica de Peter, preparada por meio da diluição de componentes em pó, separados e pesados em área segregada, com água purificada em uma estação de mistura de solução de nutriente. Da mesma forma, a solução padrão de nitrato de cálcio é preparada através da mistura de sal nitrato de cálcio, com PW em uma estação de mistura de nitrato de cálcio.

Entre os lotes, os tanques do sistema de irrigação passam por uma limpeza *in situ* (*Cleaning In Place* - CIP). Assume-se que o procedimento CIP consiste de ciclos de enxágue com água purificada (PW), hidróxido de sódio, um segundo enxágue com PW e um último enxágue com água para injeção (WFI). Todo o resíduo vai para o sistema de drenagem de descarte de água não contaminada (figura 14).

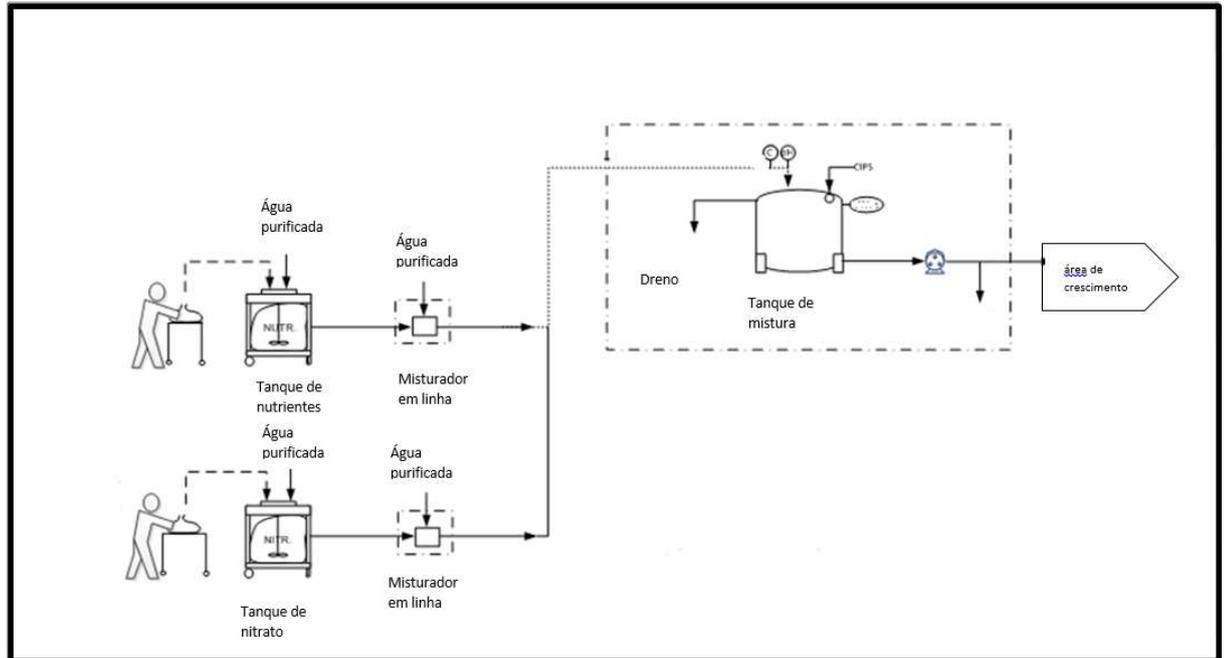


Figura 14 – Desenho esquemático do processo de preparo de nutrientes

O cultivo de plantas para a colheita de sementes padrão para serem usadas no processo ocorre na sala de Cultivo de Sementes na área de produção (figura 15). Esta sala é mantida a uma temperatura entre 24 - 26° C com a umidade na faixa dos 40 - 80%. As bandejas com as mudas são manualmente montadas usando os suportes de mudas e o solo. A solução de nutrientes a ser utilizada no cultivo das sementes vegetais é preparada através da mistura manual de nutrientes em pó, vindos do almoxarifado, com água purificada.

Os suportes montados para as mudas são semeados com as sementes do banco de sementes de trabalho e, manualmente, adiciona-se a solução de nutriente às bandejas com as mudas. O banco de sementes de trabalho é mantido em um refrigerador. As mudas são germinadas em câmara de germinação em uma temperatura entre 24 - 26° C e com umidade relativa de 80%. Após ficarem entre 2 a 3 semanas nessa câmara de germinação, as mudas são transplantadas para vasos com 25 cm de diâmetro, utilizando o solo. As bandejas e o solo utilizados na germinação são descartados como resíduos inativos.

Então, esses vasos com as plantas são transferidos manualmente para os módulos de crescimento das sementes, estufas com uma única prateleira. Todos os módulos são abastecidos com nutrientes via um sistema de irrigação. A solução de nutriente é preparada manualmente através da mistura de PW com componentes de

nutrientes em pó, provenientes do almoxarifado, em um tanque plástico opaco. Essa solução de nutriente é diluída em água purificada no misturador antes de ser distribuída. Todo o resíduo vai para o sistema de drenagem de descarte de água não contaminada.

A irrigação das plantas com sementes no seu desenvolvimento completo é removida e são deixadas para secar até que os suportes das sementes estejam secos. A colheita é realizada manualmente cortando os ramos, agitando as plantas e coletando as suas sementes. As bandejas usadas e o solo de cultivo das plantas são eliminados como resíduos inativos. As sementes colhidas são armazenadas em um refrigerador.

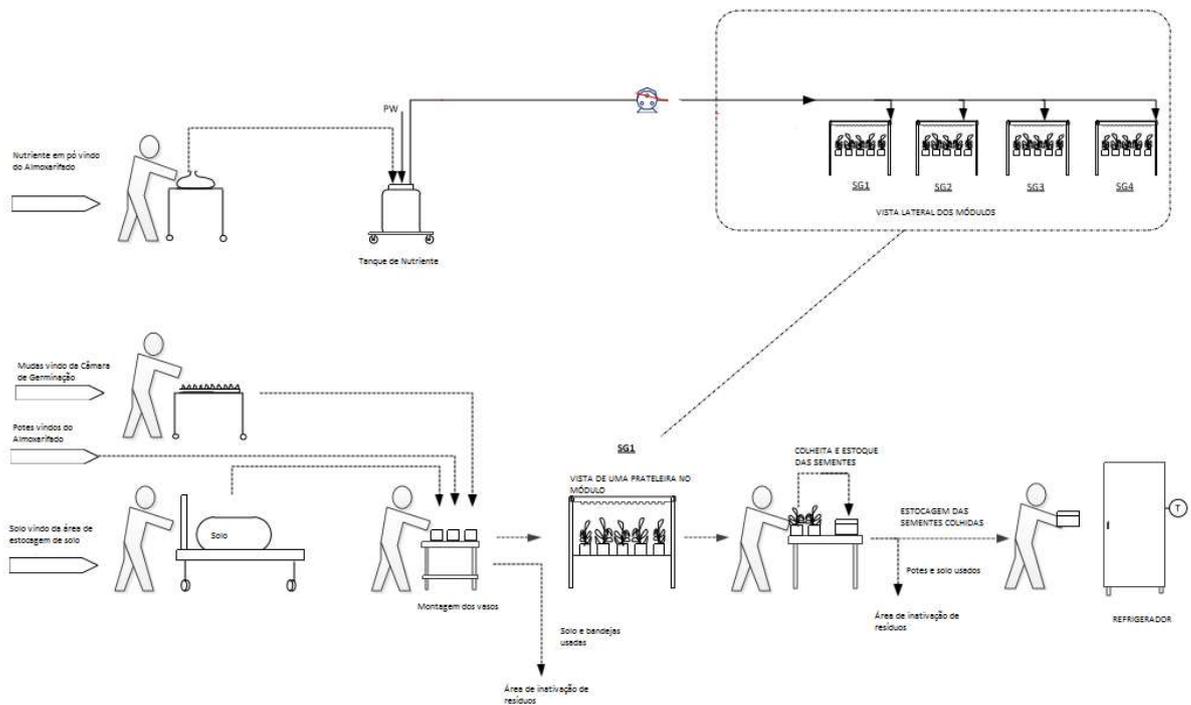


Figura 15 – Desenho esquemático do processo de cultivo de sementes

As bandejas montadas com lã de rocha são transferidas manualmente da área de preparo de bandejas para a semeadura e nebulização. A Fraunhofer possui uma unidade de semeadura e nebulização, e esta unidade fornece as bandejas semeadas para a linha automatizada que contém os módulos de crescimento, ou seja, após a semeadura não há mais contato manual do operador com a bandeja e, por conseguinte com a semente.

Um elevador de bandejas retira as bandejas do carrinho e as posiciona na esteira transportadora com o menor lado voltado para a área de semeadura. Então, a bandeja é conduzida para a unidade automatizada de semeadura e nebulização na qual um injetor de sementes aplica as sementes individualmente. A transferência de uma única semente por injetor é garantida por meio de um jato de ar através do injetor que, após a sua colheita, remove o excesso de sementes antes de colocar essa única semente em uma posição definida na lã de rocha seca. Depois disso, um bico nebulizador fornece uma pequena quantidade de água purificada que empurra levemente as sementes para o interior da lã de rocha. Esse procedimento aumenta a superfície de contato da semente com a lã de rocha ao mesmo tempo em que melhora a absorção da solução nutriente, permitindo uma saturação rápida e completa da lã de rocha.

As bandejas semeadas são movidas pela esteira transportadora até o elevador de bandejas automatizado, que as transfere para suas respectivas posições nos módulos de crescimento designados conforme esquematizado na figura 16.

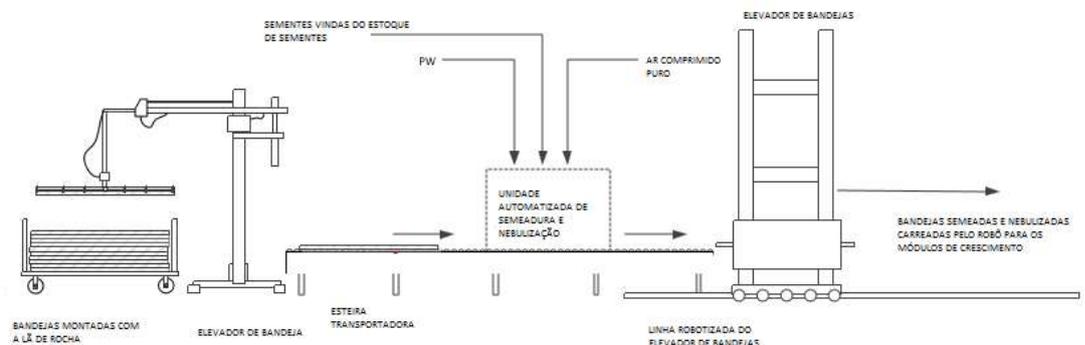


Figura 16– Desenho esquemático do processo de semeadura e nebulização

As bandejas semeadas e nebulizadas são transportadas e posicionadas pelos elevadores de bandejas automáticos nos seus respectivos módulos de crescimento. Esses elevadores funcionam posicionados em cima das Linhas Automatizadas de Elevador de Bandeja existentes ao longo das unidades de semeadura e de nebulização e das linhas de crescimento.

Uma vez que todas as bandejas estão semeadas e posicionadas no módulo de crescimento, o sistema de irrigação é acionado. Durante a irrigação, a lâ de rocha é saturada pela solução de nutrientes que é bombeada do Tanque de solução de nutrientes. Todos os módulos de crescimento pertencentes a mesma linha recebem a solução através do sistema de irrigação do seu respectivo tanque de nutrientes (figura 17).

O crescimento da planta ocorre, no tempo ideal, em 4-5 semanas (faixa de segurança de 4-6 semanas), a uma temperatura aproximada de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com 14 h de luz por dia a uma intensidade de $110\text{-}115 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ e em uma atmosfera de nitrogênio a 50 ppm. Quando as plantas de um lote atingem um tamanho e peso ideal, os elevadores de bandejas movem as bandejas para uma esteira que as transportará, passando por uma porta deslizante, para uma área de classe D na sala de Infiltração.

Entre cada lote de produção das plantas, o sistema de irrigação deve passar por uma limpeza *in situ* (CIP) que consiste em: um primeiro enxágue com PW, seguido por uma solução de hidróxido de sódio e um segundo enxágue com PW através do caminho do fluxo de irrigação que é iniciando na sala de preparo de soluções de nutrientes para irrigação. Todo o resíduo inativo oriundo do sistema de irrigação é drenado para o sistema de descarte de água não contaminada.

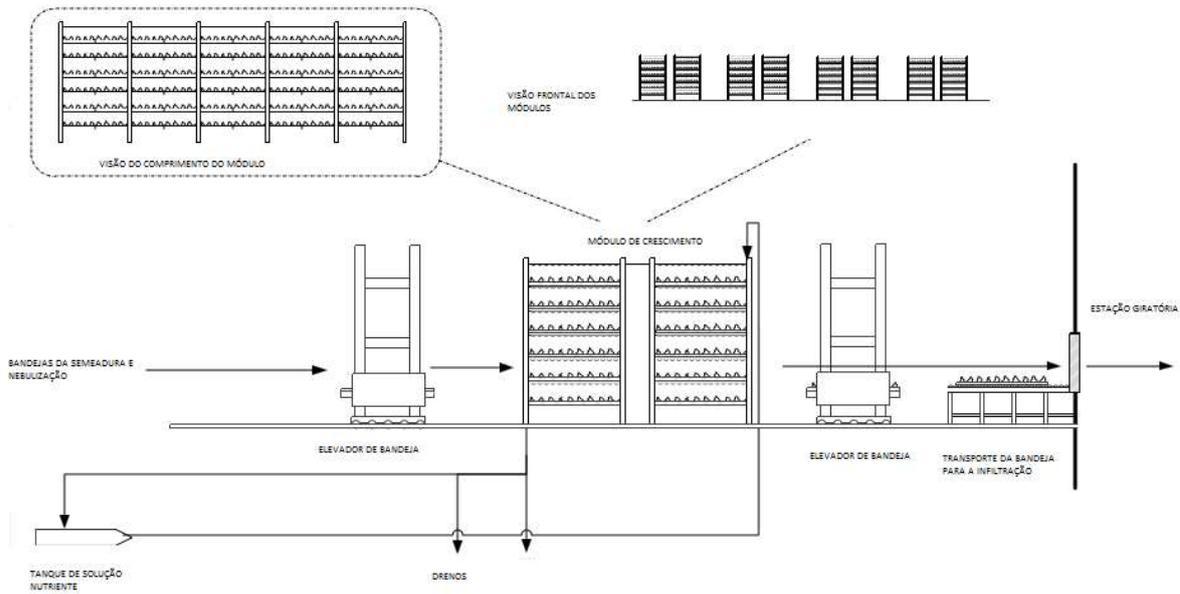


Figura 17 – Desenho esquemático do processo de crescimento das plantas pré-infiltração

O meio para inóculo e a solução de glicose para a fermentação da produção são esterilizados na autoclave localizada na sala de Preparo de Inóculo na unidade de produção.

A solução de glicose já esterilizada é transferida através de um pass through para a sala de Fermentação onde será usada para a fermentação de produção.

Uma ampola do banco de células de trabalho (BCT) com a cepa escolhida de *Agrobacterium tumefaciens* armazenada em nitrogênio é transferida para uma cabine de biossegurança, onde é descongelada para inocular o meio esterilizado dentro do frasco de inóculo.

O frasco é incubado *overnight* em uma incubadora com agitação a 225 rpm e temperatura a 28° C. Mantendo esses parâmetros de operação, assume-se que seja atingida uma densidade celular >1 , conforme medida pela DO 600. Depois de atingida a DO (densidade óptica) definida, a cultura do inóculo é transferida do ambiente classe C através do pass through para a sala de Fermentação com classe D, para ser usada na fermentação conforme descrito na figura 18. Todos os frascos e bolsas de preparo do tipo descartáveis são inativados em uma autoclave antes de serem transferidos para a área de coleção de resíduos.

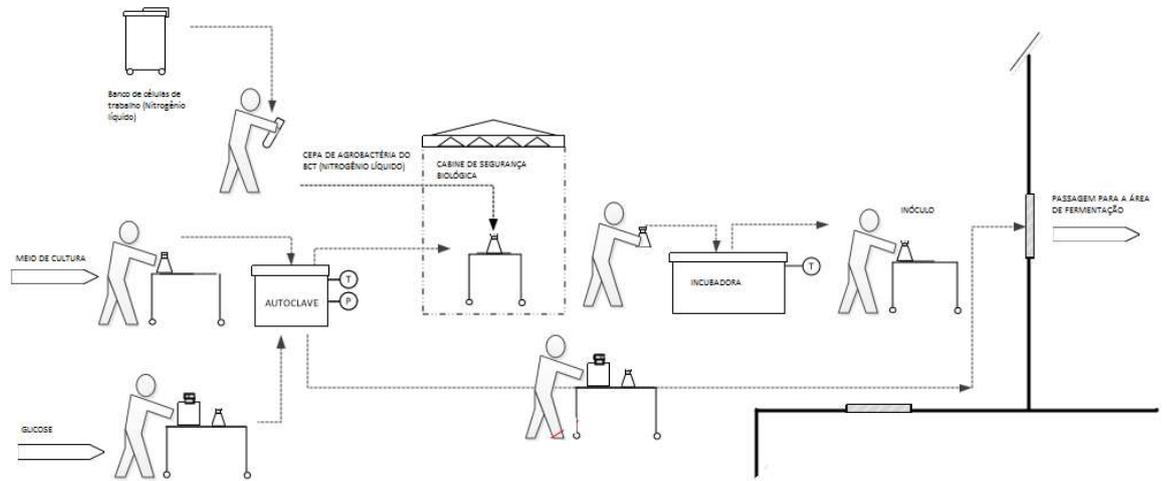


Figura 18 – Desenho esquemático do processo de pré-inóculo

A cultura do inóculo de agrobactérias do banco de células de trabalho é usada para inocular a fermentação. O meio de cultura é transferido para o fermentador por uma bomba peristáltica, seguido de uma esterilização *in loco*. Opcionalmente a esterilização do meio de cultivo pode ser feita através de filtração estéril. O fermentador é um tanque de agitação de aço inoxidável de desenho tradicional para cultura microbiana.

O conteúdo da fermentação de inóculo é transferido para o fermentador por meio do uso de uma bomba peristáltica e de uma mangueira flexível descartável. A fermentação é realizada a 28° C, usando uma taxa de fluxo de ar de 40 L/min e OD (oxigênio dissolvido) 50% e é alimentada com 1 ml/min de 50% de glicose pela bomba peristáltica por um tempo previsto de 20-24 horas, momento em que o crescimento celular atinge seu pico. Essa adição de glicose é controlada por uma balança. Já o pH do meio de cultura das agrobactérias é controlado durante a fermentação e, se necessário, é ajustado por meio de uma dosagem extra com hidróxido de sódio (base) para manter o pH dentro do intervalo definido de pH 7,0. Além disso, também serão feitas pequenas adições de antiespumante no fermentador quando necessário.

Após a densidade celular ter atingido o nível desejado, o conteúdo do fermentador de produção é transferido para o tanque de agrodiluição, que está localizado na mesma sala. Nesse tanque o nutriente de fermentação é diluído com

água para injetáveis para que DO seja igual a 1. O volume adicionado é controlado via célula de carga (figura 19).

Entre a produção dos lotes, efetuam-se procedimentos de limpeza *in situ* (CIP) no fermentador e no tanque de diluição. Os ciclos de CIP estão sujeitos a alterações, se necessário, dependendo do processo. Mas, nesta descrição, esses ciclos consistem de um enxágue com PW, um jato com ar comprimido puro (ACP), recirculação com hidróxido de sódio, um jato de ar, um último com WFI e um jato de ar. Todos os resíduos ativos são despejados no sistema de drenagem dedicado para descarte de água contaminada com material biológico para inativação. O procedimento CIP é seguido de um procedimento de Esterilização *in situ* (*Steam in Place* – SIP) com vapor puro (VP). Todos os frascos de preparo descartáveis utilizados, e todas as bolsas, são inativados no interior da autoclave antes da disposição final dos resíduos.

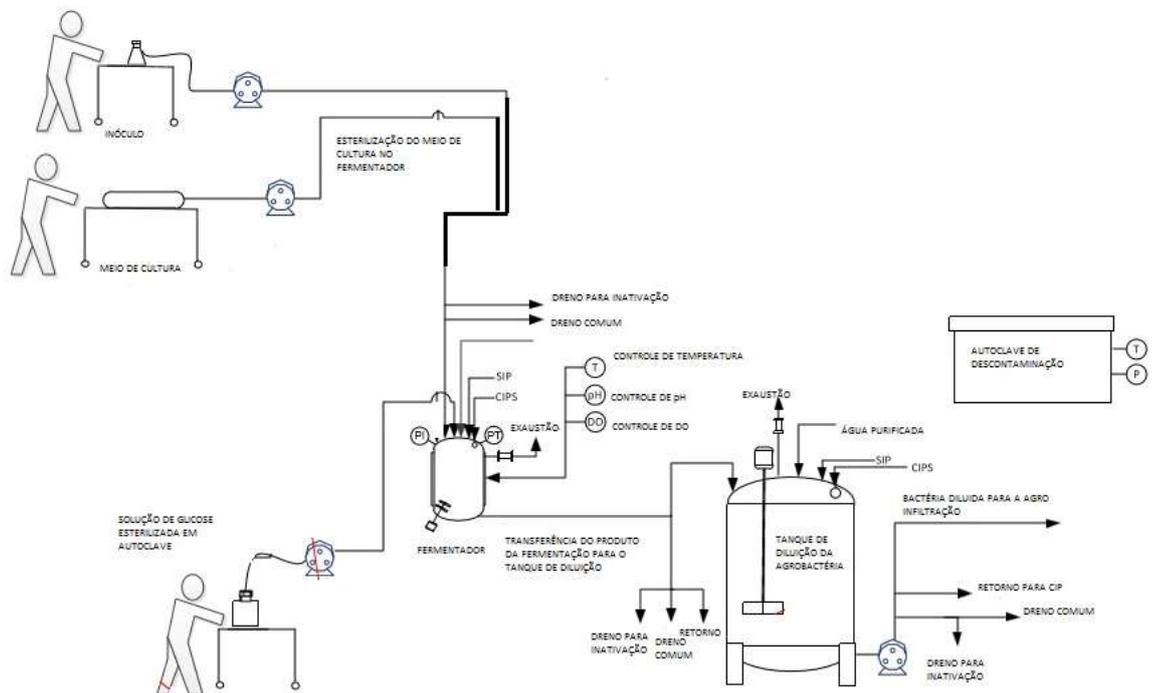


Figura 19 – Desenho esquemático do processo de fermentação

As bandejas com as plantas de cada linha de módulo de crescimento na sala de Crescimento de Plantas Pré-Infiltração são transportadas por uma esteira para a linha de infiltração na sala de Infiltração. Então, as bandejas são viradas de cabeça para baixo na estação giratória e movidas por garras de elevação para a câmara de drenagem, onde o excesso de líquido é drenado das plantas e da bandeja. Após isso, uma garra de elevação move a bandeja para a câmara de infiltração onde as plantas são imersas em uma suspensão de agrobactérias diluídas, que vem do tanque de diluição de agrobactérias. Neste momento é aplicado vácuo (<100 mbar de pressão absoluta) durante 1 minuto. O vácuo é gerado por uma bomba de vácuo conectada a um unidade de filtro de ar localizada na área Técnica.

Depois disso, uma garra de elevação move as bandejas para uma câmara de enxágue, onde as bandejas e as plantas são submersas em água purificada para serem lavadas. As bandejas são então movidas por outra garra de elevação para outra câmara de drenagem para remover o excesso de líquido. Finalmente, as bandejas são viradas novamente para cima pela estação giratória e colocadas na esteira que as conduz para a área de Crescimento Pós-Infiltração através de uma porta deslizante. No fim do procedimento de infiltração, todo o líquido é drenado para dentro do sistema de drenagem de água contaminada com material biológico para inativação (figura 20).

Entre cada lote de produção, a linha de infiltração é submetida a um processo CIP. Os ciclos de CIP estão sujeitos a alterações, se necessário, dependendo do processo. Neste processo de produção de antígenos para febre amarela, assume-se que esses ciclos consistem em: um enxágue com PW, um jato de ar comprimido puro (ACP), recirculação com hidróxido de sódio, um jato de ar, um enxágue final com PW e um jato de ar. Todos os resíduos ativos são despejados no sistema de drenagem de água contaminada com material biológico – inativação. Todos os resíduos inativos vão para o sistema de drenagem de água para descarte não contaminada. Finalmente, a sala é fumigada com peróxido de hidrogênio para descontaminar a área de Infiltração.

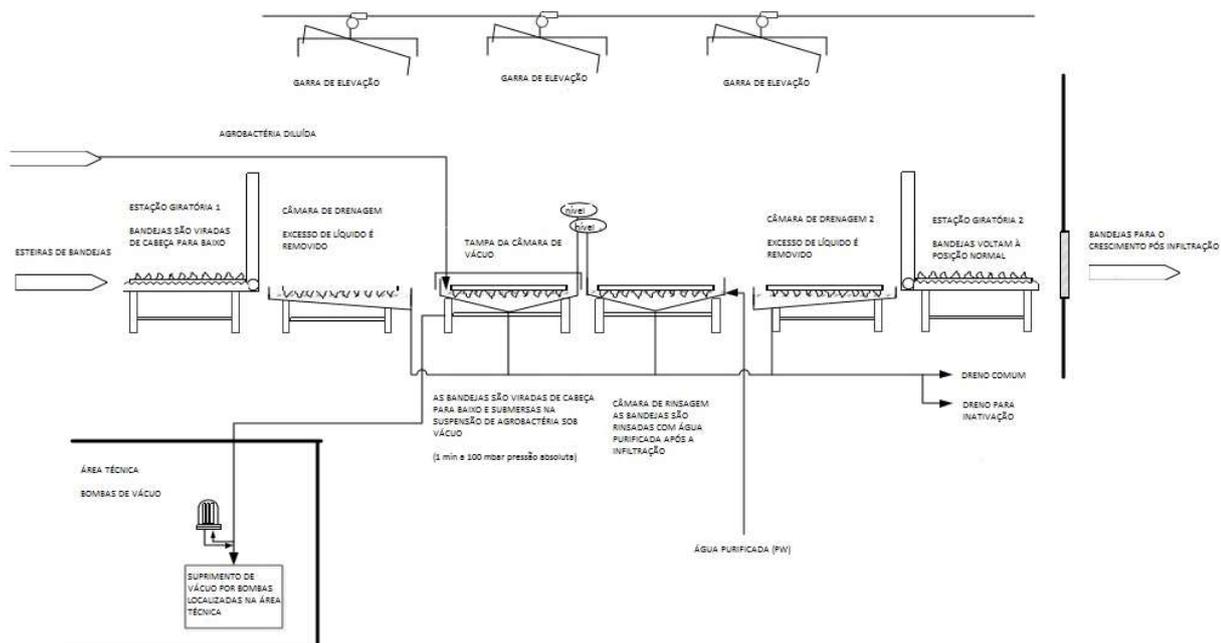


Figura 20 – Desenho esquemático do processo de agroinfiltração a vácuo

As bandejas vindas da Infiltração, que passaram pela porta deslizante, são, então, transportadas pela esteira e posicionadas pelos elevadores de bandejas das linhas automatizadas nos seus respectivos módulos de crescimento.

O crescimento das plantas pós-infiltração ocorre por um período de aproximadamente 7 dias (podendo variar entre 5 a 9 dias), a uma temperatura aproximada de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com uma luz de intensidade de $110\text{-}115 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, por 14 h por dia e em uma atmosfera de nitrogênio a 50 ppm. Durante esse tempo, os níveis de proteínas são analisados. As plantas de um lote são consideradas prontas para a colheita quando o seu peso total atingir um valor estimado de 50Kg.

Na colheita, os elevadores de bandejas transferem as bandejas para as linhas de esteiras elevadas, montadas sob o teto, que as transportam para a área de Colheita através de uma porta deslizante. Essas esteiras elevadas possuem calhas para coletar os respingos, evitando, dessa forma, que haja contaminação cruzada (figura 21).

Após cada lote de produção, o sistema de irrigação é submetido a um processo CIP, que consiste de: um primeiro enxágue com água purificada (PW), um enxágue

com solução de hidróxido de sódio, um segundo enxágue com PW e um último enxágue com WFI.

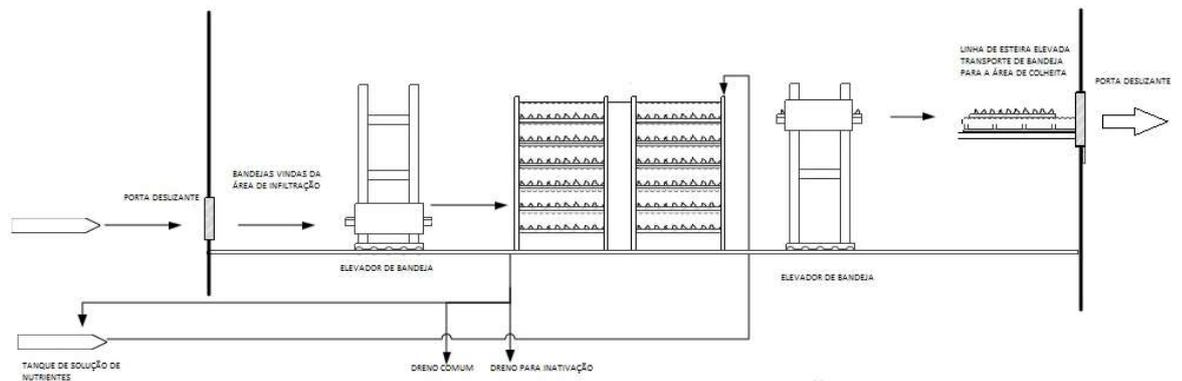


Figura 21 – Desenho esquemático do processo de crescimento das plantas pós infiltração

As bandejas de plantas de todas as linhas de módulo de crescimento pós-infiltração são transportadas para a colheita pela linha de esteira rolante elevada. As bandejas das linhas dos módulos de crescimento são direcionadas para a unidade de corte, colheita e maceração que consiste das seguintes unidades individuais: Colheitadeira/Corte, funil para planta e macerador.

Na primeira etapa da colheita, as bandejas são viradas para baixo (180°) para cortar o material vegetal da lã de rocha. Depois disso, as plantas são picadas, despejadas e maceradas dentro do respectivo tanque resfriado e encamisado para mistura por agitação, que contém o tampão de extração pré-refrigerado ($2 - 8^\circ \text{C}$).

Após a mistura com o tampão de extração resfriado, o extrato vegetal da saída do tanque para mistura é transferido para a homogeneização. Esse tanque é, então, enxaguado com o tampão de lavagem, através do mesmo sistema de suprimento e da mesma bomba usados para o tampão de extração que, depois, seguirá mais adiante para o homogeneizador.

As bandejas vazias são transferidas da Colheita para a sala de Lavagem para armazenagem e posterior lavagem (figura 22).

Entre cada lote processado, cada tanque para mistura passa por um processo de CIP, aqui considerado como um enxágue com PW, enxágue com hidróxido de sódio, um segundo enxágue com PW e um último enxágue novamente com WFI. Todos os resíduos ativos são despejados no sistema de drenagem de água contaminada com material biológico para inativação. Após o ciclo de limpeza, o equipamento passa por um processo SIP seguindo um procedimento definido.

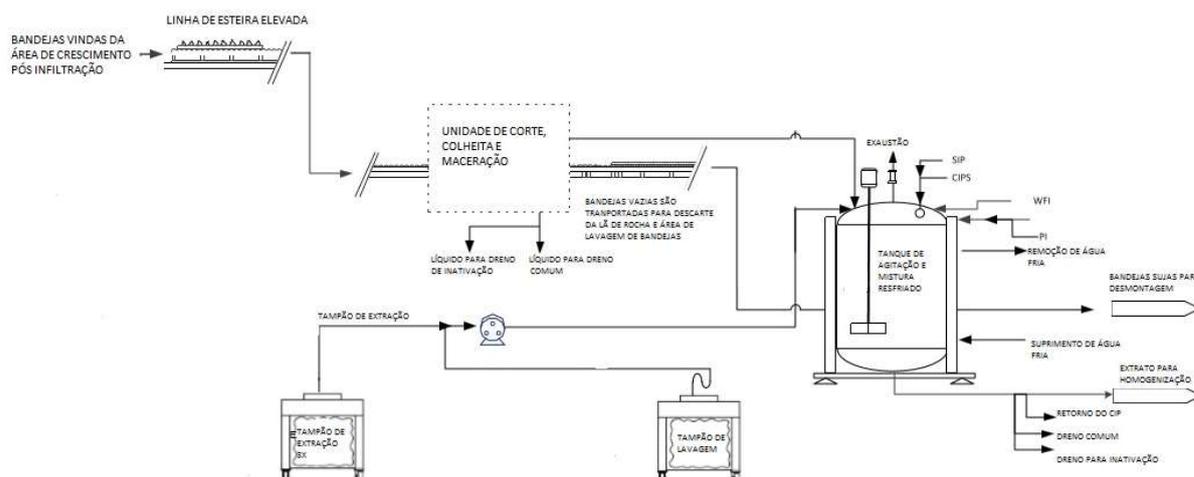


Figura 22 – Desenho esquemático do processo de colheita das plantas

O material colhido e macerado do tanque de mistura é transferido através de uma bomba peristáltica para um homogeneizador encamisado resfriado. O homogeneizador encamisado mantém a temperatura entre 2-8° C durante estas etapas. Na sequência, uma segunda bomba peristáltica envia o homogeneizado para um tanque de recebimento resfriado com agitação, encamisado, que mantém a temperatura entre 2-8°C.

Na sequência, o homogeneizado misturado com o jato de descarga no tanque de recebimento é, por sua vez, transferido por uma bomba para uma centrífuga de disco. Após isso, o tanque de recebimento é enxaguado com o tampão, que também é transferido para a centrífuga de disco. Este tampão de descarga age também como uma etapa de enxágue para a centrífuga de disco (ver figura 23).

Após a homogeneização, um procedimento de CIP é realizado no homogeneizador e despejado mais adiante, na direção do *downstream*, no tanque de recebimento. O procedimento considerado neste processo consiste em um enxágue com PW, um enxágue com hidróxido de sódio, um segundo enxágue com PW e um enxágue final com WFI. Todos os resíduos ativos são despejados mais além do

downstream via tanque de recebimento, antes de serem drenados pelo sistema dedicado de drenagem de água contaminada com material biológico – inativação. Após o ciclo de limpeza, o tanque de recepção também passa por um SIP conforme um procedimento definido.

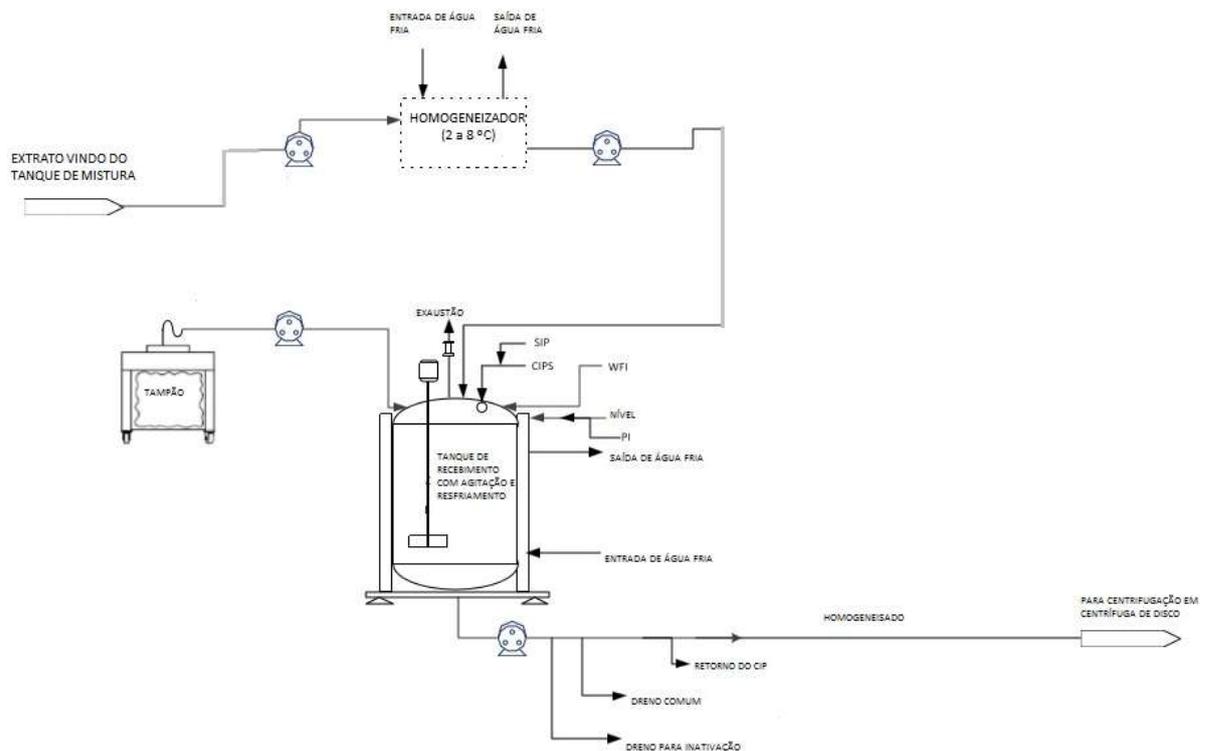


Figura 23 – Desenho esquemático do processo de homogeneização

O tanque de recebimento fornece o material homogeneizado para a centrífuga de disco encamisada refrigerada, onde a temperatura é mantida entre 2-8°C.

O sobrenadante da centrífuga de disco é transferido continuamente para uma sequência de filtros encamisados, mantidos a uma temperatura entre 2-8°C. Com base na informação da Fraunhofer/ iBio, esse conjunto de filtros é formado por um filtro de profundidade, tipo Cuno, com 4 estágios de cartuchos com 0,22 µm de tamanho médio de poro, instalados em compartimento de aço inoxidável. Antes de serem utilizados, estes filtros são enxaguados com um jato de tampão. Utiliza-se ar comprimido limpo para soprar o ar dos filtros para recuperar o filtrado. Então, o filtrado é armazenado em um tanque pulmão resfriado para filtrado, em ácido inoxidável, onde a temperatura é mantida entre 2-8°C, até que seja iniciado o processo de *downstream* conforme esquematizado na figura 24.

A centrífuga, a unidade de filtração e o tanque de filtrado passam por um CIP entre cada lote produzido. O processo de CIP é assumido como sendo um enxágue com PW, um enxágue com hidróxido de sódio, um segundo enxágue com PW e um enxágue final com WFI. Todos os resíduos inativos são escoados para o dreno dedicado sistema de água para descarte não contaminada e todos os resíduos ativos são drenados para o sistema dedicado de drenagem de água contaminada com material biológico para inativação. As bolsas para tampão utilizadas são inativadas em uma autoclave antes do descarte.

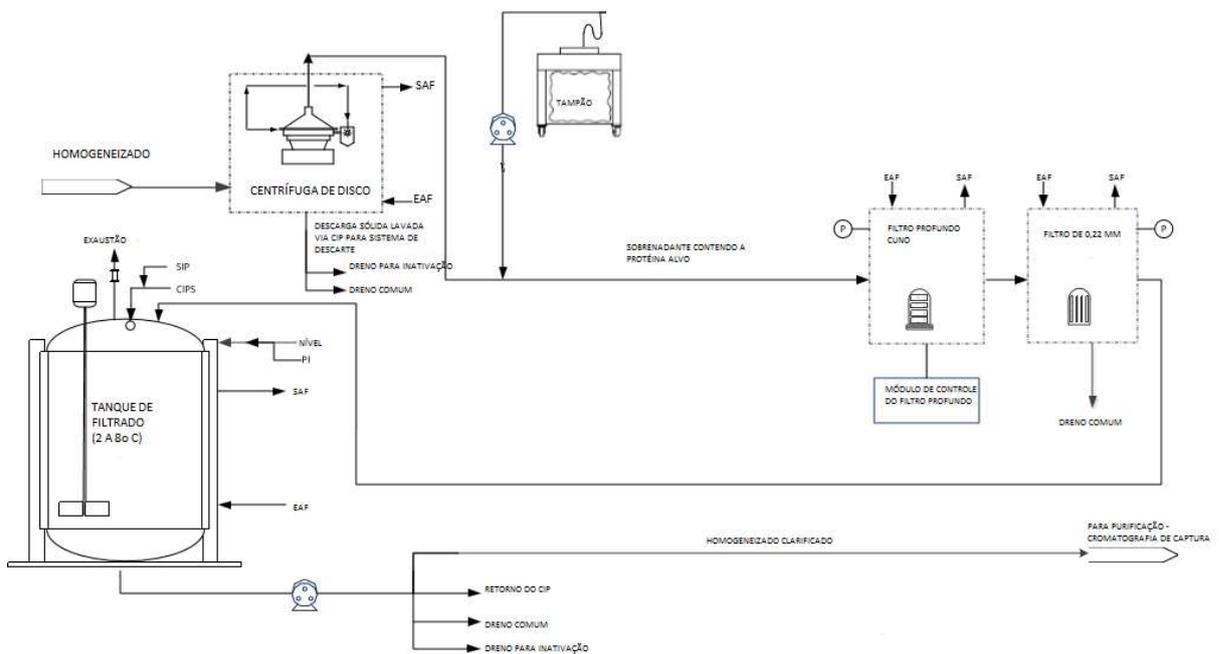


Figura 24 – Desenho esquemático do processo de clarificação

4.3.1.2. O processo de fabrico à jusante (downstream) para produzir o Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA)

Para a etapa cromatográfica 1, de captura seletiva do antígeno proteico do vírus da FA, utiliza-se a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), com o uso da resina Ni Sepharose 6 Fast Flow. A coluna considerada é utilizada para operar em uma unidade cromatográfica em aço inoxidável ÄKTApocess™ 1". A resina, a unidade e a coluna são fornecidas pela GE Healthcare L.S. Os tampões necessários durante a etapa cromatográfica são fornecidos através das entradas dedicadas no cromatógrafo que são conectadas aos seus respectivos tanques com bolsas SU.

Antes do carregamento do extrato clarificado, a coluna é lavada com WFI refrigerada no tanque de pré-alimentação, cuja temperatura é mantida entre 2-8°C, seguida pelo equilíbrio com o tampão de equilíbrio que contém Tris-NaCl, Imidazol e Triton X-100. Na sequência, a solução protéica do antígeno do vírus da febre amarela clarificada é transferida da área de Colheita, para dentro de um tanque pulmão encamisado, onde permanece a uma temperatura entre 2-8°C até ser utilizada. Deste tanque, a solução é alimentada para a coluna de captura já equilibrada. Durante esse processo, o antígeno proteico alvo do vírus da FA é seletivamente retido na coluna. Após a alimentação do extrato vegetal, a coluna passa por uma etapa de lavagem 1 com o tampão de equilíbrio, conforme descrito acima, e depois por uma segunda etapa de lavagem com tampão de lavagem 2.

A seguir, é efetuada a eluição com um tampão com alta concentração de Imidazol. O produto é coletado diretamente dentro de uma bolsa até um determinado volume fixo de eluição ou através do monitoramento da absorbância no UV. Esta bolsa é equipada com um agitador magnético que fornece a agitação necessária para se obter uma mistura adequada. O produto de eluição IMAC é, então, condicionado e estocado overnight a 2-8°C (figura 25).

Após a eluição, todos os íons metálicos são removidos da coluna por um tampão de remoção contendo EDTA e NaCl. Em seguida, a coluna é lavada com um tampão de lavagem pós-remoção contendo hidróxido de sódio.

Todos os rejeitos anteriores ao carregamento do extrato vegetal são drenados pelo sistema de drenagem dedicado WWI e todos os rejeitos contendo material proteico escoam pelo sistema de drenagem dedicado a água para descarte

contaminada com material biológico para inativação. Todos os resíduos contaminados com material biológico são despejados no sistema de drenagem que vai para a área de inativação. As bolsas de produto e de tampões são inativadas em uma autoclave antes de serem descartadas.

As colunas limpas são transferidas para a sala de Armazenamento de Colunas até próximo uso.

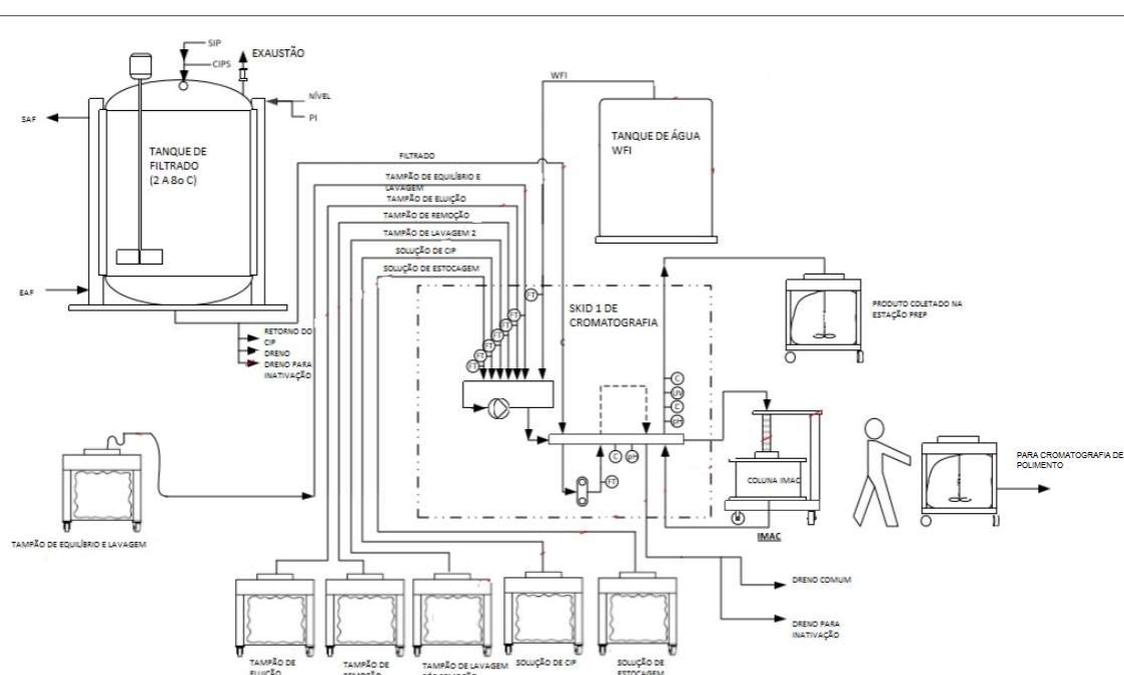


Figura 25 – Desenho esquemático do processo de cromatografia 1 – captura

A etapa de polimento é efetuada através da cromatografia de troca aniônica (AIEX), realizada no modo adsorção e eluição. A resina utilizada nessa etapa é a Capto Q, considerada como a mais adequada em uma coluna Axichrom. Essa coluna é utilizada para operar em uma unidade cromatográfica ÄKTApocess™ 1/2" de aço inoxidável. Esta unidade, a coluna e a resina são fornecidas pela GE Healthcare LS.

Os tampões necessários para esta etapa cromatográfica são fornecidos pelos respectivos tanques com bolsas conectados às entradas da unidade cromatográfica. Antes da alimentação do produto condicionado com antígeno protéico do vírus da febre amarela vindo da etapa cromatográfica anterior (figura 25), a coluna é lavada

com WFI resfriada, seguido pelo equilíbrio com tampão Tris NaCl. O produto é carregado em condições para que o produto seja adsorvido na resina, ou seja, após o período overnight, o eluato é diluído com tampão até alcançar a condutividade desejada. Após essa alimentação, a coluna é lavada com um tampão Tris com baixa concentração salina, e a eluição ocorre com um tampão Tris com alta concentração salina. O produto, antígeno proteico do vírus da FA, é coletado em uma bolsa até atingir o volume especificado ou o valor para absorção no UV definido (figura 26).

A limpeza ocorre de acordo com as recomendações do fornecedor da Capto Q (GE Healthcare). A resina está sujeita ao ciclo de CIP usando uma solução de NaOH, seguido por uma lavagem com WFI, sendo a resina armazenada em NaOH 10 mM. Todos os resíduos anteriores à alimentação são drenados e todos os resíduos contaminados com material biológico são drenados pelo sistema dedicado de drenagem - inativação. As bolsas de produto e de tampão são inativadas em uma autoclave antes de serem descartadas.

As colunas vazias e sanitizadas são transferidas para a sala de Armazenamento de Colunas onde permanecerão até serem usadas novamente.

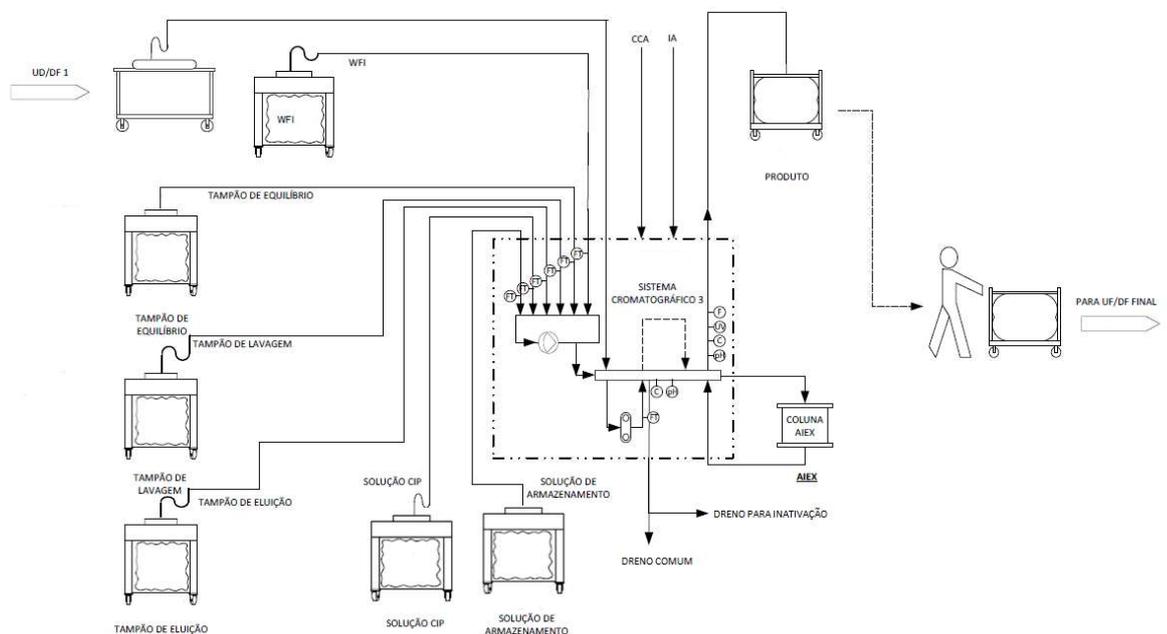


Figura 26 – Desenho esquemático do processo de cromatografia de polimento

Durante a ultrafiltração final/ diafiltração final (UF/DF), o produto antígeno proteico do vírus da FA eluído da etapa de ALEX é concentrado em cassetes.

Antes de iniciar o sistema UF/DF, o sistema é enxaguado com WFI refrigerado vindo do tanque de pré-alimentação encamisado cuja temperatura é mantida entre 2-8°C. Em seguida, é sanitizado com hidróxido de sódio, e finalmente um novo enxágue com WFI. Então, o equilíbrio é efetuado com o tampão Tris NaCl.

A bolsa com produto (figura 26) resultante da etapa de ALEX é transferida manualmente para a unidade de UF/DF. Essa bolsa de produto é, então, conectada à unidade UF/DF onde o produto será concentrado e diafiltrado, processo no qual é utilizado um tampão de equilíbrio.

Durante o processo de condicionamento, o tampão do produto é substituído pelo tampão de IFA final. Após a recirculação, o produto resultante da UF/DF é armazenado dentro de uma bolsa (figura 27).

Todos os resíduos anteriores à alimentação do produto são drenados através do sistema de dreno.

Entre cada lote produzido, realiza-se uma limpeza *in situ* (CIP). Considera-se que esta limpeza seja executada efetuando uma lavagem na unidade e nos filtros com hidróxido de sódio, seguida por um enxágue com WFI, depois do qual o filtro é lavado com uma solução de armazenamento contendo NaOH 0,1M. Todos os resíduos contaminados com material biológico são drenados pelo sistema dedicado inativação. As bolsas de produto e de tampões são inativadas em uma autoclave antes de serem descartadas.

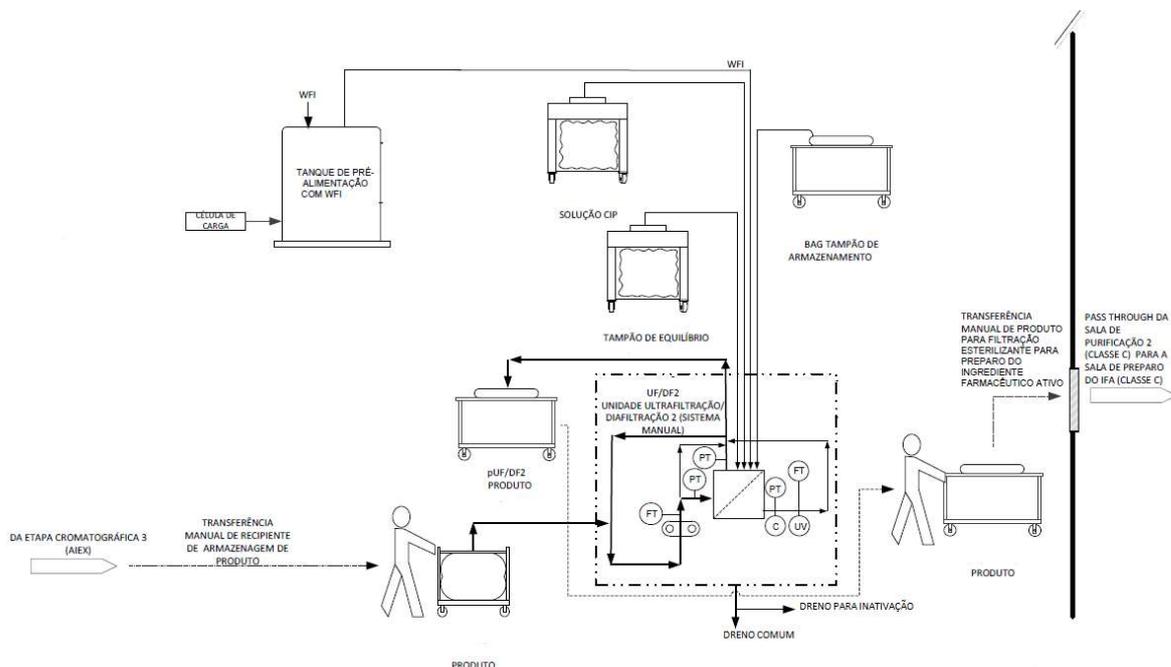


Figura 27 – Desenho esquemático do processo de ultrafiltração / diafiltração final

A etapa final é uma filtração esterilizante do ingrediente farmacêutico ativo (IFA). O produto é transferido da UF/DF para a área de preparo do IFA.

Um filtro estéril de 0,2 μm é colocado em uma cabine de segurança biológica equipada com uma balança. Antes do processo de filtração, a membrana é lavada com solução de Tris NaCl, que é fornecida através de uma bomba peristáltica. Essa solução é coletada em uma bolsa, sendo que o seu volume é monitorado por uma balança. Logo após, o produto antígeno proteico do vírus da FA resultante do processo de UF/DF final é filtrado e armazenado em uma bolsa de produto, cujo volume é novamente monitorado por uma balança. O produto retido no filtro é removido com uma descarga de Tris NaCl de volume igual ao do tampão utilizado na lavagem inicial do processo de filtragem e é, então, armazenado. A bolsa com o produto final estéril é, então, transferida manualmente para armazenagem a -70°C . As bolsas de produto e de tampão são inativadas em uma autoclave antes de serem descartadas.

De posse da descrição detalhada do processo, a etapa subsequente da análise de risco à qualidade foi a identificação dos pontos críticos de controle.

4.3.2. Aplicação do HACCP para identificação dos pontos críticos de controle e aplicação de BPF – requisitos propostos

A proposta de abordagem regulatória para a plataforma usando plantas inteiras utilizou a divisão do processo de fabricação em três fases principais:

1. Fase de manutenção do estoque;
2. Fase à montante "*upstream*" (do estoque à colheita); e
3. Fase à jusante "*downstream*" (material vegetal colhido ao medicamento acabado).

Para os fins do presente trabalho, a divisão nestas fases é baseada em como as BPF podem ser aplicadas aos processos de fabricação descritos, levando em consideração os pontos críticos de controle levantados pela aplicação da ferramenta HACCP e da literatura estudada no processo produtivo da vacina de Febre Amarela de Subunidade.

4.3.2.1. A fase de manutenção do estoque

A primeira fase de produção deve incluir o armazenamento e a manutenção de bancos e / ou estoques de plantas transgênicas ou plantas não-transgênicas e vetores usados para iniciar a fase à montante "*upstream*", tanto em sistemas de expressão transiente ou estáveis.

Etapas do processo analisadas:

- Cultivo de sementes (figura 16);
- Pré-inóculo (figura 19) e;
- Fermentação (figura 20), sendo estes últimos analisados para produção dos bancos Mestre e Trabalho de *A. tumefaciens*.

Após a aplicação da ferramenta HACCP, os pontos críticos identificados foram a planta hospedeira *Nicotiana benthamiana* e a *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor de expressão para a proteína YFE-1T. Com relação a planta hospedeira, mais especificamente temos como PCC as sementes. Estes pontos foram considerados críticos uma vez que, qualquer desvio na qualidade relacionado a eles afeta de modo substancial a qualidade do produto.

Uma breve descrição da planta hospedeira, ou seja, nome, género, espécie, subespécie, linhagem ou cultivar, nome comum, com referência à classificação da autoridade competente, e informações sobre a identificação da espécie da planta, estão demonstrados no quadro 2.

Quadro 2 – Identificação da planta hospedeira

Nome	<i>Nicotiana benthamiana</i>
Género	Nicotiana (Solanaceae: Linnaeus 1753)
Espécie	benthamiana
Subespécie	-
Linhagem ou cultivar	USDA 478*
Nome comum	Tabaco selvagem
Ploidia	Alopoliploidia
Número de cromossomas	19
Tamanho do genoma	3.5 GB
Distribuição geográfica	Endêmica da Austrália
Ciclo de crescimento	Anual

*Linhagem de semente usada na FCMB para o Projeto Vacina Febre Amarela de Subunidade

Fonte: Revisto e adaptado de: Goodin et al, 2008

Os sistemas de expressão transiente são aqueles que não requerem a integração estável de um gene exógeno no genoma do hospedeiro. O material genético inserido neste processo normalmente não é integrado no genoma do receptor e pode ser degradado ou diluído através da divisão celular.

A construção do vetor de expressão para este trabalho foi feita na Fraunhofer e os dados foram enviados por eles para inserção e análise neste trabalho.

As informações sobre a construção e o vetor de expressão usados para desenvolver o sistema de Infiltração neste trabalho encontram-se descrito no quadro 3 e na figura 28.

Quadro 3 – Construção do vetor de expressão

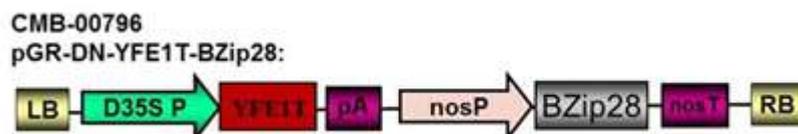
Um frasco de *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL 1 foi obtida do ATCC (em 06 de dezembro de 2004, Lote #: 3377978), e armazenada a 80°C até seu uso. O frasco foi descongelado e as células AGL1 electro-competentes foram feitas. As células competentes AGL1 foram então transformadas com o plasmídeo pSoup. O pSoup é um plasmídeo *helper* para o plasmídeo pGreen que contém o gene de interesse. Os transformantes foram selecionados em placas de LB / tetraciclina (8 mg / L) placas. As células competentes AGL 1 portadoras do pSoup foram então preparados para transformação com a construções à base de PGR.

A sequência alvo é YFE-1T com peptídeo sinal PRLa no N-terminal.

O gene resultante foi otimizado para a expressão em plantas e sintetizado pelo GENEART AG (Regensburg, Germany). A sequência foi inserida no vetor PGR-DN- -BZip28 para obter PGR-DN-PR-YFE-1T-BZip28 (CMB-00796) (Fig.28), que foi então introduzido na *A. tumefaciens* cepa AGL1 que continha o plasmídeo pSoup por electroporação.

Fonte: Fraunhofer comunicação pessoal (Relatório de desenvolvimento do projeto)

Figura 28 – Representação esquemática do vetor pGR-DN-PR-YFE1T-BZip28



Legenda:

LB – borda esquerda
 D35SP - promotor duplo
 35S do vírus CaMV
 YFE1T – Proteína E
 envelope do vírus da Febre
 Amarela – gene alvo
 pA – terminador 35S do
 CaMV
 nosP – promotor nopalina
 sintase
 BZip28 – ativador
 transcripcional resposta a
 estresse RE
 nosT- terminador nopalina
 sintase
 RB – borda direita

Fonte: Fraunhofer comunicação pessoal (Relatório de produção dos BM e BT)

A fidelidade do transgene e a sua expressão durante a produção por exemplo, a sequência específica e rendimento devem ser monitorados quando apropriado, por avaliação da morfologia da planta, características bioquímicas, etc. Um conjunto de dados completos para as medidas de análise de estabilidade genética durante a fase de produção *upstream* deve ser gerado em fases posteriores de desenvolvimento de produtos no sistema de expressão transientes (ver quadros 7 e 8).

Os resultados dos testes de controle (atividade funcional ou outra característica determinante) durante o desenvolvimento ou na produção de lotes devem razoavelmente se correlacionar com a estabilidade genética e as especificações definidas para a garantia do controle de qualidade.

Os princípios gerais descritos no ICH Q5B - Qualidade de produtos biotecnológicos: análise de construção de expressão em linhagens celulares usadas para a produção de produtos proteicos derivados rDNA - podem ser aplicáveis com adaptações ao sistema de expressão transiente.

Práticas de fabricação aceitáveis para medicamentos biológicos a partir de qualquer plataforma de produção geralmente envolve o estabelecimento de bancos mestre e bancos de trabalho para o fornecimento de material de processamento consistente e suficiente.

Neste trabalho, os termos Banco Mestre (BM) e Banco de Trabalho (BT) são usados para indicar essas fontes parentais referenciadas. Diferentes materiais podem ser caracterizados como bancos dependendo do tipo de sistema de expressão utilizado. Por exemplo, para um sistema de expressão estável é esperada a geração de um banco de plantas transgênicas ao passo que, para um sistema de expressão transiente é esperada a geração de bancos tanto para a planta hospedeira como para a construção recombinante e / ou o vector recombinante.

Esses materiais devem ser arquivados e armazenados adequadamente, a fim de manter a continuidade do fornecimento de materiais idênticos ao longo de vários ciclos de produção, e como materiais de referência para o desenvolvimento contínuo do produto.

Medidas de controle adequadas como por exemplo, exigências de BPF, controles em processo, e se aplicáveis, medidas específicas da planta hospedeira, devem ser implementadas para o BM e BT uma vez que estas medidas apoiam fundamentalmente a utilidade da plataforma de produção. A adequação destas medidas é demonstrada pela consistência do crescimento, a consistência da produção do produto pretendido, e a garantia de qualidade.

Os princípios gerais descritos no ICH Q5D (Derivação e caracterização de substratos celulares utilizados para produção de produtos biotecnológicos e biológicos) podem ser aplicáveis, com adaptações, ao sistema de produção.

Sempre que possível, a manutenção de estoques de banco mestre e / ou banco de trabalho é aplicável tanto a métodos de produção com plantas transgênicas estáveis ou transientemente transformadas.

Este trabalho sugere que, embora não haja 100% de aderência, os requisitos contidos na **RDC 69 de 8 de dezembro de 2014, Capítulo XVIII - Insumos farmacêuticos ativos obtidos por culturas de células / fermentação** – devam ser seguidos.

Os controles de qualidade e parâmetros de processo propostos para o monitoramento da fase de manutenção do estoque para a produção da vacina de Febre Amarela de Subunidade utilizando a plataforma de expressão transiente em *Nicotiana benthamiana* estão listados nos quadros 4 e 5.

Quadro 4 - Parâmetros de Processos Críticos (PPC) para fase de manutenção do estoque da planta hospedeira

PPC	Vacina de Febre Amarela Subunitária usando a proteína solúvel YFE-1T	
Controle de Qualidade e Parâmetros de Processo.		
<p>Banco de sementes:</p> <p><i>Nicotiana benthamiana</i></p> <p>Teste das sementes usadas para preparar os bancos de semente mestre e de trabalho</p>	Métodos a serem usados	Especificações
	<p>Teste de pureza física</p> <p>Análises de pureza física nos diz a proporção de componentes puros da semente no lote de sementes, bem como a proporção de outras sementes de culturas, sementes de plantas daninhas e matéria inerte, em peso, percentual para o qual as normas de sementes têm sido prescritas.</p>	<p>Padrão de pureza mínima 99%</p> <p>USDA, AMS, Seed Regulatory and Testing Division (SRTD) (ISTA – International Rules for Seed Testing, Chapter 3: The Purity Analysis)</p> <p>RAS, MAPA, Secretaria de Defesa Agropecuária</p>
	<p>Germinação</p> <p>O teste de germinação é realizado na fração pura de sementes provenientes do teste de pureza. 4 repetições de umas 100 sementes. Feito em cabines de germinação.</p>	<p>80% (mínimo)</p> <p>Resultados em%. Presença do sistema radicular, o eixo da parte aérea, cotilédones e gema terminal.</p> <p>USDA, AMS, Seed Regulatory and Testing Division (SRTD) (ISTA – International Rules for Seed Testing, Chapter:); RAS</p>
	<p>Viabilidade</p> <p>Vários tipos de ensaios de viabilidade estão disponíveis. Os mais comuns são o teste de corte, teste de tetrazólio (TTZ), raio-X, embrião excisado e teste de peróxido de hidrogênio.</p>	<p>A ser determinado</p>
	<p>Teor de umidade</p> <p>Método Forno (ISTA 1996), medidor de umidade eletrônico.</p>	<p>A ser determinado</p>
	<p>Condutividade</p>	<p>A ser determinado</p>
	<p>Sementes nocivo-daninhas</p>	<p>Ausência de sementes nocivo-daninhas em 25.000 sementes</p>
	<p>Envelhecimento acelerado (EA)</p> <p>É um teste de estresse com duas aplicações principais na manipulação prática de sementes:</p>	<p>A ser determinado</p>

	(1) para prever a vida útil de armazenamento potencial de sementes, e (2) para avaliar o vigor de um lote de sementes.	
	Peso de mil sementes O número de sementes por unidade de peso (quilograma e grama)	A ser determinado
	Testes de sementes saudáveis Teste de corte, Vigor (velocidade de germinação)	A ser determinado
Sementes de <i>Nicotiana benthamiana</i> usadas no processo de manufatura Controles em Processo	Teor de umidade Método Forno (ISTA 1996), medidor de umidade eletrônico.	A ser determinado
	Teste de pureza física Análises de pureza física nos diz a proporção de componentes puros da semente no lote de sementes, bem como a proporção de outras sementes de culturas, sementes de plantas daninhas e matéria inerte, em peso, percentual para o qual as normas de sementes têm sido prescritas.	Padrão de pureza mínima 98% USDA, AMS, Seed Regulatory and Testing Division (SRTD) (ISTA – International Rules for Seed Testing, Chapter 3: The Purity Analysis); RAS, MAPA, Secretaria de Defesa Agropecuária
	Testes de sementes saudáveis Teste de corte	A ser determinado

Legenda: USDA: United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos); AMS: Agricultural Marketing Service (Serviço de Comércio Agrícola); SRTD: Seed Regulatory and Testing Division (Divisão de Testagem e Regulação de Sementes); ISTA: International Rules for Seed Testing (Regras Internacionais para Testagem de Sementes); RAS: Regras para Análise de Sementes; MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Quadro 5 - Parâmetros de Processos Críticos (PPC) para fase de manutenção do estoque do vetor

PPC	Vacina de Febre Amarela Subunitária usando a proteína solúvel YFE-1T	
Controle de Qualidade e Parâmetros de Processo.		
Banco de células Master e de Trabalho <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Testagem da agrobactéria usada para preparar o banco de células Mestre e de trabalho	Métodos a serem usados	Especificações
	Pureza Coloração de Gram da cultura final criopreservada	Bastonetes gram-negativos, sem contaminação visível.
	Cultura final com Pureza criopreservada Testes para bactérias adventícias, fungos e infecção por fago (o último se pedido ou se suspeito).	Sem contaminação
	Cultura final com a morfologia da colônia criopreservada Cultura final com a viabilidade criopreservada	Colônias circulares, lisas e de cor creme Relatado como testado (Reporte como UFC / mL)
	Viabilidade do banco de célula Master na embalagem final Teste em placas com meio contendo canamicina	Não menos que 1×10^6 UFC/mL
	Teste de identidade do banco de célula Master na embalagem final	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	Teste de densidade celular do banco de célula Master na embalagem final Absorbância (A_{600})	$A_{600} > 5,0$
	Expressão de proteínas Western blot	Deve ser comparável a expressão estimada durante a fase de P&D
	Teste de identidade de sequência Amplificação por PCR e sequenciamento	Sequência 100% idêntica a sequência da proteína alvo

	<p>Estabilidade Genética</p> <p>Marcador de retenção mitótica (idade das células in vitro durante o armazenamento), preparação ou recuperação de plasmídeo a partir do mapeamento de sítios de restrição, a sequência do gene alvo, o número de cópias (plasmídeo ou integração cromossômica) e técnicas de PCR e Southern Blot para demonstrar a estabilidade de recombinantes cointegrados.</p>	<p>Sugestão:</p> <p>Banco mantém a sua identidade genética e consistentemente produz a proteína YFE-1T após > 20 passagens e > 100 gerações em cultura líquida, e depois de 4 anos de armazenamento a $-80^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$.</p>
	<p>Testes de uso (somente para BCTs)</p> <p>O desempenho do crescimento, formação de produto e identidade do produto e estabilidade após expansão por fermentação (idade celular in vitro durante o cultivo)</p>	<p>Sugestão:</p> <p>Genética e Identidade do produto em conformidade em células "de fim-de produção" após mais de 10 ciclos de produção.</p>

Legenda: PCR: Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase); UFC: Unidades Formadoras de Colônia; A_{600} : Absorbância a 600 nanômetros.

Conforme pode ser visualizado no quadro 4, este trabalho está propondo para o controle de qualidade Banco de sementes de *Nicotiana benthamiana* os testes de pureza física; germinação; viabilidade; teor de umidade; condutividade; sementes nocivo-daninhas; envelhecimento acelerado; peso e testes de sementes saudáveis. A periodicidade de análise do banco de sementes poderia ser dada pelo resultado do teste de envelhecimento acelerado, que é um teste de estresse com duas aplicações principais na manipulação prática de sementes: (1) para prever a vida útil de armazenamento potencial de sementes, e (2) para avaliar o vigor de um lote de sementes. E para controle em processo, ou seja antes do uso das sementes prévio a semeadura os testes de umidade; pureza física e teste de sementes saudáveis.

Segundo CLARKE, 2001 e NANDA, 2013 a taxa de germinação também pode ser utilizada como um indicador de estabilidade das sementes.

Diferentemente de Bancos de Células, os bancos de semente não podem ser congeladas em nitrogênio líquido por longos períodos de tempo e por isso a importância de se caracterizar métodos para controle dos bancos e também para controles em processo.

Estes testes descritos no quadro 4 e suas metodologias analíticas estão descritos nos documentos:

- EUA - regras internacionais prescritas pela International Seed Testing Association – ISTA;
- Brasil - Regras para Análise de Sementes – RAS que é elaborada pela Coordenação Geral de Apoio Laboratorial – CGAL, da Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA que é o órgão responsável pela Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária e possui dentre suas atribuições estabelecer, uniformizar e oficializar métodos para a realização de análises.

Na última e atual edição do RAS (2009) não existem especificações para a espécie botânica *Nicotiana benthamiana*, existem apenas para *Nicotiana glauca*; *Nicotiana sanderae*; *Nicotiana suaveolens* e *Nicotiana tabacum*. Todavia, as especificações descritas no Quadro 4 são especificações universais para qualidade de sementes conforme a ISTA e por isso foram sugeridas. Já especificações descritas como “a serem determinadas”, devem ser medidas e estipuladas através que lotes sucessivos de processo conforme descrito no ICH Q6B – Especificações: Procedimentos de testes e critérios de aceitação para produtos biotecnológicos / biológicos.

Conforme pode ser visualizado no quadro 5, este trabalho está propondo para o controle de qualidade dos Banco de Células Mestre e de Trabalho de *Agrobacterium tumefaciens* os testes de pureza; morfologia; viabilidade; identidade; densidade celular; expressão da proteína por Western blot e estabilidade genética. E para controle em processo, o desempenho do crescimento da cepa de agrobactéria, a formação de produto e identidade do produto e estabilidade após expansão por fermentação (idade celular in vitro durante o cultivo). Isso seria feito nas células no final da fermentação em 10 lotes consecutivos. Estes testes e especificações foram determinados em conjunto com a Fraunhofer e os Bancos Mestre e de Trabalho para a vacina de Febre Amarela Subunitária já foram produzidos, caracterizados e armazenados a -80°C (dados ainda não publicados).

Dada a importância dos bancos de célula Mestre e Trabalho para a obtenção de um produto com consistência de produção, além dos pontos críticos de controle, metodologia para este controle e especificações, um Protocolo de Produção de Banco de Células Mestre e de Trabalho em BPF foi desenvolvido neste trabalho em conjunto com a Fraunhofer Centro de Biotecnologia Molecular (FCMB). Este protocolo encontra-se descrito na íntegra no apêndice A e conclui o objetivo de estabelecimento e caracterização dos bancos.

4.3.2.2. A fase de produção à montante “upstream”

Na segunda fase de produção, a planta hospedeira, transgênica ou não é considerada um material de partida para o processo biológico para granel. A fase *upstream* inclui todas as operações de produção que envolvem o cultivo de plantas, colheita, e, neste estudo de caso, as etapas de extração inicial. Para a maioria dos sistemas de expressão transientes, esta fase também inclui o processo de Infiltração da planta hospedeira.

Nesta fase deve-se fazer uma supervisão adequada dessas etapas do processo, de acordo com um sistema de qualidade definidos utilizando os conceitos básicos de garantia de qualidade, controle de qualidade e BPF.

Etapas do processo analisadas:

- Semeadura e nebulização (figura 17);
- Crescimento das plantas pré-infiltração (figura 18);
- Fermentação (figura 20);
- Infiltração da planta (figura 21);
- Crescimento das plantas pós-infiltração (figura 22);
- Colheita das plantas (figura 23);
- Homogeneização (figura 24) e;
- Clarificação (figura 25)

Após a aplicação da ferramenta HACCP, os pontos críticos foram identificados e listados no quadro 6.

Quadro 6 - Parâmetros de Processos Críticos (PPC) para fase de produção *upstream*

Semeadura e crescimento das plantas pré-infiltração	Equipamentos	Controles em processo	Intermediário
	<ul style="list-style-type: none"> ▪Bandejas de crescimento das plantas; ▪Placas de lã de rocha; ▪Unidade automatizada de semeadura; ▪Módulos de crescimento. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪Taxa de germinação após 6 – 9 dias; ▪Sobrevivência das plantas após 14 – 19 dias; ▪Biomassa por bandeja. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪Planta hospedeira - <i>Nicotiana benthamiana</i>*
Parâmetros operacionais críticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪14 horas de luz por dia; ▪Temperatura de 22°C ± 2°C; ▪Solução nutriente recirculando nas bandejas. 		
Fermentação	Equipamentos	Controles em processo	Intermediário
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fermentador 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ pH 7,0 ▪D.O 1,0 	<ul style="list-style-type: none"> ▪Suspensão de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Parâmetros operacionais críticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪Temperatura de 28°C ± 2°C; ▪Tempo de fermentação de 12 horas; ▪Alimentação de glicose e saturação de O₂ 		
Infiltração	Equipamentos	Controles em processo	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Câmara de infiltração; ▪Câmara de rinsagem. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vácuo ≥ 0.9 bar (100 mbar absoluto) 	
Parâmetros operacionais críticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Imersão na suspensão de Agrobactéria ▪ Rinsagem com água purificada (PW) 		
Crescimento das plantas pós-infiltração	Equipamentos	Controles em processo	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bandejas de crescimento das plantas; ▪Módulos de crescimento 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Níveis de expressão 	
Parâmetros operacionais críticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1 dia antes do pico de expressão, as plantas são amostradas para determinação da expressão como uma etapa GO/ NO GO 		

Quadro 6 - Parâmetros de Processos Críticos (PPC) para fase de produção upstream - continuação

Colheita das plantas	Equipamentos	Controles em processo	Intermediário
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Colheitadeira/Corte e macerador automatizados; ▪ Tanque de mistura 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Não aplicável 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Material colhido e macerado
Parâmetros operacionais críticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ corte mecânico ▪ prensa de parafuso sem-fim 		
Homogeneização	Equipamentos	Controles em processo	Intermediário
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Homogeneizador; ▪ Tanque de agitação (tanque de recebimento) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Material homogêneo mantido de 2-8°C 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Extrato
Parâmetros operacionais críticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Biomassa corta e macerada misturada com o tampão de extração ▪ Homogeneização 		
Clarificação	Equipamentos	Controles em processo	Intermediário
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Centrífuga de disco; ▪ Filtro de profundidade Cuno; ▪ Filtro 0,22 µm 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Medidas de concentração de proteína 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Extrato clarificado
Parâmetros operacionais críticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Taxa de alimentação de 5 L/min, e 12,000xg ▪ Remoção de sólidos residuais e Agrobactéria ▪ Realizado em temperaturas baixas 		

Este trabalho sugere adaptar requisitos básicos de BPF (ver RDC 69 principalmente o capítulo XVIII), quando aplicável, para os processos *upstream* da PMF, a fim de ter um sistema de qualidade definido empregando "princípios BPF-like".

Os princípios de monitoramento dos processos e rastreabilidade de material em cada etapa (garantia de qualidade), o controle de material com testes validados (controle de qualidade), e produção consistente e controle de materiais para atender aos padrões de qualidade BPF devem ser implementados, quando aplicável, nos

processos de fabricação *upstream*. A seguir, alguns exemplos para ajudar a ilustrar como BPF pode ser aplicada:

- O requisito básico de BPF que os processos de fabricação sejam claramente definidos e controlados para assegurar a coerência e a conformidade com as especificações aprovadas (Artigos 327 e 328; além da Seção I – Requisitos Gerais Artigos 329 e 330) pode ser adaptado à fase de produção *upstream* através do estabelecimento de processos controlados para solução de nutrientes hidropônica, e para a qualificação da fitossanidade, altura, peso, ou outras características de desenvolvimento da planta hospedeira.
- Conceitos básicos de BPF podem ser aplicados para a produção *upstream* por adaptação, por exemplo, as definições de "lote" e "não sanitário" para um contexto de PMF (adaptação da Seção V – Formula padrão /mestra). A limpeza e construção de instalações na área de crescimento não podem ser consideradas completamente BPF em uma unidade de produção biológica. No entanto, essa área poderia ser "controlada, mas não classificada", terminologia que já é usada em ambientes BPF.
- O requisito básico de BPF que as etapas críticas de processos de fabricação e mudanças significativas para o processo devem ser validadas deve ser aplicável no processo *upstream*, quando se referem à atributos de qualidade e parâmetros críticos do processo que foram descritos na tabela 6.
- A abordagem BPF-like aplica-se a bancos de sementes que são mantidos para as plantas utilizadas em sistemas transientes. Tais bancos de sementes não são armazenados ou testados como bancos bacterianos ou virais, mas podem ser considerados como BPF-like para controle de qualidade (Adaptação da Seção IV – Manutenção do banco de células e registros).

Deve-se demonstrar como sistemas de qualidade no processo *upstream* resultam na geração de um material de partida biológico definido e adequado para posterior processamento *downstream* sob condições BPF. Abordagens aplicando os

princípios de BPF-like para o processo *upstream* devem ser apoiadas por uma justificação científica adequada e devem aderir a **RDC 69 de 8 de dezembro de 2014**, onde aplicável.

4.3.2.3. A fase de produção *downstream*

A terceira fase da produção PMF, a fase *downstream*, inclui todos os processos de produção de intermediários, ingrediente farmacêutico ativo e de produto final. Ela inclui todas as etapas de fabricação, desde a extração do ingrediente ativo a partir do material vegetal colhido ao produto acabado realizado numa instalação de fabricação BPF.

Durante a fase de produção *downstream*, as BPF aplicam-se a fabricação de qualquer forma intermediária do fármaco biológico derivado de plantas e também a fabricação do produto farmacológico final.

Etapas do processo analisadas:

- Etapa cromatográfica 1, captura (figura 26);
- Etapa cromatográfica 2, polimento (figura 27);
- Ultrafiltração/diafiltração final (figura 28);
- Preparo do Ingrediente Farmacêutico Ativo

Após a aplicação da ferramenta HACCP, os pontos críticos foram identificados e listados no quadro 7.

Quadro 7 - Parâmetros de Processos Críticos (PPC) para fase de produção downstream

Etapa cromatográfica	Equipamentos	Controles em processo	Intermediário
1, captura			
	AKTAprocess™ 1" com resina Ni Sepharose 6 Fast flow	▪ Monitoramento A ₂₈₀ ▪ SDS-PAGE do eluato	Eluato IMAC
Parâmetros operacionais críticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Taxa de alimentação, ▪ Fluxo de eluição, ▪ Realizado em temperaturas baixas ▪ Rendimento 		
Diluição do produto	Equipamentos	Controles em processo	Intermediário
IMAC			
	NA	▪ pH ▪ Condutividade alvo	Eluato IMAC diluído
Parâmetros operacionais críticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Após período overnight 2-8°C ▪ Produto diluído até condutividade alvo ▪ Realizado em temperaturas baixas 		
Etapa cromatográfica	Equipamentos	Controles em processo	Intermediário
2, polimento			
	AKTAprocess™ 1/2" com resina Capto Q	▪ Monitoramento A ₂₈₀ ▪ SDS-PAGE do eluato	▪ Eluato AEX
Parâmetros operacionais críticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Taxa de alimentação, ▪ Fluxo de eluição, ▪ Realizado em temperaturas baixas 		
Ultrafiltração/ diafiltração final	Equipamentos	Controles em processo	Intermediário
		▪ SDS-PAGE do concentrado	▪ Produto concentrado no tampão final
Parâmetros operacionais críticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ tampão de equilíbrio  Tampão de IFA final ▪ Realizado em temperaturas baixas (2-8°C) 		

Quadro 7 - Parâmetros de Processos Críticos (PPC) para fase de produção downstream - continuação

Preparo do IFA	Equipamentos	Controles em processo	Intermediário
	<ul style="list-style-type: none"> ▪Cabine de segurança biológica; ▪Sistema de filtração esterilizante; ▪Balança 	<ul style="list-style-type: none"> ▪Peso da bolsa; ▪Ver controle de Qualidade do IFA terminado 	NA Produto Final
Parâmetros operacionais críticos	<ul style="list-style-type: none"> ▪Temperatura de estocagem a -70°C ▪Volume final de IFA terminado 		

A fase de produção downstream não diverge muito de uma produção de biológicos em outras plataformas (cultura de células de mamíferos ou microrganismos) e por isso a Seção VI – Recuperação e Purificação da RDC 69 de 8 de dezembro de 2014, Capítulo XVIII - Insumos farmacêuticos ativos obtidos por culturas de células / fermentação pode ser aplicada integralmente.

A partir do conhecimento das etapas do processo de produção do antígeno proteico do vírus da FA (YFE-1T) e do levantamento dos Parâmetros de Processos Críticos (PPC) foi construído o quadro 8 referente aos atributos de qualidade, métodos de caracterização e critérios de aceitação propostos para a vacina em estudo. Os atributos da qualidade são os atributos estabelecidos em WHO 2011; WHO 2012; bem como nos documentos específicos de “*Plant Molecular Farming*” dos EUA (FDA, 2002) do Canadá (Health Canada, 2014) e União Européia (EMA, 2008).

Os valores alvos / especificações propostas foram propostos com base nos resultados do desenvolvimento da vacina e também de especificações em comum com dados de literatura (LAI; CHEN, 2012; HOLTZ et al, 2015).

Vale ressaltar que algumas impurezas são completamente processo específicas, como por exemplo Níquel residual, que é derivado da cromatografia de afinidade, canamicina residual e antiespumante residual derivados do processo de fermentação e triton X-100 residual derivado dos tampões de extração e clarificação.

A nicotina residual é derivada da planta fonte, no caso da *Nicotiana benthamiana*.

Estes testes então podem variar dependendo do processo estabelecido para a purificação da proteína alvo ou da planta escolhida para a expressão do alvo.

Quadro 8 – Métodos de caracterização e critérios de aceitação propostos aplicáveis a YFE-1T

Atributo da Qualidade	Teste	Procedimento	Valor alvo / Especificação proposta
Qualidade	pH	Potenciometria, USP<791>	Especificação definida pelo processo (7,0 – 8,0)
	Aparência	Exame visual	Solução límpida e incolor, sem partículas estranhas visíveis.
	Osmolalidade	USP <785>	Especificação definida pelo processo
Força	Concentração de proteína	UV, Absorção a 280 nm	Especificação definida pelo processo (≥ 0.9 mg/mL)
		SDS-PAGE	Especificação definida pelo processo
		BCA (Ácido bicinonífico)	Especificação definida pelo processo
		Análise de aminoácidos	Especificação definida pelo processo
Atributo da Qualidade	Teste	Procedimento	Valor alvo / Especificação proposta
Identidade	Mapeamento peptídico	Espectrometria de massa por digestão tri-enzimática	% de cobertura da sequência reportada
	Western blot	Western blot com anticorpos anti-proteína E de Febre Amarela	Perfil se compara ao material de referência.
Pureza	SDS-PAGE	SDS-PAGE	$\geq 95\%$ da banda alvo principal
	BioAnalyzer	BioAnalyzer	$\geq 95\%$ da banda alvo principal (Incluindo formas não glicosiladas)
	Agregados	Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)	$\leq 10\%$ Agregados de alto peso molecular
Potência	ELISA	Imunoensaio de captura com dois anticorpos monoclonais específicos para o alvo	Correlação com os valores de potência <i>in vivo</i> a ser estabelecido

Continua

Quadro 8 – Métodos de caracterização e critérios de aceitação propostos aplicáveis a YFE-1T - Continuação

Atributo da Qualidade	Teste	Procedimento	Valor alvo / Especificação proposta
Segurança	Agro /Bioburden ou Esterilidade	<USP 61> ou Teste de esterilidade	≤ 10 UFC/mL ou Ausência de crescimento microbiano
	Endotoxina	Ensaio cromogênico	≤ 80 UE/mL
	DNA residual da célula hospedeira	Ensaio Picogreen™	≤ 1000 pg DNA/ mg proteína
	Níquel residual	ICP-MS	≤ 30 ppm
	Nicotina residual	CG-MS	≤ 500 ppb
	Canamicina residual	RP-HPLC	≤ 10 ppm
	Antiespumante residual (análise de silicone)	ICP-MS	≤ 10 ppm
	Triton X-100 residual	RP-HPLC	≤ 20 ppm
	Teste de estabilidade do antígeno.	Quantidade de antígeno definido e controlado através de métodos validados.	- 70° C por pelo menos 2 anos

Legenda: USP: United States Pharmacopeia (Farmacopéia Americana); SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (eletrofore em gel de poliácridamida); BCA: Bicinchoninic acid assay (Ácido bicinconínico); SEC: Size Exclusion Chromatography (Cromatografia de exclusão por tamanho); ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática); EU: Unidades de endotoxina; pg: picograma; ICP-MS: Inductively coupled plasma mass spectrometry (Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente); CG-MS: Gas chromatography–mass spectrometry (Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa); RP-HPLC: Reversed-phase high-performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa).

4.3.3. Avaliação dos Riscos em Biossegurança

Este trabalho também realizou uma análise de risco de biossegurança utilizando o software BioRAM, para cada operação unitária de processo que contém organismo geneticamente modificado (OGM). Os gráficos apresentados tem por função demonstrar o grau de risco em biossegurança através do binômio probabilidade e consequência.

Os componentes, critérios e subcritérios utilizados para a avaliação do Risco em Biossegurança do OGM *Agrobacterium tumefaciens*, que é utilizado como vetor para o sistema de expressão transiente na produção da vacina de Febre Amarela Subunitária, bem como a pontuação dada a cada um deles estão descritos nos quadros 9 a 13. O significado de cada valor de pontuação está descrito no ANEXO A.

Utilizamos a título de comparação o atual processo de produção de vacina de Febre Amarela, utilizando a cepa vacinal 17DD produzida em ovos de galinha embrionados, descrito no documento de Bio-Manguinhos – Memorial Descritivo de produção da vacina de Febre Amarela.

No quadro 9, o componente de Probabilidade de Infecção causada pelo agente biológico analisado é pontuado nos critérios de transmissibilidade em humanos e animais, no ambiente do laboratório / área / processo, ou seja, o risco do operador e / ou animal de laboratório na forma de se contaminar com o agente biológico em questão.

No quadro 10 é apresentado o componente de Probabilidade de Exposição e são pontuados os critérios de exposição potencial a partir dos processos de laboratório e exposição potencial dos animais de laboratório. Vale ressaltar que neste componente para a plataforma vegetal atribuímos valor zero para os subcritérios de animais e valores diferentes de zero para vacina de febre amarela atenuada, devido a presença de ovos e embriões de pinto neste processo.

No quadro 11 são apresentadas as Medidas de Mitigação dos riscos em Biossegurança e sua pontuação. Estas medidas estão distribuídas nos critérios de uso de contenção, uso de EPI, utilização de procedimentos padronizados e gestão do laboratório no que se refere as boas práticas de biossegurança preconizadas nas normas internacionais.

No quadro 12, o componente Consequência da doença causada pelo agente biológico analisado é pontuado nos critérios de consequência da doença em humanos e em animais, levando-se em consideração os subcritérios relativos a característica do agente, morbidade, mortalidade e aspectos de mitigação da doença (diagnóstico, profilaxia e medidas preventivas como existência de vacina). Neste item é importante ressaltar que embora a cepa utilizada AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* seja

descrita na literatura como uma *Agrobacterium tumefaciens* desarmada³, foi dada uma pontuação 2 (dois) para o questionamento do agente biológico ter a capacidade de se alterar estando em um hospedeiro ou no meio ambiente natural para se tornar infeccioso através de nova via de infecção ou novos hospedeiros. Esta pontuação reflete o desconhecimento da capacidade do agente perder o inserto no meio ambiente e voltar a ser virulento para plantas.

E, por último, no quadro 13 são apresentados os critérios e subcritérios que compõe o componente de Consequência Secundária da doença, ou seja, o componente que avalia a consequência para a sociedade.

Como pode ser visualizado no anexo A, a tabela de pontuação varia do valor 4 ao valor 0 (zero), sendo o valor 4 representativo do maior grau de risco ou maior grau de mitigação e o valor zero o menor grau de risco ou menor grau de mitigação.

³ *Agrobacterium tumefaciens* desarmada: Linhagem de *Agrobacterium* na qual a região do T-DNA contendo os oncogenes foi deletada, originando uma linhagem incapaz de causar os tumores característicos da doença galha de coroa, Estas linhagens são as utilizadas para a obtenção de plantas transgênicas ou expressão transiente. Para este fim, uma linhagem desarmada é transformada com um vetor binário ou vetores de cointegração contendo o T-DNA com os genes que desejam ser transferidos para o genoma vegetal. Fonte: Lazo et al., 1991.

Quadro 9 – Possibilidade de Infecção – Transmissibilidade

Questão	Respostas por área de processo						
Probabilidade de infecção- Transmissibilidade							
Humanos	Vírus FA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>					
Inalação		Fermenta- ção	Infiltração	Cresci- mento Pós	Colheita	Homoge- neização	Clarifica- ção
Este agente é conhecido por causar infecção por via de inalação em humanos (por causar infecção através de gotículas e núcleos de gotículas que tenham entrado no trato respiratório superior ou inferior) em um ambiente de laboratório?	0	0	0	0	0	0	0
A dose infecciosa (ID50) deste agente para essa rota é de menos de 1000 ou desconhecido em seres humanos?	0	0	0	0	0	0	0
Percutâneo							
Este agente é conhecido por causar infecção através de exposição percutânea em humanos (por causar infecção através da pele comprometida, ou injeção direta na corrente sanguínea) em um ambiente de laboratório?	4	4	4	4	4	4	4
A dose infecciosa (ID50) deste agente para essa rota é de menos de 1000 ou desconhecido em seres humanos?	4	2	2	2	2	2	2
Contato direto							
Este agente é conhecido por causar infecção através do contato direto em humanos (por causar a infecção através das membranas mucosas) em um ambiente de laboratório?	0	0	0	0	0	0	0
A dose infecciosa (ID50) deste agente para essa rota é de menos de 1000 ou desconhecido em seres humanos?	0	0	0	0	0	0	0
Ingestão							
Este agente é conhecido por causar infecção por ingestão em humanos (por causar infecção através de contato com o trato gastrointestinal) em um ambiente de laboratório?	0	1	1	1	1	1	1
A dose infecciosa (ID50) deste agente para essa rota é de menos de 1000 ou desconhecido em seres humanos?	0	2	2	2	2	2	2
Animais	Vírus FA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>					
Inalação		Fermenta- ção	Infiltração	Cresci- mento Pós	Colheita	Homoge- neização	Clarifica- ção
Este agente é conhecido por causar infecção por inalação de hospedeiros animais (por causar infecção através de gotículas e núcleos de gotículas que tenham entrado no trato respiratório superior ou inferior)?	0	0	0	0	0	0	0
A dose infecciosa (ID50) deste agente para essa rota é de menos de 1000 ou desconhecida no hospedeiro animal?	0	0	0	0	0	0	0
Contato direto							
Este agente é conhecido por causar a infecção através do contato direto, em um animal hospedeiro (por causar a infecção através das membranas mucosas)?	0	0	0	0	0	0	0
A dose infecciosa (ID50) deste agente para essa rota é de menos de 1000 ou desconhecida no hospedeiro animal?	0	0	0	0	0	0	0
Percutâneo							
Este agente é conhecido por causar infecção através de exposição percutânea em um animal hospedeiro (para causar infecção através da pele comprometida, ou injeção direta na corrente sanguínea)?	4	4	4	4	4	4	4
A dose infecciosa (ID50) deste agente para essa rota é de menos de 1000 ou desconhecida no hospedeiro animal?	4	2	2	2	2	2	2
Ingestão							
Este agente é conhecido por causar infecção por ingestão em um animal hospedeiro (por causar infecção através de contato com o trato gastrointestinal)?	0	1	1	1	1	1	1
A dose infecciosa (ID50) deste agente para essa rota é de menos de 1000 ou desconhecida no hospedeiro animal?	0	2	2	2	2	2	2

Quadro 10 – Possibilidade de Exposição

Questão	Respostas por área de processo						
Probabilidade de Exposição							
Exposição potencial a partir de processos de laboratório	Vírus FA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>					
Tipo de Material		Fermenta- ção	Infiltração	Cresci- mento Pós	Colheita	Homoge- neização	Clarifica- ção
Que tipo de material será utilizado neste procedimento? (Se o procedimento terá tanto material purificado e amostras de diagnóstico, selecione a opção de material purificado)	4	4	4	1	1	4	4
Qual é o maior volume de material existente em um momento no procedimento?	4	2	4	4	4	4	4
Exposição por inalação							
Qual é o potencial para aerossóis para ser gerado como um subproduto do presente processo (por exemplo, pipetagem, sonicação, etc.)?	4	1	4	0	4	0	4
Existem experiências de aerosolização sendo realizadas como parte deste procedimento?	4	0	4	0	3	0	4
Exposição percutânea							
O que é a quantidade de perfuro cortantes utilizados neste procedimento?	4	0	0	0	4	0	0
Qual é a quantidade de material quebrável ou itens com bordas afiadas neste laboratório?	4	3	0	0	0	0	0
Exposição por contato							
Como os resíduos contaminados estão armazenados no laboratório?	1	1	1	0	1	1	1
Qual é o potencial e extensão de um respingo ou derrame neste procedimento?	3	3	4	0	4	3	4
Descontaminação							
Qual é o processo implementado para a descontaminação do equipamento antes da manutenção?	3	0	0	0	0	0	0
O quão fácil são as superfícies do laboratório para a descontaminação?	2	0	0	0	0	0	0
Exposição potencial de Animais em Laboratório	Vírus FA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>					
Propriedade dos animais		Fermenta- ção	Infiltração	Cresci- mento Pós	Colheita	Homoge- neização	Clarifica- ção
Quantos animais estão em uso neste procedimento?	4	0	0	0	0	0	0
Qual é o tamanho típico destes animais?	1	0	0	0	0	0	0
Animais gerais							
Há mais de uma espécie de animal em uso no laboratório?	1	0	0	0	0	0	0
São animais que têm o potencial para lançar partículas infecciosas utilizados neste procedimento?	3	0	0	0	0	0	0
Quanto resíduo os animais de laboratório utilizados neste procedimento geram?	4	0	0	0	0	0	0

Quadro 11– Medidas de Mitigação em Biossegurança

Questão	Respostas por área de processo						
Medidas de Mitigação em Biossegurança							
Contenção	Vírus FA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>					
		Fermentação	Infiltração	Crescimento Pós	Colheita	Homogeneização	Clarificação
Cabines de segurança biológica são utilizadas neste procedimento?	4	4	0	0	0	0	0
Todos os equipamentos utilizados neste procedimento com um potencial de gerar aerossóis infecciosos (por exemplo, centrífuga, agitador, sonicador) estão isolados ou selados de forma a impedir o escape de aerossóis (por exemplo copos de rotor selados, equipamentos em CSB ou em uma biobolha, etc) antes usar?	1	4	4	-	0	4	4
Existem outras formas de contenção primária utilizadas neste procedimento?	4	4	0	0	0	0	0
Estão em vigor medidas para reduzir aerossóis infecciosos que saem do laboratório?	4	4	4	4	4	4	4
Como o resíduo perfuro cortante é tratado?	3	3	4	4	4	4	4
EPI							
Que tipos de luvas são utilizadas para este procedimento?	4	4	4	4	4	4	4
Qual o tipo de vestuário de proteção (EPI) é usado neste laboratório?	4	4	4	4	4	4	4
Qual tipo de óculos de proteção é usado neste laboratório?	4	1	1	1	1	1	1
Que tipos de sapatos são usados no laboratório?	4	4	4	4	4	4	4
Proteção respiratória é utilizada neste procedimento? (Máscaras cirúrgicas não são consideradas proteção respiratória)	4	0	0	0	0	0	0
Protetores faciais ou máscaras são usadas neste procedimento?	4	3	3	3	3	3	3
Procedimentos especiais							
Procedimentos específicos para animais	Vírus FA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>					
		Fermentação	Infiltração	Crescimento Pós	Colheita	Homogeneização	Clarificação
Os animais são alojados de um modo que é isolado ou selado para impedir o escape de aerossol (por exemplo gaiolas isoladoras ou gaiolas dentro de uma biobolha)?	4	-	-	-	-	-	-
Os animais são tratados em isolamento para impedir o escape de aerossóis (por exemplo, em uma CSB ou manipulados dentro de uma biobolha)?	4	-	-	-	-	-	-
São animais transportados de uma maneira que impeça escape de aerossol (por exemplo gaiolas isoladoras)?	4	-	-	-	-	-	-
Este laboratório tem procedimentos de manuseio de animais em prática para reduzir / eliminar as exposições, que se encontram definidas nas melhores práticas?	4	-	-	-	-	-	-
Procedimentos							
Que tipos de luvas estão em uso ao utilizar materiais cortantes (por exemplo, agulhas, bisturis, etc) neste procedimento?	1	1	1	1	4	1	1
Como os perfuro cortantes são manipulados no laboratório?	0	0	2	2	4	4	4
Este laboratório tem procedimentos em vigor para manipulação de perfuro cortante, para reduzir / eliminar a exposição percutânea que atendem as melhores práticas definidas?	4	4	4	4	4	4	4
Este laboratório tem procedimentos para a manipulação do agente biológico, para reduzir / eliminar aerossóis? Estes procedimentos devem atender as melhores práticas definidas	1	4	4	4	4	4	4
Materiais absorventes são utilizados na bancada ou CSB para conter derramamentos e reduzir os respingos?	4	4	4	4	4	4	4
Depois de trabalhar com material potencialmente contaminado (culturas, resíduos infecciosos), como são tratados os objetos que não devem tornar-se contaminados (maçanetas, teclados de computador)?	4	4	4	4	4	4	4
Este laboratório possui procedimentos para resposta a derrames que atendam as melhores práticas definidas?	2	4	4	4	4	4	4
Este laboratório possui procedimentos em vigor para os trabalhadores do laboratório para reduzir / eliminar a exposição de contato através da pele exposta, que atendam as melhores práticas definidas?	4	4	4	4	4	4	4
Qual a frequência de lavagem das mãos?	4	4	4	4	4	4	4

Como o resíduo contaminado é tratado?	0	0	0	0	0	0	0
Como os resíduos líquidos (efluentes) são tratados?	0	0	0	0	0	0	0
Questão	Respostas por área de processo						
Medidas de Mitigação em Biossegurança							
Contenção	Vírus FA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>					
		Fermenta- ção	Infiltração	Cresci- mento Pós	Colheita	Homoge- neização	Clarifica- ção
Procedimentos padrão							
Todos os agentes biológicos neste laboratório estão inventariados?	4	4	4	4	4	4	4
Existe um programa estabelecido de envio e recebimento neste laboratório?	4	4	4	4	4	4	4
Existem procedimentos para manutenção preventiva para reduzir / eliminar acidentes ou falha do equipamento, que atendem as melhores práticas definidas? Estes incluem calibração de equipamentos, validação, certificação, etc.	4	4	4	4	4	4	4
Há procedimentos operacionais padrão no local para incidentes inesperados ou catastróficos, incluindo a liberação de ou exposição a um agente infeccioso (por exemplo, planos de resposta a incidentes)?	2	4	4	4	4	4	4
Existe um programa formal estabelecido de equipamento de proteção individual (EPI)?	4	4	4	4	4	4	4
Este laboratório implementou boas práticas de laboratório padrão para a segurança?	2	4	4	4	4	4	4
Gestão							
A instituição definiu papéis e responsabilidades para a biossegurança?	4	4	4	4	4	4	4
A instituição possui um compromisso com a segurança?	3	3	3	3	3	3	3
A instituição tem uma documentação completa de biossegurança?	3	4	4	4	4	4	4
A instituição realiza simulações de biossegurança ou exercícios?	2	2	2	2	2	2	2
A instituição revê periodicamente o programa de biossegurança?	3	3	3	3	3	3	3

Quadro 12– Consequência da doença

Questão	Respostas por Agente	
Consequência da doença		
Consequência da doença em humanos	Vírus FA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Características do Agente		
Este agente ou um de seus subprodutos pode causar uma reação carcinogênica ou mutagênica em um hospedeiro humano?	0	0
Este agente possui toxinas ou produção de enzimas que têm um impacto negativo em um hospedeiro humano saudável?	0	0
Este agente pode suprimir o sistema imunológico de um hospedeiro humano? (Por exemplo, causar a supressão dramática que torna o hospedeiro incapaz de responder a outras infecções)	0	0
Este agente tem a capacidade de se alterar estando em um hospedeiro ou no ambiente natural para se tornar infeccioso através de nova via de infecção ou novos hospedeiros, ou causar aumento de consequências?	0	2*
Morbidade		
Qual é a duração da doença (o período de tempo médio de sinais clínicos de infecção) num hospedeiro humano normalmente saudável?	0	0
Qual é a gravidade da doença (gravidade média da doença, variando desde não há sinais de doença para hospitalizados em estado crítico) num hospedeiro humano saudável?	0	0
Qual é a duração da infecção (o período de tempo que o hospedeiro está infectado com o organismo) em um hospedeiro humano saudável normal?	0	0
Esta doença causa quaisquer condições de longo prazo (sequelas) em um hospedeiro humano saudável normal?	0	0
Mortalidade		
Qual é a frequência de morte em humanos causadas por esta doença em uma população definida durante um intervalo de tempo especificado (Taxa de Mortalidade)?	0	0
Mitigação		
Existem testes de diagnóstico eficazes para os seres humanos?	4	0
Tratamentos pós exposição (incluindo imunoglobulinas, vacinas e antibióticos) existem para os seres humanos?	0	4
Existem medidas preventivas (vacinas) para os seres humanos?	4	0
Consequência da doença em animais	Vírus FA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Morbidade		
Se o agente infectar animais, qual a taxa de morbidade esperada para uma população animal naive, todavia saudável?	0	0
Espécies		
Que espécies de animais este agente pode infectar?	0	0
Mitigação		
Existem testes de diagnóstico eficazes para os animais?	4	0
Tratamentos pós exposição (incluindo imunoglobulinas, vacinas e antibióticos) existem para os animais?	0	4
Existem medidas preventivas (vacinas) para os animais?	0	0

Quadro 13– Consequência secundária da doença

Questão	Respostas por Agente	
Consequência da doença		
Consequência secundária da doença em seres humanos	Vírus FA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Rotas		
Este agente é conhecido por causar infecção por via de inalação em humanos (por causar infecção através de gotículas que tenham entrado no trato respiratório superior ou inferior) no ambiente natural?	0	0
Este agente é conhecido por causar infecção através de exposição percutânea em humanos (por causar infecção através da pele comprometida, ou injeção direta na corrente sanguínea) no ambiente natural?	4	1
Este agente é conhecido por causar infecção pela via direta em seres humanos (por causar infecção através das membranas das mucosas) no ambiente natural?	0	0
Este agente é conhecido por causar infecção por ingestão em humanos (por causar infecção através de contato com o trato gastrointestinal) no ambiente natural?	0	1
Este agente é conhecido por causar a infecção através da transmissão vetorial em humanos (por causar a infecção pelo contato da membrana mucosa direta ou de exposição percutânea de um vetor (por exemplo artrópodes))?	0	0
Este agente é conhecido por causar infecção através da transmissão vertical em humanos (por causar a infecção da mãe para o feto no útero ou através da ingestão de leite materno infectado)?	2	0
Este agente é conhecido por causar infecção por transmissão sexual em humanos (por causar a infecção através do contato sexual, incluindo a relação sexual)?	0	0
Transmissão		
Quão facilmente este agente se transmite entre hospedeiros humanos?	0	0
Quão facilmente este agente é transmitido de animal para hospedeiros humanos?	0	0
Quão facilmente este agente é transmitido de humano para hospedeiros animais?	0	0
Estabilidade		
Qual é a estabilidade deste agente fora do hospedeiro?	2	4
Notificação		
Qual nível de comunicação nacional ou internacional é necessária para surtos desta doença?	4	0
Consequência secundária da doença em animais	Vírus FA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Rotas		
Este agente é conhecido por causar infecção através da transmissão vetorial (por causar a infecção pelo contato da membrana mucosa direta ou de exposição percutânea de um vetor (por exemplo artrópodes))?	4	0
Este agente é conhecido por causar a infecção através da transmissão vertical em um animal hospedeiro (por causar a infecção da mãe para o feto no útero ou através da ingestão de leite materno infectado)?	2	0
Este agente é conhecido por causar infecção por transmissão sexual em um animal hospedeiro (por causar a infecção através do contato sexual, incluindo a relação sexual)?	0	0
Transmissão		
Quão facilmente este agente é transmitido de animal para hospedeiros humanos?	0	0
Quão facilmente este agente é transmitido de humano para hospedeiros animais?	0	0
Quão facilmente este agente se transmite entre hospedeiros animais?	0	0
Estabilidade		
Qual é a estabilidade deste agente fora do hospedeiro?	2	4

Notificação		
Qual nível de comunicação nacional ou internacional é necessária para surtos desta doença?	2	0

O software permitiu o fornecimento das pontuações para todos os critérios através do uso de uma ferramenta simples, respondendo a um conjunto de perguntas. O software então calculou a pontuação de risco usando os algoritmos e pesos definidos no modelo e metodologia.

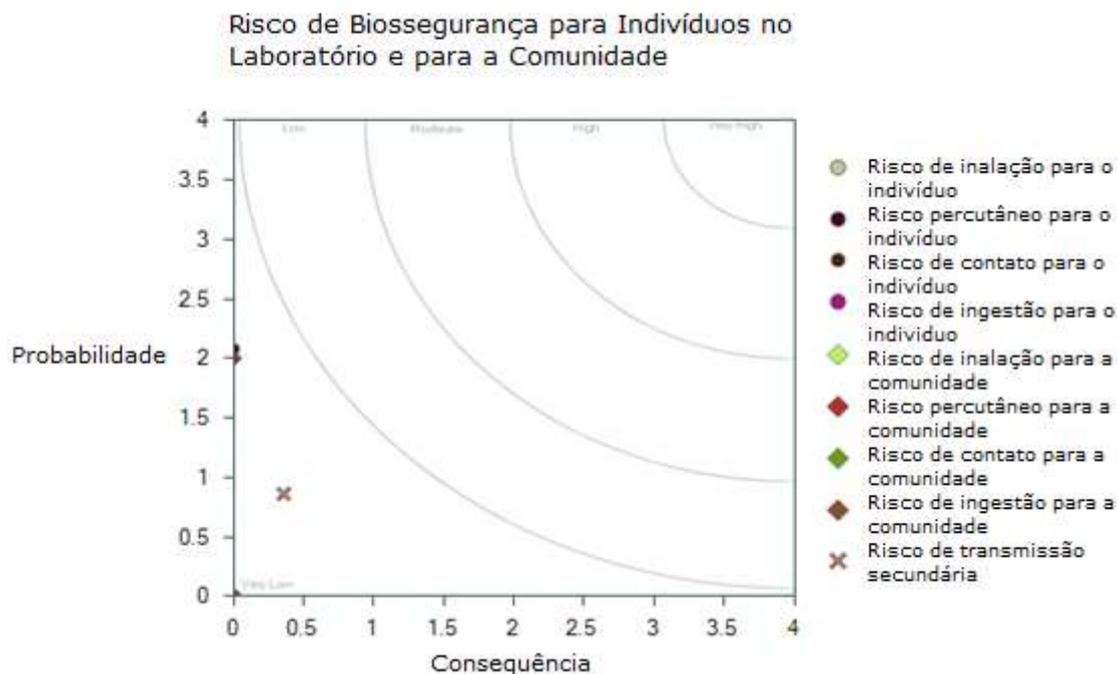
Após a pontuação dos critérios, um relatório foi gerado pelo software, contendo os gráficos de avaliação do risco para cada processo avaliado independentemente, sendo que para cada processo são gerados dois gráficos: um para o risco de biossegurança para indivíduos no laboratório e para a comunidade e outro gráfico para risco de biossegurança para animais na comunidade.

Os gráficos de *Probabilidade X Consequência* são gerados a partir da média ponderada e dos pesos de cada valor utilizando-se a técnica de MCDA e classificam os riscos em muito baixo, baixo, moderado, alto e muito alto.

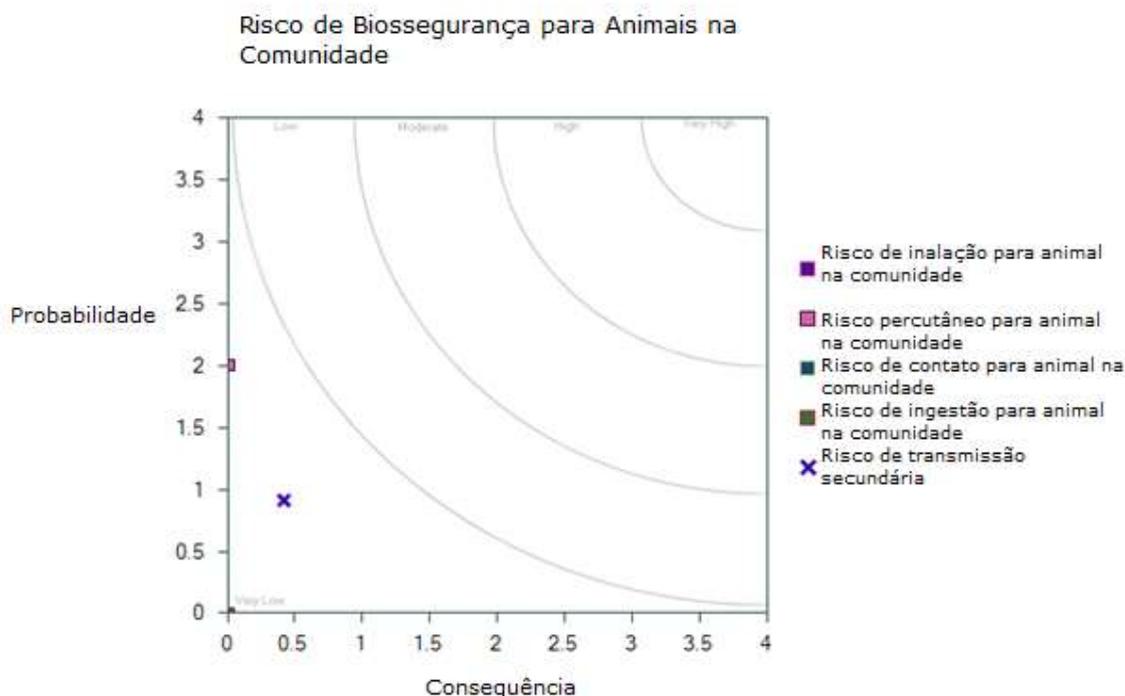
As figuras 29 a 35 mostram os gráficos de avaliação do risco por operação unitária do processo gerados a partir da pontuação apresentada nos quadros acima e calculada para dar o resultado descrito na tabela 6. Todos os gráficos foram editados no software *Paint Brush*TM para serem traduzidos para a Língua Portuguesa.

Figura 29 – Coleta e preparo de suspensão viral - Vírus vacinal da Febre Amarela 17DD

A)



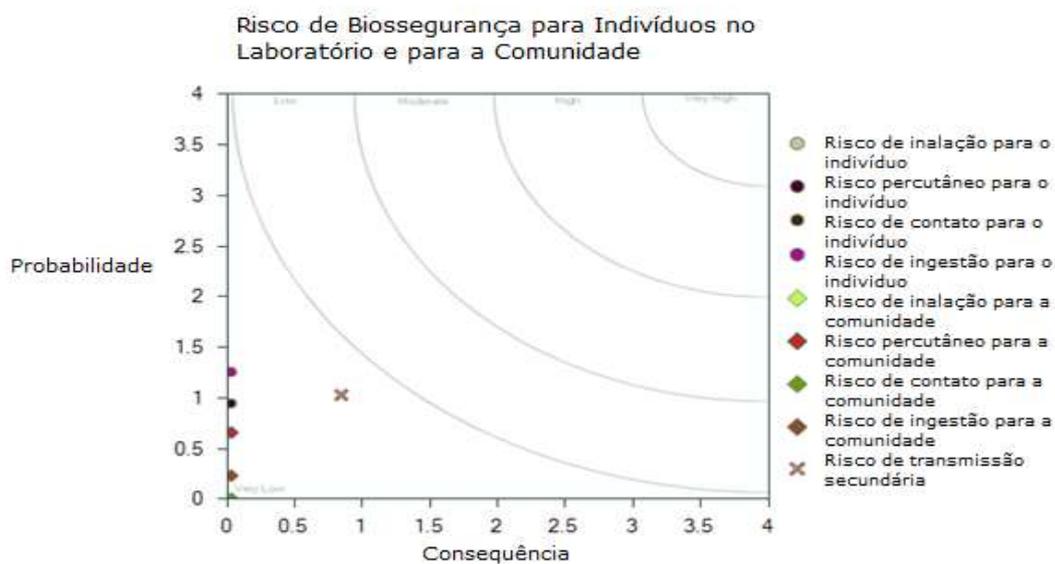
B)



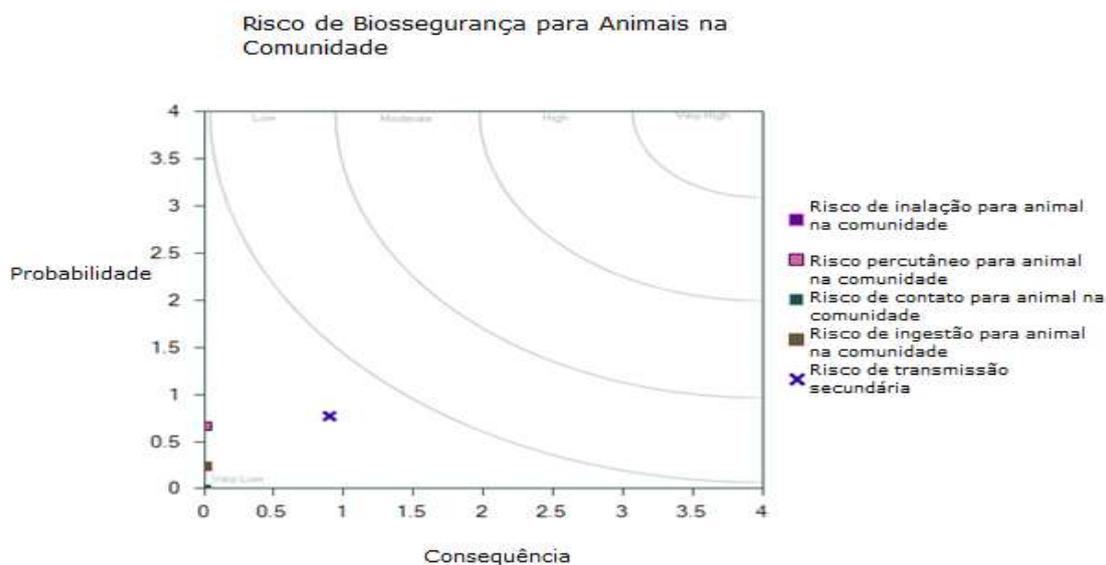
Legenda: Gráficos de risco de biossegurança gerados pelo software BioRAM, para o processo de coleta e preparo de IFA de vacina de Febre Amarela 17DD. Agente biológico: vírus vivo atenuado. A) Gráfico de risco de biossegurança para indivíduos no laboratório e para a comunidade; B) Gráfico de risco de biossegurança para animais.

Figura 30 – Fermentação – *Agrobacterium tumefaciens*

A)



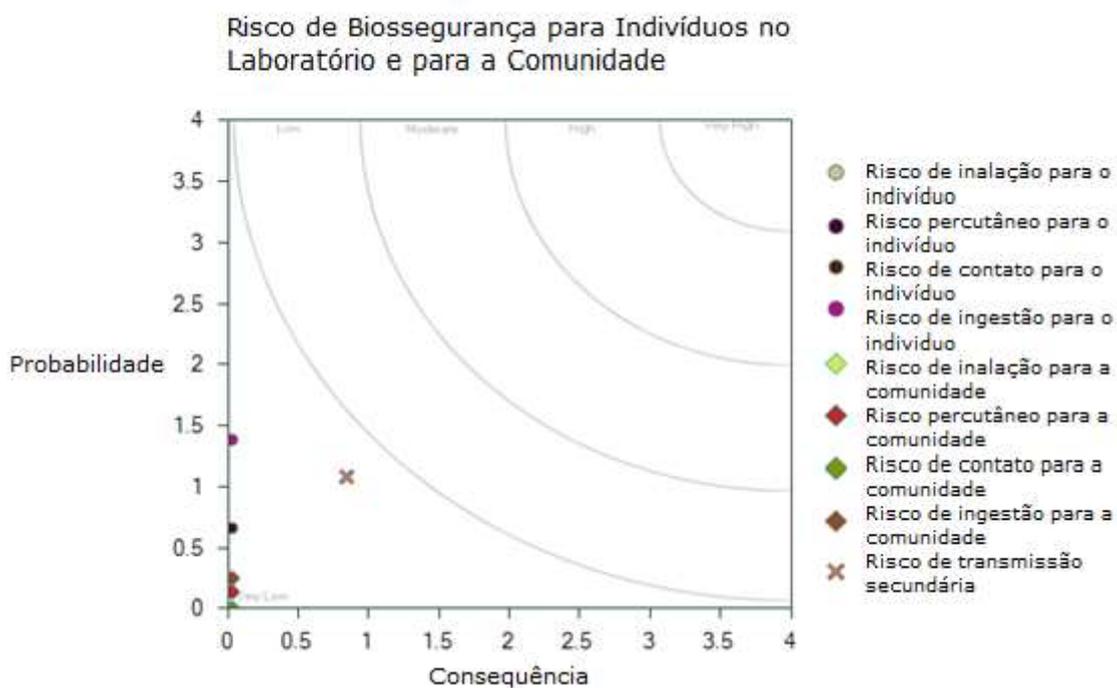
B)



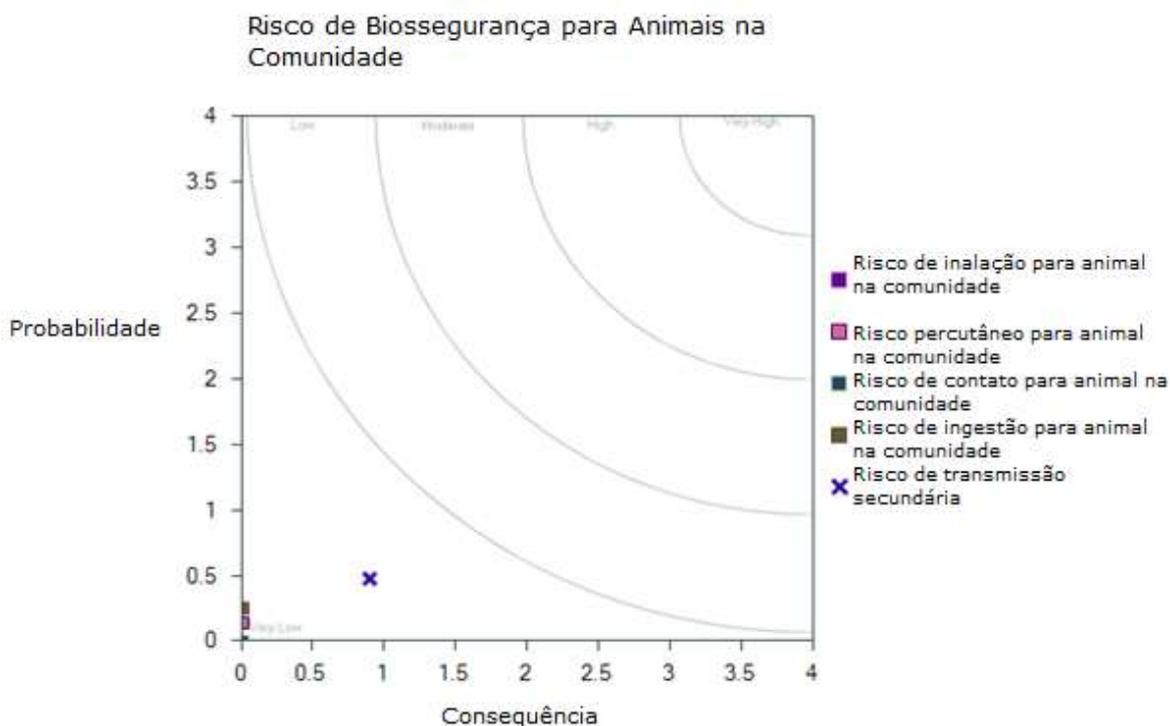
Legenda: Gráficos de risco de biossegurança gerados pelo software BioRAM, para o processo de pré-inóculo/fermentação. Agente biológico: *Agrobacterium tumefaciens*. A) Gráfico de risco de biossegurança para indivíduos no laboratório e para a comunidade; B) Gráfico de risco de biossegurança para animais.

Figura 31 – Agroinfiltração – *Agrobacterium tumefaciens*

A)



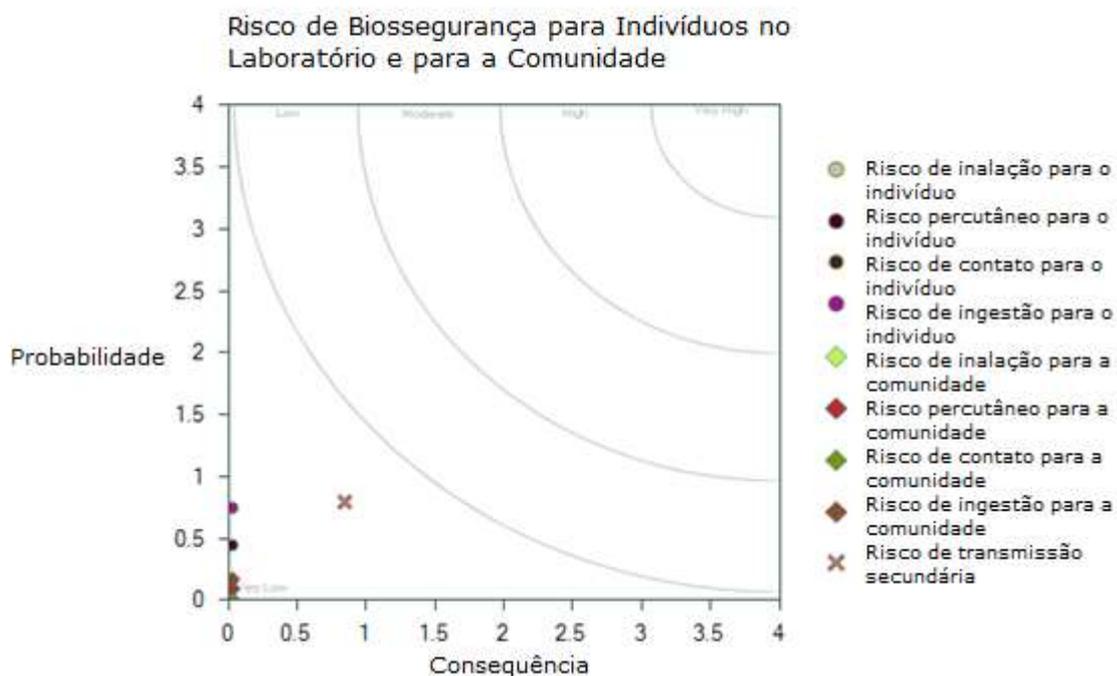
B)



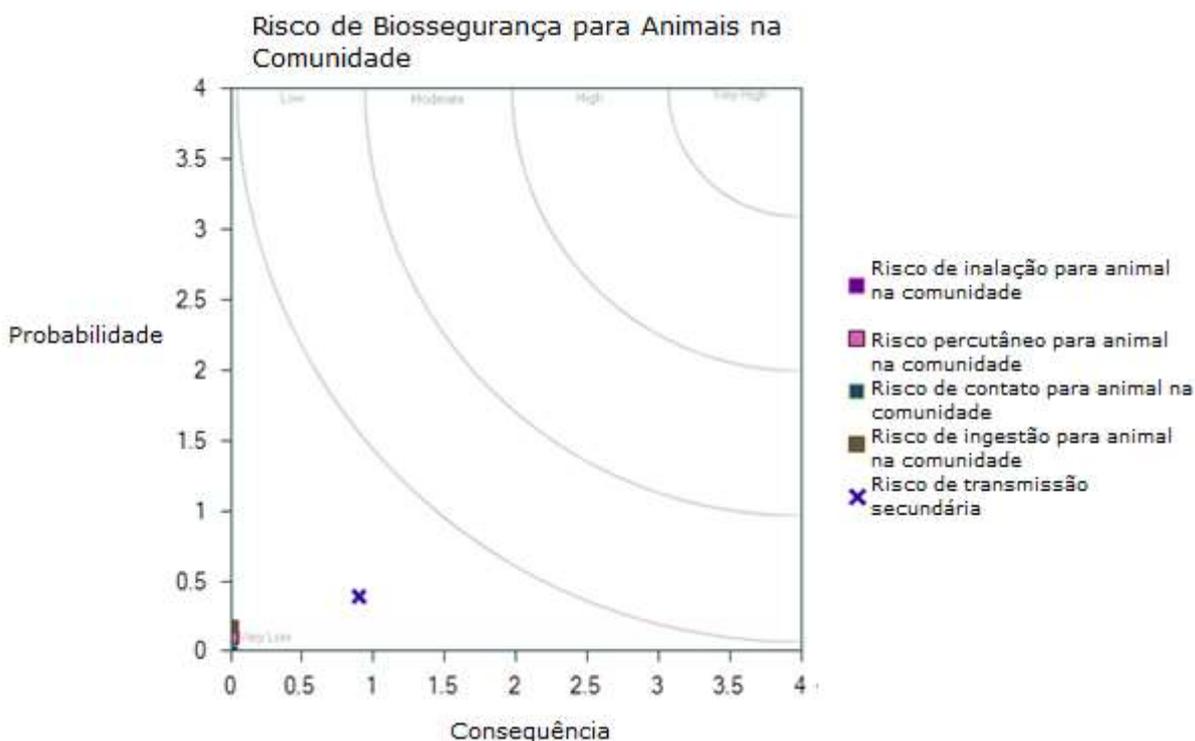
Legenda: Gráficos de risco de biossegurança gerados pelo software BioRAM, para o processo de agroinfiltração. Agente biológico: *Agrobacterium tumefaciens*. A) Gráfico de risco de biossegurança para indivíduos no laboratório e para a comunidade; B) Gráfico de risco de biossegurança para animais.

Figura 32 – Crescimento Pós- infiltração – *Agrobacterium tumefaciens*

A)



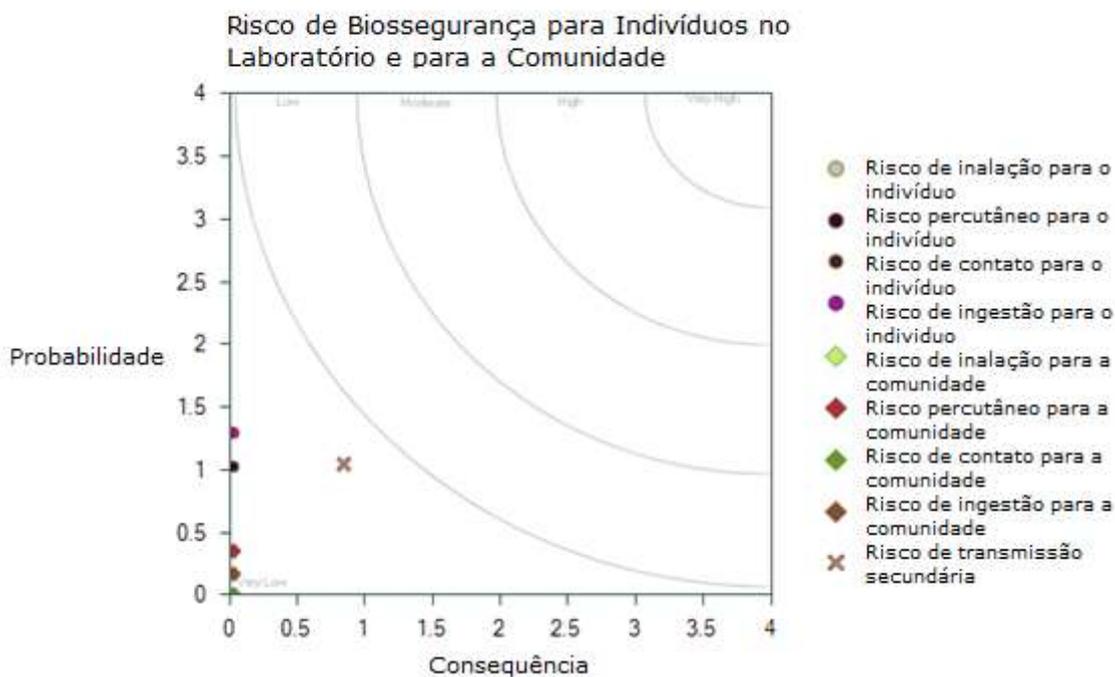
B)



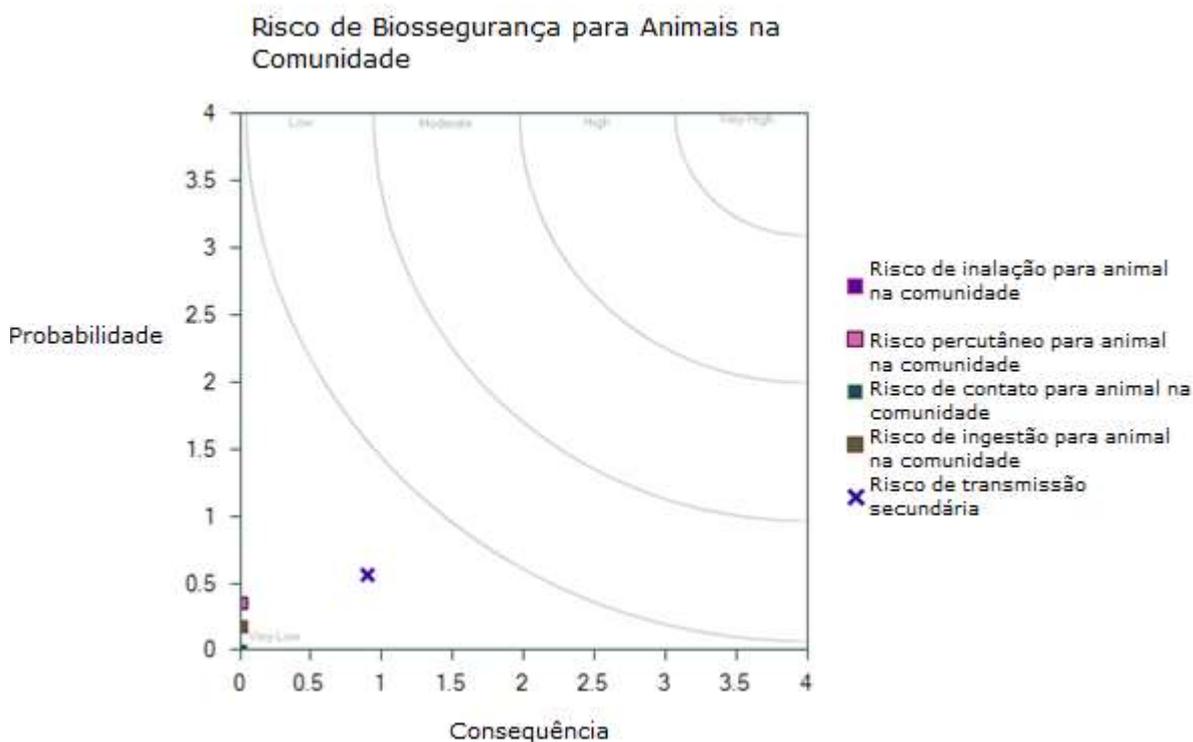
Legenda: Gráficos de risco de biossegurança gerados pelo software BioRAM, para o processo de crescimento pós-infiltração. Agente biológico: *Agrobacterium tumefaciens*. A) Gráfico de risco de biossegurança para indivíduos no laboratório e para a comunidade; B) Gráfico de risco de biossegurança para animais.

Figura 33 – Colheita – *Agrobacterium tumefaciens*

A)



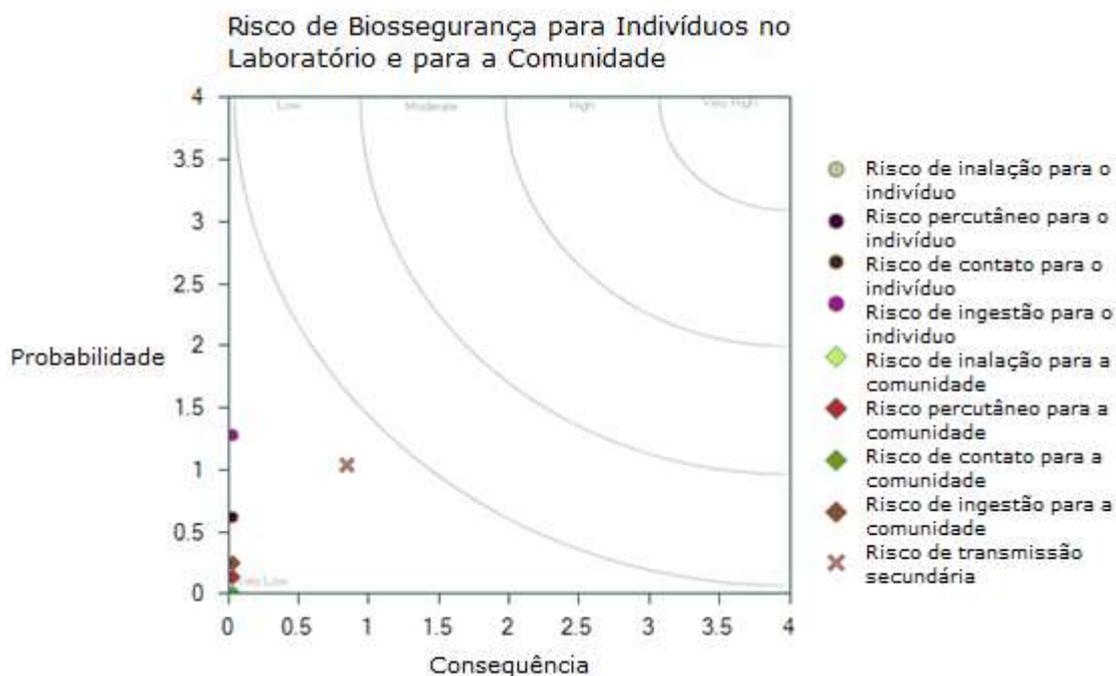
B)



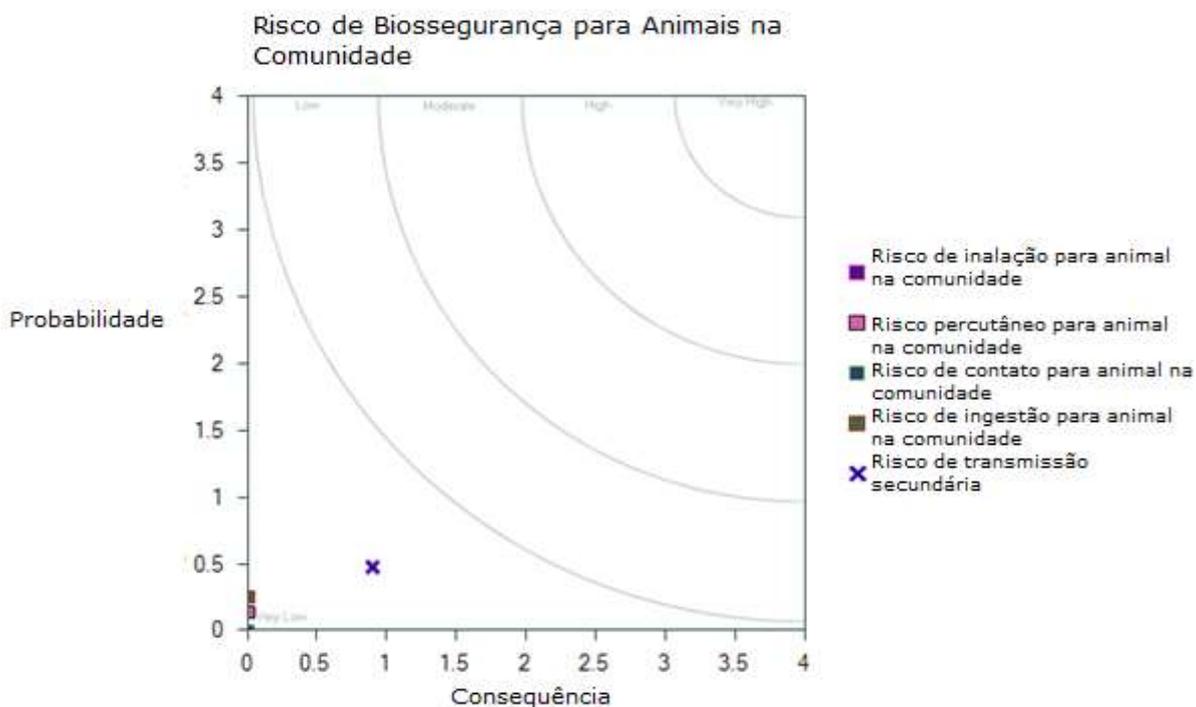
Legenda: Gráficos de risco de biossegurança gerados pelo software BioRAM, para o processo de colheita. Agente biológico: *Agrobacterium tumefaciens*. A) Gráfico de risco de biossegurança para indivíduos no laboratório e para a comunidade; B) Gráfico de risco de biossegurança para animais.

Figura 34 – Homogeneização – *Agrobacterium tumefaciens*

A)



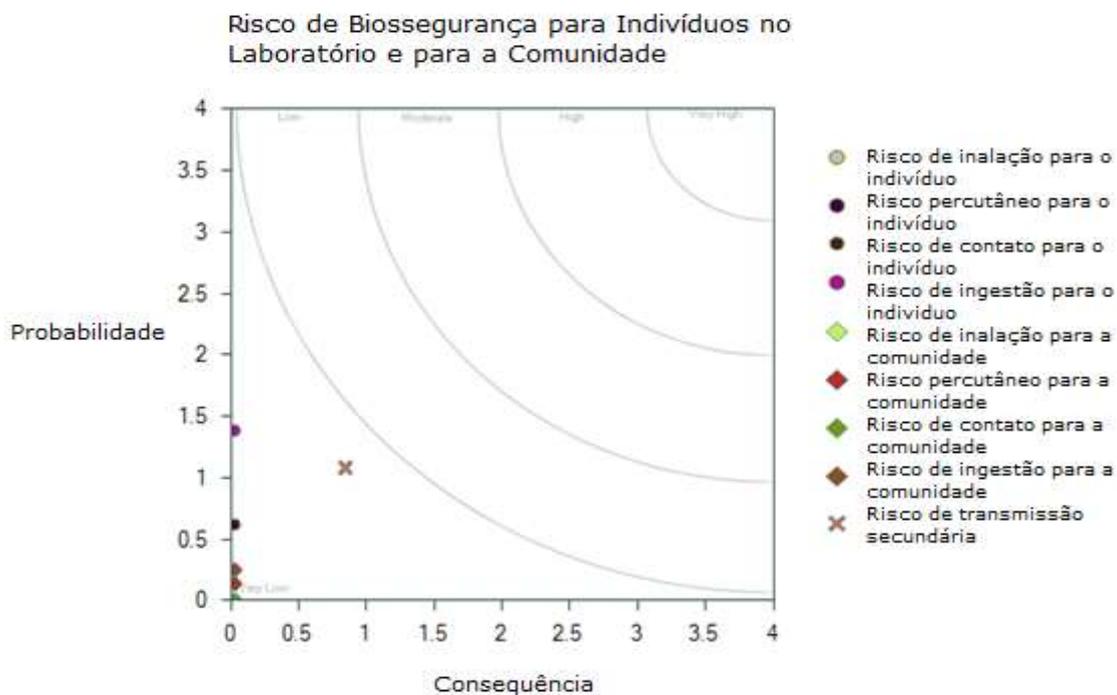
B)



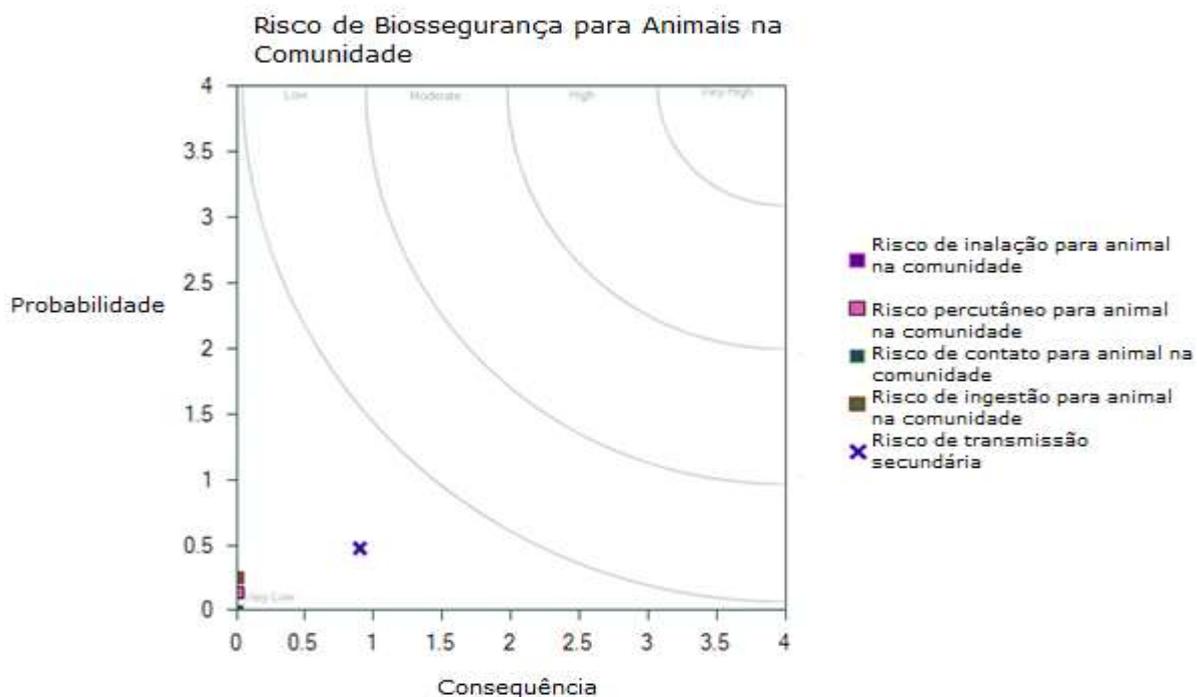
Legenda: Gráficos de risco de biossegurança gerados pelo software BioRAM, para o processo de homogeneização. Agente biológico: *Agrobacterium tumefaciens*. A) Gráfico de risco de biossegurança para indivíduos no laboratório e para a comunidade; B) Gráfico de risco de biossegurança para animais.

Figura 35 – Clarificação – *Agrobacterium tumefaciens*

A)



B)



Legenda: Gráficos de risco de biossegurança gerados pelo software BioRAM, para o processo de clarificação. Agente biológico: *Agrobacterium tumefaciens*. A) Gráfico de risco de biossegurança para indivíduos no laboratório e para a comunidade; B) Gráfico de risco de biossegurança para animais

Tabela 6 – Comparação da pontuação balanceada entre todas as operações unitárias contendo OGM do processo de produção da vacina de Febre Amarela de subunidade

Escala de resultados	Pontuação balanceada						
	FA	Fermenta- ção	Infiltra- ção	Cresci- mento pós	Colheita	Homoge- neização	Clarifica- ção
Probabilidade de ingestão Individual	0	1,25	1,38	0,74	1,29	1,28	1,38
Probabilidade de inalação Individual	0	0	0	0	0	0	0
Probabilidade percutânea Individual	2,08	0,94	0,66	0,44	1,02	0,62	0,62
Probabilidade contato Individual	0	0	0	0	0	0	0
Probabilidade de ingestão Comunidade	0	0,23	0,25	0,17	0,17	0,25	0,25
Probabilidade de inalação Comunidade	0	0	0	0	0	0	0
Probabilidade percutânea Comunidade	2	0,66	0,14	0,09	0,35	0,14	0,14
Probabilidade contato Comunidade	0	0	0	0	0	0	0
Probabilidade de ingestão Animal	0	0,23	0,25	0,17	0,17	0,25	0,25
Probabilidade de inalação Animal	0	0	0	0	0	0	0
Probabilidade percutânea Animal	2	0,66	0,14	0,09	0,35	0,14	0,14
Probabilidade contato Animal	0	0	0	0	0	0	0
Consequência da doença para humanos	0	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Consequência secundária da doença para humanos	0,35	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
Consequência da doença para animais	0	0	0	0	0	0	0
Consequência secundária da doença para animais	0,41	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89
Consequência da doença para a comunidade	0	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Probabilidade de transmissão secundária humana	0,86	1,03	1,08	0,79	1,04	1,04	1,08
Probabilidade de transmissão secundária animal	0,91	0,77	0,47	0,39	0,56	0,47	0,47

Legenda: FA processo de fabricação da vacina de Febre Amarela 17DD convencional

Conforme apresentado nos gráficos 30 a 35 o risco de biossegurança do OGM *Agrobacterium tumefaciens*, nos processos de expressão transiente para transformação de *Nicotiana benthamiana* e produção de vacina de febre amarela subunitária, pode ser considerado muito baixo.

Estes dados podem ser explicados por dois fatores. O primeiro, o fato da agrobactéria ser considerada um agente biológico de classe de risco 1 (BRASIL, 2006) por não causar doenças em seres humanos e animais. Todos os subcritérios relacionados a virulência, característica do agente e formas de transmissão tiveram pontuação igual a zero, com exceção do subcritério: *de capacidade de se alterar estando em um hospedeiro ou no ambiente natural para se tornar infeccioso através de nova via de infecção ou novos hospedeiros, ou causar aumento de consequências*. Para esse subcritério utilizou-se um valor de 2 devido à incerteza de virulência do agente, não para seres humanos ou animais, mas para as plantas no meio ambiente caso haja escape de material biológico. Essa pontuação atribuída leva a um baixo escore para o critério consequência que ficou abaixo do valor 1 para todos os processos avaliados.

O segundo fato foi devido a valores de probabilidade absolutamente baixos em todos os processos avaliados. Esse resultado de probabilidade é influenciado pela via de exposição, mas é potencialmente impactado pelas medidas de mitigação em biossegurança, principalmente pelo fato desta plataforma de produção vegetal ser toda em contenção e pelo nível de automação dos processos avaliados. É também devido ao fato da Fraunhofer estar bastante aderida as normas internacionais de biossegurança e ter implementado na rotina procedimentos operacionais mitigadores resultando em valores abaixo de 1.

Este resultado de risco de biossegurança muito baixo corrobora vários trabalhos publicados, onde as instalações para a produção do produto derivado de planta em contenção, foram classificadas como nível de biossegurança 1 (LAI & CHEN, 2012; KLIMYUK et al., 2014; SACK et al., 2015).

Na tabela 6 podemos observar que embora o risco de biossegurança possa ser considerado muito baixo, ao compararmos os processos entre si vemos que existem pequenas diferenças de risco entre eles. Os processos que apresentam o maior escore de probabilidade de exposição são a fermentação, seguida do processo de

colheita e depois a agroinfiltração. O processo de menor risco de biossegurança é o de crescimento pós-infiltração.

Esta metodologia não é uma avaliação de todos os perigos do trabalho em laboratório, mas é limitada aos perigos e riscos especificamente associados com materiais biológicos. Além disso, os modelos não suportam especificamente toxinas, patógenos de plantas, ou nanopartículas; No entanto, a metodologia geral pode ser utilizada para estes perigos.

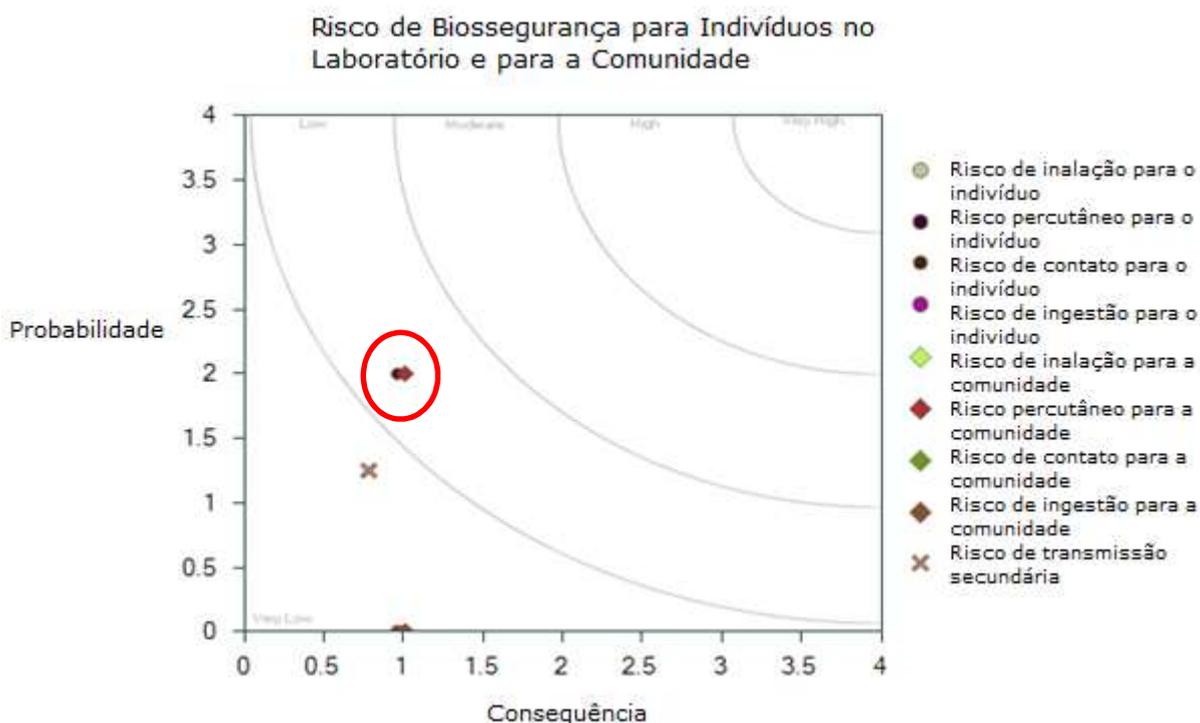
Os agentes são avaliados com um único valor consequência. Para os agentes que causam várias doenças, atualmente, devem ser apreciados como agentes separados.

A metodologia e os modelos requerem conhecimento sobre os agentes biológicos em uso e os processos e práticas de laboratório. Os modelos foram concebidos para utilização por uma pessoa experiente em biossegurança. Esta metodologia não define o nível de risco aceitável, mas apresenta um resultado de risco relativo. O julgamento de aceitação deve ser feita como parte do processo de avaliação e devem incluir a gestão.

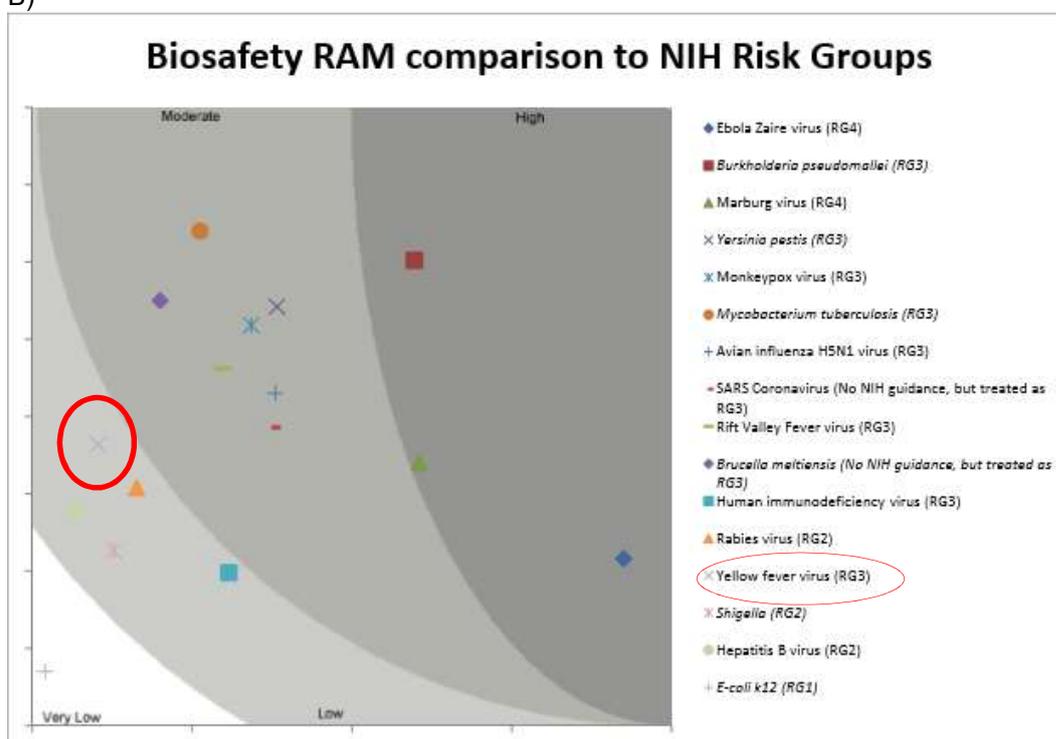
Como forma de validar os resultados apresentados para o processo de produção de vacina de febre amarela subunitária utilizando expressão transiente, preenchemos o mesmo questionário utilizando como modelo de agente biológico o vírus da febre amarela representado na figura 36A e comparamos com o valor deste mesmo agente publicado em CASKEY et al., 2010 representado na figura 36B. Os resultados foram bastante semelhantes, em ambos obtivemos um fato de risco baixo. Os resultados para febre amarela são os que estão circulos em vermelho nas figuras 36A e B.

Figura 36 – Comparação de risco de biossegurança do vírus da Febre Amarela

A)



B)



Legenda: Gráficos de risco de biossegurança gerados pelo software BioRAM, para validação dos resultados. Agente biológico: *vírus Febre Amarela*. A) Gráfico de risco de biossegurança para indivíduos no laboratório e para a comunidade gerados neste trabalho; B) fonte: CASKEY et al., 2010.

4.4. PROPOSIÇÕES REGULATÓRIAS

4.4.1. Proposta de revisão da RDC 69 – Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos

A proposta de revisão da RDC 69 teve como base:

1. O resultado da análise de lacunas que demonstrou que a legislação brasileira não dispõe de uma resolução específica para Boas Práticas em plataforma vegetal (tabela 5);
2. O preenchimento do apêndice D do documento de Boas Práticas Regulatórias da ANVISA que demonstra a necessidade de elaboração de uma RDC de BPF específica para plataforma vegetal ou revisão da RDC 69 atual;
3. Os Pontos Críticos de Controle levantados neste trabalho nos quadros 4, 5, 6 e 7, especialmente os pontos críticos da fase *upstream*;
4. A avaliação do risco para Biossegurança de cada processo que contém OGM e discutido no item 4.3.4;
5. Toda pesquisa bibliográfica e análise crítica dos artigos sobre o tema, e;
6. Os Guias específicos: ***FDA- Draft Guidance for Industry. Drugs, Biologics, and Medical Devices Derived from Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals; HEALTH CANADA - Health Products and Food Branch. Guidance Document. Plant Molecular Farming (PMF) Applications: Plant-derived biologic drugs for human use; e EMA – Points to Consider on Quality Aspects of Medicinal Products Containing Active Substances Produced by Stable Transgene Expression in Higher Plants.***

Desta forma, os pontos que necessitam revisão estão ilustrados na figura 37. Nossa proposta é que seja incluída em uma nova revisão da RDC um capítulo específico para insumos farmacêuticos ativos constituídos por expressão transiente em plantas e que os itens em verde sejam contemplados para que a fabricação de vacinas e biofarmacêuticos produzidos em sistemas de expressão transiente fiquem totalmente aderidos as BPF.

Figura 37 – Proposição de novo modelo - Discussão da Plataforma Transiente

Síntese Química	Produção dos materiais de partida para o Intermediário ou Insumo Farmacêutico	Introdução dos materiais de partida no processo produtivo	Produção do (s) intermediário (s)	Isolamento e purificação	Processamento físico e embalagem
Insumos farmacêuticos ativos derivados de fontes animais	Coleta de órgãos, fluidos ou tecidos	Corte, mistura e/ou processamento inicial	Introdução dos materiais de partida no processo produtivo	Isolamento e purificação	Processamento físico e embalagem
Insumos farmacêuticos ativos extraídos de fontes vegetais	Coleta da planta e corte	Extração (ções) Inicial (is)	Introdução dos materiais de partida no processo produtivo	Isolamento e purificação	Processamento físico e embalagem
Extratos vegetais usados como insumos farmacêuticos ativos	Coleta da planta e corte	Extração Inicial		Extrações posteriores	Processamento físico e embalagem
Insumos farmacêuticos ativos constituídos por vegetais fragmentados ou pulverizados	Coleta das plantas e/ou cultivo, colheita e corte	Fragmentação			Processamento físico e embalagem
Biotecnologia: fermentação e cultura de células	Estabelecimento do banco mestre de células e banco de células de trabalho	Manutenção do banco de células de trabalho	Cultura de células e/ou fermentação	Isolamento e purificação	Processamento físico e embalagem
Processo clássico de fermentação para produção de insumos farmacêuticos ativos	Estabelecimento do banco de células	Manutenção do banco de células	Introdução das células no processo fermentativo	Isolamento e purificação	Processamento físico e embalagem
Insumos farmacêuticos ativos constituídos por expressão transiente em plantas	Cultivo das plantas pré infiltração	Estabelecimento do banco mestre de células e banco de células de trabalho	Fermentação, infiltração, cultivo pós infiltração, colheita, corte e clarificação	Isolamento e purificação	Processamento físico e embalagem



Fonte: RDC 69 de 8 de dezembro de 2014, anexo 1 modificado pela autora

Segundo a RDC 69 de 8 de dezembro de 2014, em seu capítulo I – Considerações gerais artigo 6º:

O fabricante deve apresentar evidências do cumprimento das boas práticas de fabricação, a partir das etapas em destaque na tabela descrita no anexo 1.

Sendo assim, o estabelecimento do banco mestre e de trabalho tanto de células de *Agrobacterium tumefaciens*, quanto o banco de sementes mestre e de trabalho de *Nicotiana benthamiana* deverão ser produzidos e mantidos em condições de BPF, de forma a respeitar as características da plataforma de produção.

A atividade de fermentação propriamente dita já está aderida a RDC 69 e incorporaria apenas requisitos de biossegurança, porém as atividades de infiltração, cultivo pós-infiltração, colheita, homogeneização e clarificação teriam critérios de BPF específicos, conforme já discutido na análise de risco do processo de produção da vacina.

4.4.2. Proposta de um Guia para Orientações de fabricação de vacinas e biofarmacêuticos produzidos em sistemas de expressão transiente totalmente aderidos as BPF para uso em Humanos

O presente Guia é uma proposição para fornecer diretrizes com relação as informações requeridas para produção e submissão de medicamento biológicos derivados de plantas.

A sua elaboração foi baseada em:

1. O resultado da análise de lacunas que demonstrou que a legislação brasileira não dispõe de uma resolução específica para Registro de Medicamentos produzidos em plataforma vegetal (tabela 5);
2. O preenchimento do apêndice D do documento de Boas Práticas Regulatórias da ANVISA que demonstra a necessidade de elaboração de uma RDC de Registro de produtos específica para plataforma vegetal ou revisão da RDC 55 atual;
3. Os Pontos Críticos de Controle levantados neste trabalho nos quadros 4, 5, 6, 7 e 8, especialmente os pontos críticos da fase *upstream*;
4. A avaliação do risco para Biossegurança de cada processo que contém OGM e discutido no item 4.3.4;
5. Toda pesquisa bibliográfica e análise crítica dos artigos sobre o tema, e;
6. Os Guias específicos: ***FDA- Draft Guidance for Industry. Drugs, Biologics, and Medical Devices Derived from Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals***; e ***HEALTH CANADA - Health Products and Food Branch. Guidance Document. Plant Molecular Farming (PMF) Applications: Plant-derived biologic drugs for human use.***

Os sistemas de produção utilizados para a expressão da proteína de interesse podem incluir as culturas de células de plantas transgênicas cultivadas em fermentador, tecidos de plantas, ou plantas inteiras transgênicas (FDA, 2002; EMEA, 2008; Health Canada, 2014).

Esta proposição concentra-se em medicamentos produzidos em plantas inteiras que foram bioengenheirados para produzir uma proteína recombinante. Os princípios

descritos neste documento propositivo também podem ser aplicáveis aos sistemas de célula ou cultura de tecidos de produção geneticamente modificados derivados de plantas.

Independentemente do método de expressão do gene utilizado ou da natureza do medicamento, as submissões de medicamentos biológicos produzidos utilizando tais sistemas de expressão de plantas devem ser bem embasadas com os dados suficientes para permitir uma adequada avaliação e determinação da qualidade do produto.

PROPOSTA DE GUIA – INÍCIO

1. Identificação e descrição da planta

Uma breve descrição da planta hospedeira deve ser fornecida ou seja, nome, género, espécie, subespécie, linhagem ou cultivar, nome comum, com referência à classificação da autoridade competente, e informações sobre a identificação da espécies da planta, incluindo os dados utilizando técnicas moleculares tais como análise de isoenzima e “fingerprinting” de DNA conforme demonstrado nos quadros 2 e 3 e na figura 29.

Devem ser também incluídos um breve resumo da biologia reprodutiva da planta não modificada e as suas características de crescimento, para indicar, no mínimo, o tipo de planta de acordo com seu ciclo de crescimento (anual, perene, ou bienal), o sistema reprodutivo, material colhido, e tempo de colheita (FDA, 2002; EMEA,2008; Health Canada, 2014).

Durante as fases de desenvolvimento de produtos, uma consideração chave pode ser a seleção das espécies de plantas utilizadas como hospedeiro de produção para o medicamento desejado conforme discutido na Introdução desta Tese e apresentado na tabela 2. A fundamentação científica e justificativa deve ser fornecida para esta seleção. Além disso, uma avaliação de risco deve ser apresentada para todas as características potencialmente farmacologicamente ativa ou prejudiciais para os seres humanos. As espécies de plantas devem ser avaliadas, conforme o caso, para os seguintes atributos relevantes:

- características de crescimento e método de propagação de plantas;
- aptidão para o cultivo de rotina;
- susceptibilidade / resistência à infecção com agentes estranhos (por exemplo, vírus / viróides de plantas e fungos);
- modificações pós-traducionais (por exemplo, sítios de glicosilação, estruturas de cadeias de glicanas, ausência de modificação pós-tradução animal(s) específica relevantes);
- potencial para a expressão de compostos alergênicos ou tóxicos;
- presença de compostos exógenos ou endógenos para a planta hospedeira, e, potencialmente, farmacologicamente ativo em ou nocivo para o homem;
- existência de genes na planta hospedeira com homologias conhecidas para genes que apresentam riscos potenciais para seres humanos, por exemplo, genes que codificam enzimas metabólicas que produzem alcalóides, toxinas ou anti-nutrientes, genes que codificam os alérgenos potenciais elicitando resposta auto-imune; e
- potencial de acumulação de qualquer contaminante, por exemplo, metais pesados e pesticidas.

Todas as informações para avaliação, incluindo dados específicos e referências bibliográficas, devem ser fornecidos.

2. Sistemas de expressão

O medicamento biológico de interesse pode ser expresso de forma estável ou transiente em toda a planta, em células específicas ou tecidos da planta transgênica.

Sistemas de expressão estáveis

Os sistemas de expressão estáveis são geralmente criados por transferência unidirecional e incorporação de DNA estranho em células de plantas por

recombinação de sequências de DNA específicas no genoma da célula, com a persistência do gene exógeno e sua expressão no hospedeiro de uma maneira consistente (KUSNADI et al., 1998; DORAN, 2006).

Transformantes primários são plantas-parentais geradas a partir do evento de transformação inicial. Transformantes primários são normalmente cultivados por uma série de gerações para produzir transformantes de produção estáveis com expressão otimizada. Os transformantes de produção são as plantas transgênicas que são cultivadas durante o processo de produção, a fim de gerar a biomassa necessária para a extração subsequente do ingrediente farmacêutico ativo (MA et al., 2003).

As informações sobre as construções e os vetores de expressão usados para desenvolver o sistema de transformação devem ser fornecidas de acordo com a diretriz do ICH Q5B (Qualidade de Produtos Biotecnológicos: Análise da construção de expressão em células utilizadas para a produção de produtos proteicos derivados de rDNA). Isto deve incluir informações detalhadas sobre o promotor e o padrão de expressão resultante do gene de interesse (por exemplo, constitutivo versus induzível; tecido ou de desenvolvimento específicos versus expressão ubíqua).

Uma descrição completa da transformação, seleção, preparação e cultivo dos transformantes primários e / ou de produção devem ser fornecidos. Isto deve incluir as seguintes informações:

- detalhes de todo o material genético incorporado ou modificado, conforme o caso, número de cópias, número de locais de integração, se conhecido, o loci, e confirmação das sequências de nucleotídeos esperadas;
- padrão e a estabilidade da herança e a expressão do gene (s) de interesse. Um sistema de nomenclatura consistente para as gerações de plantas deve ser aplicado e explicado (por exemplo, T1, T2, etc.); e
- informações sobre os resíduos de materiais remanescentes do processo de transformação (por exemplo, constituintes de *Agrobacterium*).

Sistemas de expressão transiente

Os sistemas de expressão transiente são aqueles que não requerem a integração estável de um gene exógeno no genoma do hospedeiro. O material genético inserido neste processo normalmente não é integrado no genoma do receptor e pode ser degradado ou diluído através da divisão celular (YUSIBOV et al., 2000).

As informações sobre as construções e os vetores de expressão usados para desenvolver o sistema de Infiltração devem ser fornecidas de acordo com a diretriz do ICH Q5B (Qualidade de Produtos Biotecnológicos: Análise da construção de expressão em células utilizadas para a produção de produtos proteicos derivados de rDNA). Isto deve incluir informações detalhadas sobre o promotor e o padrão de expressão resultante do gene de interesse, se ele se comporta como constitutivo versus induzível; tecido ou de desenvolvimento específicos versus expressão ubíqua (ver quadro 3 e figura 29).

Uma descrição completa do procedimento de Infiltração e materiais utilizados para o estabelecimento dos processos de escala de desenvolvimento, clínica e comercial, deve ser fornecida. Isto deve incluir as seguintes informações:

- identificação de qualquer transformante (para incluir a identificação de qualquer vector utilizado para a expressão transiente);
- localização da proteína expressa antes da extração (incluindo direcionamento subcelular);
- determinação da eficiência da Infiltração nas plantas de produção (por exemplo, controles de processo);
- determinação e qualificação da faixa de expressão transiente ao longo do tempo (como uma medida de consistência do processo);
- a consistência do processo de Infiltração (pode ser demonstrada com as medidas de *endpoint* do material transfectado);

- identificação e quantificação de resíduos de materiais do processo de transformação por exemplo, constituintes de *Agrobacterium tumefaciens*; e
- de manutenção por exemplo, armazenamento, limites de estabilidade e qualquer requalificação de materiais de Infiltração (por exemplo, construções de expressão).

Expressão e estabilidade genética no final da fase de crescimento

A fidelidade do transgene e a sua expressão durante a produção (por exemplo, a sequência específica e rendimento) devem ser monitorados quando apropriado (por exemplo, por avaliação da morfologia da planta, características bioquímicas, etc). Um conjunto de dados completos para as medidas de análise de estabilidade genética durante a fase de produção upstream deve ser gerado em fases posteriores de desenvolvimento de produtos em ambos os sistemas de expressão estáveis e transientes, onde aplicável conforme descrito no quadro 5 em controle de processo do crescimento das plantas pós-infiltração e no parâmetro operacional crítico.

Os resultados dos testes de controle como a atividade funcional ou outra característica determinante durante o desenvolvimento ou na produção de lotes devem razoavelmente se correlacionar com a estabilidade genética e as especificações definidas para a garantia do controle de qualidade.

Os princípios gerais descritos no ICH Q5B podem ser aplicáveis com adaptações ao sistema de expressão de PMF.

3. Geração de Bancos

Práticas de fabricação aceitáveis para medicamentos biológicos a partir de qualquer plataforma de produção geralmente envolve o estabelecimento de bancos mestre e bancos de trabalho para o fornecimento de material de processamento consistente e suficiente (ICH Q5D).

Neste Guia, os termos Banco Mestre (BM) e Banco de Trabalho (BT) são usados para indicar essas fontes parentais referenciadas. Diferentes materiais podem ser caracterizados como bancos dependendo do tipo de sistema de expressão utilizado. Por exemplo, para um sistema de expressão estável é esperada a geração

de um banco de plantas transgênicas ao passo que, para um sistema de expressão transiente é esperada a geração de bancos tanto para a planta hospedeira como para a construção recombinante e / ou o vector recombinante.

Quando a planta fonte (i.e., hospedeiro) for mantida em outros formatos (por exemplo, sementes, culturas, etc), uma requalificação do material pode ser necessária antes do uso na produção, incluindo a identificação, qualidade, e parâmetros indicadores de estabilidade.

Esses materiais devem ser arquivados e armazenados adequadamente, a fim de manter a continuidade do fornecimento de materiais idênticos ao longo de vários ciclos de produção, e como materiais de referência para o desenvolvimento contínuo do produto.

Containers, localização e condições de conservação e prazo de validade e / ou data de re-teste devem ser definidos com base na estabilidade do material de banco.

Medidas de controle adequadas (por exemplo, exigências de BPF, controles em processo, e se aplicáveis, medidas específicas da planta hospedeira) devem ser implementadas para o BM e BT uma vez que estas medidas apoiam fundamentalmente a utilidade da plataforma de produção. A adequação destas medidas é demonstrada pela consistência do crescimento, a consistência da produção do produto pretendido, e a garantia de qualidade.

Os princípios gerais descritos no ICH Q5D (Derivação e caracterização de substratos celulares utilizados para produção de produtos biotecnológicos e biológicos) podem ser aplicáveis, com adaptações, ao sistema de produção.

4. Fase de produção Upstream (pré-colheita/ colheita)

As etapas de pré-colheita e colheita incluem todo o cultivo, a coleta, e, em alguns casos, os passos iniciais de extração efetuados antes da recepção do material de partida biológico nas instalações de fabricação do IFA e/ou do produto final. Uma descrição completa e fluxograma que descreve a sequência das etapas de produção devem ser fornecidos.

As etapas de propagação (semeadura) e as técnicas de cultivo das plantas devem ser descritas. Dependendo da estratégia de cultivo, a duração da fase de crescimento da planta deve ser claramente definida.

Fatores bióticos e abióticos que podem ser críticos para o controle da produção do ingrediente farmacêutico ativo pretendido devem ser identificados e investigados durante a fase de desenvolvimento do processo (SPARROW et al, 2013). Os dados devem ser fornecidos para o maior número possível desses fatores e deve ser discutido qualquer efeito sobre os atributos de qualidade críticos do produto. Deve ser realizado um monitoramento adequado em processo, e limites operacionais e / ou faixas devem ser criados e justificados. Uma declaração clara, apoiada por uma fundamentação científica, deve ser fornecida, se nenhum efeito for esperado ou possa ser demonstrado por qualquer um desses fatores abióticos (FDA, 2002; EMEA,2008; Health Canada, 2014).

5. Demonstração do sistema de qualidade para o controle adequado

Um sistema de qualidade adequado com base nos conceitos básicos de garantia de qualidade, BPF, e controle de qualidade devem ser definidos para a fase de produção *upstream*. Deve-se demonstrar como os princípios da *BPF-like* são cumpridos, e identificar especificamente as ações que foram implementadas para gerar um material de partida biológica definido.

Em última análise, as fases de pré-colheita e colheita do processo de fabricação devem ser adequadamente descritas e controladas, com aplicação de controles apropriados durante o processo e especificações.

Esta exigência visa estabelecer um material de partida bem definido, bem caracterizado, e bem documentado, adequado para o processamento posterior sob condições de BPF e para a produção de um medicamento. As operações e a documentação devem estar disponíveis para inspeção.

6. Estratégia de crescimento

Deve-se fornecer uma descrição da fase de crescimento da planta, incluindo escala, a presença de quaisquer alterações do solo (por exemplo,

adição de vermiculita⁴) ou outros aditivos (por exemplo, fertilizantes, fatores de crescimento), grandes equipamentos utilizados, ciclos de luz / escuro, temperatura, umidade, e quaisquer outros parâmetros importantes (FDA, 2002; EMEA,2008; Health Canada, 2014). Controles de processos, incluindo testes em processo e parâmetros operacionais, com critérios de aceitação para as etapas do processo e tempos de espera intermediários, também devem ser fornecidos.

7. Infiltração (apenas os sistemas de expressão transiente)

Para sistemas de expressão transiente, a etapa de infiltração do processo de fabricação comercial deve ser descrita, incluindo a preparação dos materiais e os critérios para a iniciação do processo de infiltração. Devem ser realizados monitoramentos apropriados durante o processo e limites e / ou intervalos operacionais aceitáveis devem ser estabelecidos.

Resíduos de materiais de processo remanescentes da infiltração, por exemplo, componentes de *Agrobacterium*, devem ser quantificados, e limites e / ou faixas operacionais aceitáveis devem ser criados quando aplicável, com justificativa adequada.

8. Monitoramento e salvaguarda da saúde das plantas

Doenças nos cultivos pode resultar não apenas em níveis elevados de agentes patogênicos de plantas no material de colheita gerando assim contaminantes, mas pode também afetar a expressão e a estrutura do produto. Da mesma forma, as condições de estresse das plantas também podem afetar a qualidade da proteína de interesse (LAI & CHEN, 2012; KLIMYUK et al., 2014; SACK et al., 2015).

⁴ Vermiculita é o nome geológico dado a um grupo de minerais laminares hidratados que são silicatos de alumínio-ferro-magnésio, assemelhando-se a mica em aparência. A rocha e outras impurezas são removidas do minério bruto que é então esmagado e classificado em tamanhos. A vermiculita é um material inerte seguro e é leve na cor. Fonte: Dupré Minerals em www.dupreminerals.com/. Nota da autora.

O sistema de controle de qualidade deve incluir procedimentos para monitorar o estado de saúde das plantas, para as investigações desencadeantes, e para a definição de ações tomadas para resolver estas questões.

9. Colheita (critérios para o início da colheita e os controles de pessoal, equipamentos e instalações)

O processo de colheita deve incluir critérios bem definidos para o seu início, como estágio de desenvolvimento ou maturidade da planta. A utilização de equipamento específico é recomendada para a colheita do material (APHIS/USDA, 2007). Se o equipamento não for dedicado, outros usos devem ser documentados, com identificação de contato com outros materiais vegetais. A limpeza adequada do equipamento usando processos validados deve ser realizada.

O tamanho do lote do material colhido deve ser claramente definido e justificado. Uma descrição do sistema de numeração de lote colhido, incluindo informações sobre qualquer partilha de colheitas ou intermediários, devem ser fornecidas.

A rastreabilidade de cada lote com relação a unidade original do BM ou BT é essencial, e o mecanismo estabelecido para fazer isso deve ser descrito.

A extração inicial do material vegetal deve ser realizada em um ambiente BPF preferencialmente. Independentemente de onde a extração inicial é realizada, todos os produtos químicos que são usados durante a lavagem e / ou extração, tais como desinfetantes ou produtos químicos orgânicos voláteis, devem ser removidos durante as etapas do processo de transformação em conformidade com a diretriz ICH Q3C (R5) (Impurezas: Guia para solventes residuais).

10. Estratégia de segregação, procedimentos de limpeza e de troca de produto

O risco associado a contaminação cruzada de ingredientes ativos deve ser abordado e minimizado utilizando estratégias adequadas. Uma vez que os procedimentos implementados de troca de produtos estejam validados, outras

culturas podem ser cultivadas em áreas ou com os equipamentos utilizados para a produção de medicamentos biológicos derivados de plantas. A eficácia dos processos de limpeza para a remoção de quaisquer resíduos, incluindo contaminantes de processamento da colheita, subprodutos e / ou agentes de limpeza, bem como o controle de possíveis contaminantes microbianos, deve ser demonstrada.

11. Embalagem, condições e tempo de armazenamento de matérias-primas biológicas

Se o material de origem colhido for armazenado antes do processamento posterior, as informações específicas adicionais exigidas são:

- Informação para demonstrar a adequabilidade da embalagem e os seus componentes para o uso pretendido;
- Descrição das condições de armazenamento (por exemplo, temperatura, umidade, volume, densidade, tempo de armazenamento, etc.);
- Controles adequados de fatores que podem afetar a estabilidade, incluindo a capacidade para suportar o crescimento de microrganismos, o conteúdo residual de solo, a presença de material estranho, insetos, vermes, etc.; e
- Validação dos tempos de espera com base em (i) as propriedades físico-químicas gerais do medicamento, e (ii) todas as propriedades do medicamento que podem ser razoavelmente afetar a estabilidade do material e a qualidade.

O material de origem deve ser armazenado em condições adequadas para assegurar que os processos de decomposição não aumentam a concentração de contaminantes acima dos níveis especificados, nem prejudica o ingrediente farmacêutico ativo, os produtos intermediários ou o produto final.

12. Fase de produção downstream (pós-colheita)

A estratégia global da fase pós-colheita deverá ter como objetivo controlar rotineiramente a qualidade de cada lote de ingrediente ativo produzido e garantir a consistência lote a lote. Isso deve levar em conta as variações inerentes à produção à base de plantas.

13. Definição de lote

A definição de lote deve ser fornecida, e a rastreabilidade de cada lote com o banco de trabalho deve ser descrita. Critérios e disposições para qualquer agrupamento de material colhido, ou quaisquer outros intermediários (por exemplo, extrato inicial, extrato final, intermediários do processo, IFA), ou produto final deve ser definida.

Se for o caso, limites de controle em processo devem ser estabelecidos e as especificações definidas para os parâmetros críticos de qualidade escolhidos.

14. Processo de purificação e controles em processo

O material de colheita, extrato inicial, ou extrato final utilizado para iniciar as etapas de fabricação pós-colheita na instalação de fabricação do ingrediente farmacêutico ativo é considerado como o material de partida biológico (FDA, 2002; EMEA, 2008; Health Canada, 2014). Cada lote do material de partida biológico deve ser testado e atender às especificações pré-estabelecidas, antes da sua utilização no processamento subsequente e purificação. Como um exemplo, a recuperação de materiais (determinação de rendimento) pode ser utilizada para demonstrar a consistência da fase de fabricação *upstream*.

Uma descrição completa e um fluxograma que descreve a sequência de etapas de produção que compreendem os métodos de utilizados para a extração, concentração, purificação, formulação e envase devem ser fornecidos.

Devem ser fornecidas descrições de qualquer método alternativo de fabricação ou variante (s), contendo as circunstâncias e lógica de uso (incluindo referências a documentação de apoio). Também devem ser fornecidos, quando aplicável, o relatório

de desenvolvimento de processos de fabricação e relatórios de validação, a comparabilidade do produto, etc.

Considerando a variabilidade potencial inerente a todo cultivo de plantas, especial atenção deve ser dada sobre a demonstração da robustez dos processos de produção (WHO, 2010; WHO 2011). Como é o caso com os medicamentos derivados da biotecnologia, os métodos usados para purificar o produto, os controles em processo (tolerância para uma faixa de desempenho), e as especificações (por exemplo, pureza, potência, micoplasma, carga biológica e vírus adventícios) deve ser descrito em detalhes, justificado, e validado.

As impurezas potenciais ou contaminantes derivados da planta e do processo de produção (por exemplo, proteínas da célula hospedeira, DNA, os metabólitos de plantas, endotoxinas, herbicidas, fertilizantes e micotoxinas), devem ser avaliados (FDA, 2002; EMEA,2008; Health Canada, 2014). Deve ser tomado cuidado para documentar contaminantes que podem co-purificar com o material desejado, e quaisquer elementos com potencial para aumentar as preocupações de segurança (tais como a hipersensibilidade, imunogenicidade e toxicidade).

A capacidade do processo de purificação para remover impurezas e contaminantes deve ser demonstrada e os fatores gerais de redução de impurezas, bem como fatores de redução para cada etapa de purificação, devem ser estabelecidos.

15. Consistência de produção

Deve ser demonstrada a consistência lote a lote, com resultados dentro dos critérios de aceitação estabelecidos e com os parâmetros químicos, físicos e biológicos previamente estabelecidos, respeitando o controle estatístico do processo. Esta demonstração deve ser feita com um número estatisticamente justificado de lotes de material de colheita, IFA e produto final consecutivamente fabricados e produzidos usando cultivos consecutivos ou qualquer outra abordagem validação do processo aceitável.

As análises dos lotes devem demonstrar de forma adequada a segurança e consistência dos processos de cultivo e purificação para a produção do medicamento biológico de origem vegetal.

16. Impurezas e potencial de alergenicidade

A caracterização do medicamento para estabelecer um perfil abrangente da qualidade deve ser realizada com métodos adequados, de acordo com as diretrizes atuais, farmacopeias, e requisitos existentes na ANVISA.

17. Impurezas potenciais relacionados com o produto

Métodos apropriados devem ser utilizados para caracterizar as impurezas relacionadas com o produto.

Esta análise deve incluir a determinação da composição global de monossacarídeos, a análise de oligossacarídeos libertados a partir da proteína, por exemplo, a determinação de estruturas antenárias⁵, mapeamento e oligossacarídeos associados à proteína como a glicosilação por local, e a distribuição de glicofomas. O impacto de glicosilação da proteína sobre a imunogenicidade, a atividade, e meia-vida *in vivo* da proteína de interesse deve ser determinada (GOMORD et al., 2010).

Estudos de caracterização devem também incluir a análise de outras modificações pós-translacionais além da glicosilação por exemplo, acetilação, fosforilação, e a adição de lipídeos, lectinas, polifenóis. Particular atenção deve ser dada a porções ou padrões que não são conhecidos para estar presente nas proteínas humanas naturais. Quando tais porções ou padrões forem observados, eles devem ser destacadas, e as estratégias empregadas para monitorá-los ou removê-los durante o processo de purificação devem ser documentadas, e os resultados adequados demonstrados.

Se houver um inerente grau de heterogeneidade estrutural, por exemplo, devido à presença de formas modificadas pós-tradução, deve ser definido o padrão de heterogeneidade. Além disso, o impacto do cultivo, colheita, processamento pós-colheita e armazenamento no padrão de heterogeneidade do ingrediente ativo deve ser definido, a fim de estabelecer uma base para um conjunto adequado de controles e especificações para o produto, incluindo parâmetros de estabilidade.

⁵ Alguns dos oligossacarídeos complexos tem sequências de trissacarídeos ligadas a cada manose do oligossacarídeo ramificado central sendo, portanto, chamados de cadeias complexa antenárias. Fonte: Bioquímica médica / John W. Baynes, Marek H. Dominiczak. – 4º. Ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. Nota da autora.

18. Impurezas potenciais relacionados com o processo

Métodos apropriados devem ser utilizados para caracterizar as impurezas relacionadas com o processo. Estes incluem, mas não estão limitados a:

- outras proteínas vegetais que não a proteína transgênica expressa, por exemplo, lectinas;
- proteínas funcionais específicas como por exemplo, proteases;
- DNA da planta e do vector de expressão transiente; e
- metabólitos secundários de plantas, tais como alcalóides ou glicosídeos endógenos das plantas de produção transgênica.

Em particular, devem ser consideradas impurezas a partir do próprio processo:

- materiais empregados na produção e purificação (incluindo o solo, fertilizantes, pesticidas, solventes, materiais cromatográficos liberados das colunas, etc.); e
- materiais (químicos, bioquímicos, microbianos e / ou biológicos) introduzidos acidentalmente durante a produção e purificação incluindo endotoxinas, aflatoxinas e outras micotoxinas, metais tóxicos, etc.

Deve-se determinar o nível residual de todas as potenciais impurezas relacionadas com o processo no material vegetal quando colhido e que pode estar presente no produto final. Estimativa de quantificação deve ser realizada utilizando condições realistas, bem como cenários de pior caso, para o processo de produção (FDA, 2002; EMEA, 2008; Health Canada, 2014).

19. Alergenicidade potencial de impurezas de processo / relacionadas com o produto

Sistemas de produção vegetal podem conter uma série de metabólitos secundários (por exemplo, carotenóides, fitosteróis, saponinas, glucosinolatos, flavonóides, os fito estrogênios, inibidores de protease, terpenos, sulfetos, e ácido

fítico), bem como uma variedade de proteínas da célula hospedeira, gorduras, e hidratos de carbono, que podem apresentar algum risco potencial de alergenicidade ou outro evento adverso no medicamento (KIRK et al., 2005)

O processo de purificação, a um nível aceitável, deve remover as impurezas. Quando práticas de produção são implementados em que as impurezas permanecem no produto final quer como quantitativamente determinada ou que se considere estar presentes, uma análise de avaliação de risco deve ser realizada. Para qualquer composto alergênico potencial, uma estimativa da quantidade por dose terapêutica do medicamento deve ser calculada. Particular atenção deve ser dada a compostos com diferenças específicas na estrutura de glicanos causadas por diferenças processamento de N-glicanos na planta e em humanos isto é, a presença de β (1,2) xilose e resíduos α (1,3) -fucose. Um perfil de benefícios positivos deve ser demonstrado utilizando os dados não-clínicos e / ou clínicos que avalia a incidência e a gravidade de tais eventos.

Os testes para a detecção de qualquer composto alergênico potencial e quantificação de impurezas devem ser selecionados com base nos parâmetros e validação dos métodos.

20. Gerenciamento de riscos

Sempre que necessário, os níveis de todos os produtos residuais ou impurezas relacionadas com o processo devem ser controlados através de controles em processo ou critérios de especificação de libertação de lotes, e monitorado para estabelecer tendências.

Análise de risco deve ser realizada para determinar a segurança, sempre que necessário (ICH Q9).

A quantidade máxima de quaisquer resíduos de pesticidas ou principais metabolitos de resíduos de pesticidas presentes no produto farmacológico final também deve estar especificada, e a segurança dos referidos limites no contexto da utilização indicada do medicamento tem que estar justificada. Estudos pré-clínicos adicionais podem ser necessários quando a segurança de qualquer nível residual de uma impureza no produto farmacológico final possa ser uma preocupação.

21. Desenvolvimento de processos de fabricação

Deve existir um processo para descrição de mudanças feitas na fabricação de lotes tanto nos processos upstream quanto downstream e também mudanças em equipamentos críticos. Exemplos de mudança nos processos podem incluir, por exemplo, a mudança (s) na técnica de cultivo das plantas, alterações do solo, ou escala de produção.

A razão para a mudança sempre deve ser explicitada.

O impacto da mudança deve ser avaliado através da análise do seu potencial para influenciar a qualidade como por exemplo, atividade biológica, perfil de impurezas do produto em qualquer etapa da produção. Para as mudanças no processo de fabricação que sejam consideradas significativas, dados de testes analíticos comparativos nos lotes devem ser fornecidas para determinar o impacto sobre a qualidade do medicamento (ver a diretriz ICH Q6B – Especificações: Procedimentos de testes e critérios de aceitação para produtos biotecnológicos / biológicos).

A discussão dos dados, incluindo uma justificativa para a seleção dos testes e avaliação dos resultados, devem ser incluídos. Em uma base caso a caso, quando aplicável, também podem ser incluídos estudos não clínicos e clínicos, aos testes utilizados para avaliar o impacto das mudanças no processo de fabricação.

22. Testes de liberação de produto e limites de especificação

Um perfil de qualidade abrangente, com de teste de liberação de produto e limites especificações apropriados, deve estar de acordo com documentos de orientação atuais e farmacopeia.

A seleção dos testes a serem incluídos nas especificações devem ser definidos de acordo com a diretriz ICH Q6B, e devem basear-se na caracterização completa da droga biológica.

A lógica usada para estabelecer os critérios de aceitação devem ser descritos, e cada critério deve ser justificado com base em dados de caracterização e dados obtidos a partir de lotes utilizados nos estudos não clínicos e / ou clínicos.

23. O controle de agentes contaminantes endógenos e adventícios

Apresentar uma análise risco do potencial de existência de agentes virais e não-virais, endógenos e adventícios, incluindo aqueles derivados a partir do sistema de expressão de plantas, no ingrediente ativo. Nos casos em que podem ser relevantes na base nesta análise, deve-se propor uma estratégia integrada passo a passo que garanta de forma confiável a segurança de cada lote do medicamento.

As estratégias eficazes, se for o caso, provavelmente envolvem, mas não estão limitados às seguintes medidas:

- controles e testes em materiais de partida, matérias-primas, reagentes e excipientes;
- barreiras (contenção) aplicada no nível de etapas agrícolas (cultivo, colheita, processamento pós-colheita) destinados a impedir a entrada acidental de materiais e agentes estranhos;
- testes *in vitro* e *in vivo* para demonstrar a ausência de agentes adventícios e agentes endógenos nos estágios críticos de produção, por exemplo, no material de colheita e no bulk processado; e
- procedimentos validados de remoção / inativação de vírus/viroides⁶. Para obter detalhes adicionais, consultar a orientação ICH Q5A (R1) (Qualidade de produtos biotecnológicos: avaliação da segurança viral de produtos biotecnológicos derivados de linhas celulares de humanos ou de origem animal).

Nota: Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (TSE sigla em inglês)

- questões

Incentiva-se a usar apenas materiais *TSE-free* na produção de medicamentos biológicos derivados de planta.

No caso de IFAs ou medicamentos fabricados com reagentes obtidos a partir de fontes que estão em risco de transmissão de agentes de Encefalopatias

⁶ Viroides: Moléculas de RNA fita simples e circulares que infectam células de plantas. Não produzem proteínas.

Espongiformes Transmissíveis (TSE) (por exemplo, ruminantes), informações e provas para qualquer potencial risco de TSE (por exemplo, nome do produtor, as espécies e os tecidos a partir do qual o material é um derivado, país de origem dos animais de origem, os materiais de uso e aceitação anterior) devem ser fornecidas quando disponíveis (BRASIL, 2010b).

24. Informação não-clínica e clínica

Não-clínica

A avaliação não clínica desempenha um papel importante no desenvolvimento global de medicamentos biológicos derivados de plantas. Orientações existentes relevantes para o desenvolvimento pré-clínico e avaliação de medicamentos biológicos feitas com outros sistemas de produção podem ser aplicadas a medicamentos biológicos derivados planta (ICH S6 (R1); ICH M3; WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, ICH diretrizes de Segurança – serie “S”).

Geralmente, deve ser demonstrado prova de conceito in vitro e / ou in vivo. Os estudos de segurança devem definir efeitos farmacológicos e toxicológicos, não só antes do início dos estudos humanos, mas ao longo do desenvolvimento clínico. O escopo dos estudos não clínicos serão determinadas pelos atributos conhecidos do produto, incluindo o material genético do doador, a planta hospedeira, e a extensão da experiência clínica de produtos comparáveis. É bastante recomendável que o produtor e a Agência Regulatória se comuniquem desde o início do desenvolvimento para o atingimento de um acordo sobre os requisitos e tipo de ensaios não clínicos.

Considerações adicionais para estudos não clínicos dos medicamentos biológicos derivados de plantas incluem a avaliação da alergenicidade, imunogenicidade e impurezas potencialmente prejudiciais.

25. Toxicidade

A avaliação não clínica da toxicidade de medicamentos biológicos derivados de plantas deve ser semelhante ao de drogas biológicas produzidas por outros sistemas de produção. Os produtores devem consultar as orientações pertinentes para dados não clínicos como descrito no **Guia para a condução de estudos não-clínicos de**

segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos, ANVISA 2010. No entanto, especial atenção deve ser dada aos produtos tóxicos, patógenos, pesticidas (isto é, inseticidas, herbicidas e fungicidas), metabólitos de pesticidas nas plantas, fertilizantes, metais pesados, anti-nutrientes, e Alérgenos.

Estudos pré-clínicos adicionais podem ser necessárias quando a segurança de qualquer nível residual de uma impureza tais como, os pesticidas e os seus metabolitos, no produto final pode ser uma preocupação, particularmente para medicamentos parenterais, e aqueles que podem ser administrados em doses repetidas e por um longo prazo. Se a planta hospedeira for conhecida por conter substâncias tóxicas por exemplo, inibidores de protease, agentes hemolíticos, neurotoxinas, e cancerígenos, testes in vitro e em animais são altamente recomendados para estabelecer se os níveis tóxicos estão em uma faixa de segurança no produto farmacológico final. Em estudos com animais, devem ser utilizados modelos apropriados de animais (VAN DER LAAN et al., 2006).

A inserção do transgene pode influenciar a expressão de toxinas de plantas ou de outras proteínas do hospedeiro, o que deve ser investigada nos estudos de toxicidade. Também deve-se avaliar tanto a presença e níveis de metais pesados, e quaisquer riscos potenciais para a saúde humana.

Estudos de imunotoxicidade devem ser realizados para investigar o potencial imunotóxico de medicamentos biológicos derivados de plantas se for identificado um motivo de preocupação.

26. Imunogenicidade

Testes de imunogenicidade para medicamentos biológicos derivados de plantas devem ser conduzidos de acordo com as orientações existentes (ICH S6 (R1) Avaliação de pré-clínica de segurança de medicamentos derivados de biotecnologia). Os produtores devem dar atenção especial às modificações pós-traducionais exclusivas de sistemas de expressão vegetal, por exemplo, a presença de xilose em glicoproteínas e seu impacto sobre a imunogenicidade.

No projeto de desenvolvimento da vacina de Febre Amarela Subunitária testes de imunogenicidade em diferentes modelos animais foram conduzidos de forma a

demonstrar a imunogenicidade da proteína E recombinante produzida em *Nicotiana benthamiana* (ver artigo submetido no apêndice C).

27. Alergenicidade

Alérgenos podem ser introduzidos no produto farmacológico final, tanto a partir da planta hospedeira como a partir do processo de produção, a partir de contaminação inadvertida com fungos, pêlos de animais, excrementos de animais, ou ácaros, devido às condições de campo ou armazenamento. Os produtores devem avaliar a necessidade de ensaios de alergenidade para cada produto, numa base caso-a-caso. Por exemplo, se uma vacina for produzida na planta hospedeira com um alérgeno potencial e a vacina for adjuvantada para aumentar a resposta imune, o risco de alergenidade pode ser maior (VAN DER LAAN et al., 2006).

Se a planta hospedeira é conhecida por ser uma fonte de alérgenos, os produtores devem executar testes de alergenidade apropriados. As modificações específicas de plantas devem ser avaliadas para os efeitos potenciais sobre as respostas alérgicas ao medicamento pretendido (TAKEYAMA et al., 2015).

Os produtores devem avaliar o produto final para determinantes alérgicos. Por exemplo, a alergenidade do medicamento pode ser definida por meio de testes usando soros específicos derivados de pacientes alérgicos ao material de origem.

Estudos Clínicos

É altamente recomendável que, durante o desenvolvimento de medicamentos biológicos derivados de plantas, os produtores refiram-se a orientação (s) atual em matéria de segurança e de eficácia que já estão em vigor para outros sistemas de produção (ICH – Serie “Eficácia” do E1 ao E18). A atividade farmacológica dos medicamentos biológicos derivados de plantas deve ser bem caracterizadas em estudos clínicos.

Comunicações iniciais são altamente incentivadas entre o produtor e a Agência Regulatória para o consenso sobre as informações de submissão a serem fornecidas para um produto específico.

As glicoproteínas produzidas nas plantas têm carboidratos determinantes únicos, tais como xilose e α -(1,3)-fucose, que não são encontrados em mamíferos (GOMORD et al., 2010). A imunogenicidade das glicoproteínas derivadas de PMF devem ser abordadas em estudos humanos, incluindo estudos de imunogenicidade e farmacocinética / farmacodinâmica (PK / PD), quando aplicável.

Consistência do produto final, dose e regime específico de dosagem devem ser estabelecidos.

Tal como acontece com outras novas drogas biológicas, deve ser fornecido um Plano de Gestão de Risco de pós-comercialização (PGR), incluindo planos para longo prazo de seguimento dos pacientes para a eficácia e segurança (BRASIL, 2010b).

PROPOSTA DE GUIA – FIM

4.4.3 Arcabouço regulatório para registro de produtos biológicos produzidos em sistemas de expressão transiente totalmente aderidos as BPF para uso em Humanos

Antes da inserção de um medicamento novo no mercado e de sua comercialização ou consumo, a ANVISA deve avaliar a documentação administrativa e técnico-científica relacionada à eficácia, à segurança e à qualidade desse medicamento. A norma atual para registro de medicamentos biológicos é a RDC 55/2010 publicada em 16 de dezembro de 2010 que determina que se siga a via de desenvolvimento individual obrigatoriamente para todos os produtos biológicos novos no Brasil, uma vez que, por serem moléculas novas no País, é necessária a apresentação de todos os dados acerca do desenvolvimento do produto, bem como dos testes não clínicos e clínicos (REDIGUIERI et al, 2013).

De forma geral, a RDC 55/2010 prevê a apresentação de documentação legal, relatório técnico, modelos de bula, embalagem primária e secundária e relatório de experimentação terapêutica ou informação não clínica e clínica.

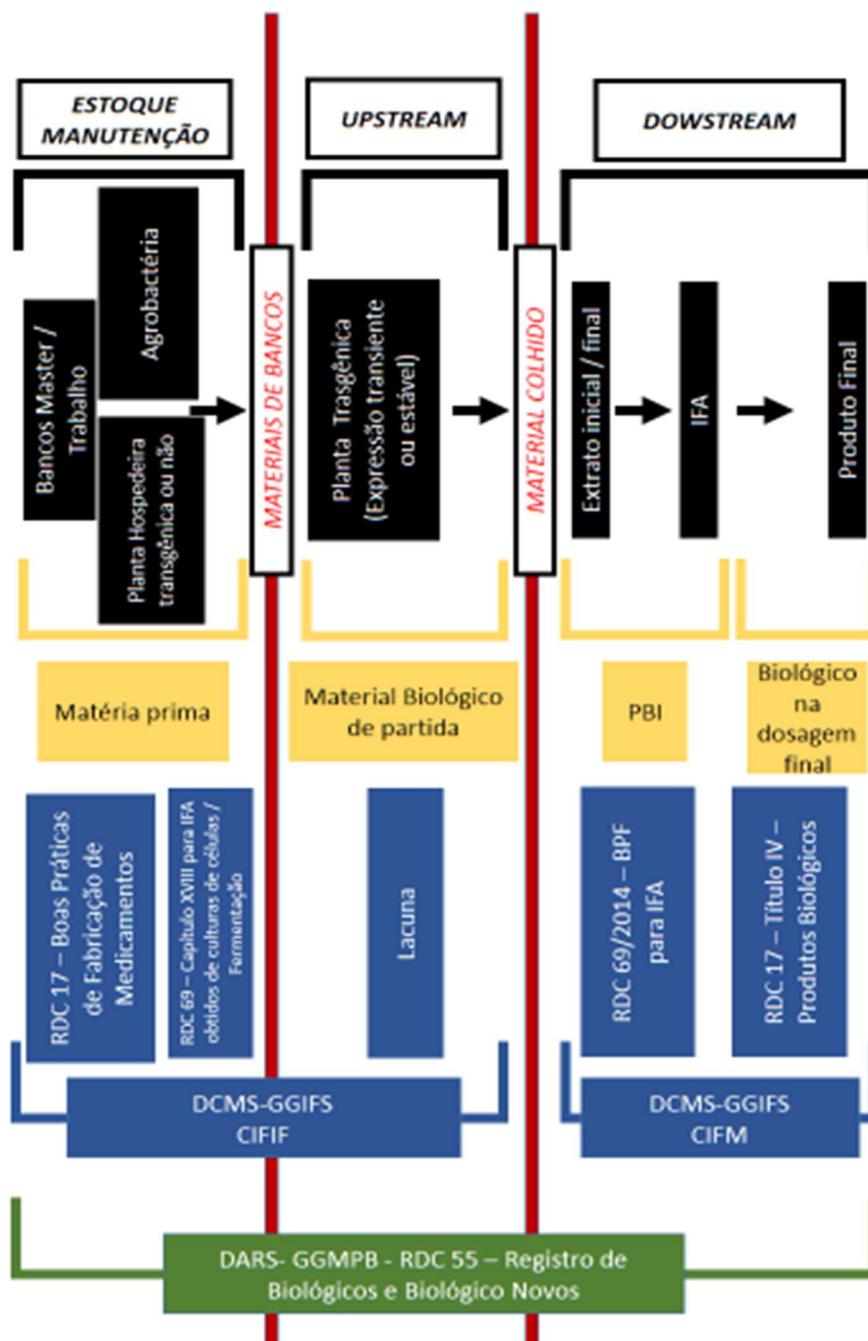
É importante ressaltar que todas as etapas de fabricação devem ser inspecionadas pela ANVISA e os produtores devem apresentar certificado de boas práticas de fabricação (CBPF). Esta certificação deve englobar todas as etapas de

obtenção do produto, incluindo a fabricação do princípio ativo, produto intermediário, produto biológico a granel, produto biológico em sua embalagem primária e produto acabado de um determinado medicamento, conforme o caso.

Este trabalho então se propôs a levantar, através de análise de risco à qualidade e análise de risco de biossegurança, quais pontos devem ser inspecionados e inseridos em uma RDC de boas práticas de fabricação para produtos produzidos em plataforma vegetal e também um guia de orientações para fabricação de vacinas e biofarmacêuticos produzidos em sistemas de expressão transiente totalmente aderidos as BPF para uso em humanos, que orientem não só os produtores, como também a Agência Regulatória nas inspeções de registros de produtos desta natureza.

Desta forma estamos propondo um arcabouço regulatório (figura 38) para registro de produtos biológicos produzidos em sistemas de expressão transiente que engloba a Diretoria de Autorização e Registros, através da Gerência Geral de Medicamentos e Produtos Biológicos, supervisionando todo o processo de registro do produto desde a manutenção dos estoques até a obtenção do produto final. E, para confirmar a adesão aos requisitos de Boas Práticas, a participação da Diretoria de Controle e Monitoramento Sanitários, através da Gerência Geral de Inspeção e Fiscalização Sanitária, onde a Coordenação de inspeção e fiscalização de insumos farmacêuticos ficaria responsável pelas inspeções de BPF nas etapas de manutenção do estoque e processos *upstream*, utilizando como documento a RDC 69 revisada ou até uma nova RDC específica para estes tipos de produtos. E, a Coordenação de inspeção e fiscalização de medicamentos ficaria responsável pelas inspeções de BPF nas etapas de downstream utilizando como documento a RDC 69 revisada e a RDC 17 – Título IV- Produtos Biológicos.

Figura 38 – Proposta de aplicação de BPF e supervisão pela ANVISA de medicamentos biológicos produzidos em plantas inteiras



Legenda: DARS = Diretoria de Autorização e Registros, GGMPB = Gerência Geral de Medicamentos e Produtos Biológicos, DCMS = Diretoria de Controle e Monitoramento Sanitários, GGIFS = Gerência Geral de Inspeção e Fiscalização Sanitária, CIFIF = Coordenação de inspeção e fiscalização de insumos farmacêuticos, CIFM = Coordenação de inspeção e fiscalização de medicamentos, PBI = Produto Biológico Intermediário, IFA = Ingrediente Farmacêutico Ativo.

5. CONCLUSÕES

- O resultado da análise de lacunas demonstrou que falta no Brasil um arcabouço regulatório integrado entre os Ministérios da Saúde (ANVISA); Ministério da Agricultura (SDA) e Ministério da Ciência e Tecnologia (CTNBio) de modo a regular as plantas transgênicas produtoras de biológicos. Existe a necessidade de uma abordagem distinta de regulamentação entre as plantas transgênicas (outras) e as plantas transgênicas produtoras de biológicos, de forma a minimizar os riscos potenciais para a segurança da cadeia alimentar e /ou para o meio-ambiente;
- De acordo com a análise do documento de Boas Práticas Regulatórias da ANVISA, demonstramos a necessidade de revisão e /ou elaboração de uma RDC para registro de produtos biológicos derivados de tecnologias da plataforma vegetal, bem como da revisão e /ou elaboração de uma RDC de BPF para estes produtos;
- Através do uso do software BioRAM fizemos uma análise dos riscos de biossegurança da produção da vacina de Febre Amarela de subunidade produzida em plataforma vegetal e nossos resultados demonstram um risco de biossegurança muito baixo para este processo;
- Nossos resultados de análise de risco à qualidade e análise de risco de biossegurança nos permitiram propor uma revisão à RDC 69 de 8 de dezembro de 2014 – Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos, em pontos específicos da Resolução, mas apontando fortemente para os bancos de manutenção de sementes de *Nicotiana benthamiana* e cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, bem como para os processos *upstream* que são absolutamente característicos desta plataforma vegetal;
- De forma a estabelecer e caracterizar os bancos de células de *Agrobacterium tumefaciens*, um Protocolo de Produção de Banco de Células Master e de Trabalho em BPF foi desenvolvido neste trabalho em conjunto com a Fraunhofer Centro de Biotecnologia Molecular (FCMB);
- Nossos resultados, somados a toda a literatura pesquisada nos permitiram propor as bases para a elaboração de um guia para registro de produtos

biológicos derivados de tecnologias da plataforma vegetal visando uma possível obtenção do registro destes produtos junto a ANVISA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Boas Práticas Regulatórias – Guia para o Programa de Melhoria do Processo de Regulamentação da Anvisa. Brasília, 2008.

AKONDY, R.S; MONSON, N.D; MILLER, J.D; EDUPUGANTI, S; TEUWEN, D; WU, H; et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. **The Journal of Immunology**, v.183, n.12, p.7919-30, dez. 2009.

ALDERBORN, A; SUNDSTROM, J; SOERIA-ATMADJA, D; SANDBERG M, ANDERSSON, H.C; HAMMERLING, U. Genetically modified plants for non-food or non-feed purposes: Straightforward screening for their appearance in food and feed. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p.453-64, 2010.

ANDREWS, L.B; CURTIS, W.R. Comparison of transient protein expression in tobacco leaves and plant suspension culture. **Biotechnol Prog.**, v.21, n.3, p. 946-52, maio-jun. 2005.

BUETTNER-MAINIK, A; PARSONS, J; JEROME, H; HARTMANN, A; LAMER, S; SCHAAF, A; SCHLOSSER, A; ZIPFEL, P.F; RESKI, R; DECKER, E.L. Production of biologically active recombinant human factor H in *Physcomitrella*. **Plant Biotechnology Journal**, v.9, p.1–11, jun. 2010.

BARRETT, A.D; TEUWEN, D.E. Yellow fever vaccine – how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? **Curr Opin Immunol.**, v.21, n.3, p.308-13, jun. 2009.

BASARAN, P; RODRÍGUEZ-CEREZO, E. Plant Molecular Farming: Opportunities and Challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.28 p. 153-172, 2008.

DUGDALE, B; MORTIMER, C.L; KATO, M; JAMES, T.A; HARDING, R.M; DALE, J.L. Design and construction of an in-plant activation cassette for transgene expression and recombinant protein production in plants. **Nature Protocols** v.9, p. 1010-1027, abr. 2014.

BERBERICH, S.A; DEVINE, R.A. US Regulation of Plant-made Biopharmaceuticals, Part 1. **BioPharma International**, v.18, p. 38-46, jan. 2005.

BIELEFELDT-OHMANN H. Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. **Trends Microbiol.**, v.5, p. 409-413, 1997.

BRASIL. **Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999.** Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/8080_90.htm Acesso em: 19 set 2011.

BRASIL. 2005. **Lei nº 11.105, de 24 de Março de 2005.** 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. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/lei/L11105.htm Acesso em: 19 set 2011.

BRASIL. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Resolução Normativa nº 5, de 12 de março de 2008. Dispõe sobre normas para liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados e seus derivados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 mar. 2008. Seção 1.

BRASIL. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **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. Disponível em:

<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/55.html?execview=listaitenslegislaca&norma=Resolu%E7%F5es> Acesso em 19 set 2011.

BRASIL. Lei no. 10.711 de 05 de Agosto de 2003. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 ago. 2003. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto 5.153 de 23 de julho de 2004. Aprova o regulamento da Lei no. 10.711, de 05/08/2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 jul. 2004. Seção 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 9, de 02 de junho de 2005. Aprovar as Normas para produção, comercialização e utilização de sementes, e seus respectivos anexos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de jun. 2005. Seção 1, Página 4.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Ciências, Tecnologias e Insumos Estratégicos. **Diretrizes gerais para trabalho em contenção com Agentes Biológicos**. 3ª. ed, Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância Sanitária. **Situação epidemiológica da Febre Amarela e recomendações para intensificar a vigilância no Brasil**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/426-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/febre-amarela/20139-situacao-epidemiologica-da-febre-amarela-e-as-recomendacoes-para-intensificar-a-vigilancia-no-brasil> Acesso em março 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no. 55 de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de Produtos Biológicos Novos e Produtos Biológicos. **Diário Oficial da União**, nº 241, Brasília, DF, 17, dez. 2010b. p. 110.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no. 17 de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 de abr. 2010c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no. 69 de 8 de dezembro de 2014. Regulamento técnico das Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF,

BREYER, D; GOOSSENS, M; HERMAN, P; SNEYERS, M. Biosafety considerations associated with molecular farming in genetically modified plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.3, n.11, p. 825-38, nov. 2009.

BOOTHE, J; NYKIFORUK, C; SHEN, Y; ZAPLACHINSKI, S; SZARKA, S; KUHLMAN, P; MURRAY, E; MORCK, D; MOLONEY, M.M. Seed-based expression systems for plant molecular farming. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 588-606, 2010.

BOYCE THOMPSON INSTITUTE; DOW AGROSCIENCES LLC. Cardineau, G.A. **Vectors and cells for preparing immunoprotective compositions derived from transgenic plants**. US Patent Application 0076177, 2008.

BUONAGURO FM. **Plant-Derived Vaccines**. Technology & Applications. 1a. ed. Londres: Future Medicine, 2011.

Canadian Food Inspection Agency, Plant Biosafety Office. Directive 94-08. Assessment criteria for determining environmental safety of plants with novel traits. 2004. Disponível em: <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/eng/1304475469806/1304475550733>. Acesso em julho 2014.

Canadian Food Inspection Agency. Directive 2000-07. Conducting confined research field trial of plants with novel traits in Canada and its interim amendment for plant molecular farming field trials. 2003. Disponível em: <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-dir2000-07/eng/1304474667559/1304474738697>. Acesso em julho 2014.

CECHINEL FILHO, V; YUNES, R.A., Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade, **Química Nova**; 21; 1, (1998).

CHICHESTER, J.A; YUSIBOV, V. Plants as alternative systems for production of vaccines. **Human Vaccines**, v.3, n.4, p.146-8, jul-ago. 2007.

CLARKE, J. J; REED, T. D.; WILKINSON, C. A. Development of a Greenhouse Tobacco Seedling Performance Index. **Tobacco Science**, p. 49-55, 2001.

COSTA NETO, P.L.O.; FIGUEIREDO, V.F. Implantação do HACCP na indústria de alimentos. **Revista de Gestão e Produção**, v.8, p. 100-11, 2001.

CUMMINGS, J.F.; GUERRERO, M.L.; MOON, J.E.; WATERMAN, P.; NIELSEN, R.K.; JEFFERSON, S.; GROSS, F.L.; HANCOCK, K.; KATZ, J.M.; YUSIBOV, V. Safety and immunogenicity of a plant-produced recombinant monomer hemagglutinin-based influenza vaccine derived from influenza A (H1N1) pdm09 virus: a Phase 1 dose-escalation study in healthy adults. **Vaccine**, v. 32(19), p. 2251-9, 2014.

CUNHA, N.B.; MURAD, A.M.; VIANNA, G. R.; COELHO, C.; RECH, E. L. Expression and characterisation of recombinat molecules in transgenic soybean. **Current Pharmaceutical Design**, v.19, n.31, p.5553-63, 2013.

DECKER, E.L; RESKI, R. Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, n.5, p. 393-98, 2007.

DORAN, P.M. Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. **Trends in Biotechnology**, v.24, n.9, p. 426-32, set. 2006.

DOW AGROSCIENCES Comunicado de imprensa correspondente, 2006. Disponível em:<http://web.archive.org/web/20080123120809/http://www.dowagro.com/animalhealth/resources/firstlic.htm>

DOW AGROSCIENCES Comunicado de imprensa correspondente, 2007. Disponível em DOW AGROSCIENCES Comunicado de imprensa correspondente, 2006.

Disponível em:

<http://www.dowagro.com/animalhealth/resources/news/20070827b.htm>

EDUARDO, M.B.P. **Vigilância Sanitária volume 8**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1998. (Série Saúde & Cidadania)

EGELKROUT, E; RAJAN, V; HOWARD, J.A. Overproduction of recombinant proteins in plants. **Plant Science**, v.184, p. 83-101, 2012.

EVANGELISTA, R.L; KUSNADI, A.R; HOWARD, J.A; NIKOLOV, Z.L. Process and Economic Evaluation of the Extraction and Purification of Recombinant β -Glucuronidase from Transgenic Corn. **Biotechnology Progress**, v.14, n.4, p.607-14, 1998.

FAYE, L; GOMORD, V. Success stories in molecular farming – a brief overview. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 525-28, 2010.

FERREIRA, K.V; ROCHA, K.C; CAPUTTO, L.Z; FONSECA, A.L.A; FONSECA, F.L.A. Histórico da febre amarela no Brasil e a importância da vacinação anti-amarela. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36, n.1, p. 40-47, Jan./Abr. 2011.

FINARDI FILHO F. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **CTNBio: rigor e transparência na avaliação de biossegurança de OGM no Brasil**. [acesso em agosto de 2014]. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/18375.html>

FISHER, R; STOGER, E; SCHILLBERG, S; CHRISTOU, P; TWYMAN, R.M. Plant-based production of biopharmaceuticals. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.152-8, 2004.

FISHER, R; SCHILLBERG, S; HELLWIG, S; TWYMAN, R.M; DROSSARD, J. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 434-9, 2012.

FISHER, R; SCHILLBERG, S; BUYEL, J. F; TWYMAN, R.M. Commercial aspects of pharmaceutical protein production in plants. **Current Pharmaceutical Design**, v.19, n.31, p.5471-77, 2013.

Food and Agriculture Organization, World Health Organization – FAO/WHO. Codex Alimentarius. 2001 Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) System and Guidelines for its Application. Anexx to CAC/RCP 1-1969, rev.3 (1997) Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/> Acesso em 10 de maio de 2014.

Food and Drug Administration (US). Draft Guidance for Industry. Drugs, Biologics, and Medical Devices Derived from Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals. (Rockville); 2002. Disponível em: www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm124811.pdf. Acesso em 10 de maio de 2014.

Food and Drug Administration (US). Hazard Analysis and Critical Control Point Principles and Application Guidelines. 1997. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/HACCP/ucm2006801.htm>. Acesso em 10 de maio de 2014.

Food and Drug Administration (US). CFR - Code of Federal Regulations Title 21. **PART 610 - GENERAL BIOLOGICAL PRODUCTS STANDARDS Sec. 610.11 General safety.** Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=610.11> Acesso em 10 de maio de 2014.

GOMORD, V., FITCHETTE, A. C., MENU-BOUAOUICHE, L., SAINT-JORE-DUPAS, C., PLASSON, C., MICHAUD, D., & FAYE, L. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. **Plant biotechnology journal**, 8(5), 564-587, 2010.

GOODIN, M.M; ZAITLIN, D; NAIDU, R.A; LOMMEL, S.A. *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant–Pathogen Interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, vol. 21, n. 8, p. 1015–1026, 2008.

GRIMM, D. HACCP – Ferramenta para o gerenciamento de risco. Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação. 2002. Disponível em:

<http://www.sbcc.com.br/revistaspdfs/ed%2007/07%20AtualizacaoControle.pdf>.

Acesso em junho de 2014.

GUIMARÃES, R. C; DA SILVA FREIRE, M; DE ALMEIDA, A. E. C. C. Produção de biológicos em plataformas vegetais e seus impactos na segurança alimentar—análise de lacunas na regulação vigente. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 2, n. 4, p. 76-85, 2014.

GUZMÁN, M.G; KOURÍ G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **Int J Infect Dis**, v.8, n.2, p. 69-80, mar. 2004.

HAYES, E.B. Acute viscerotropic disease following vaccination against yellow fever. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.101, n.10, p. 967-71, out. 2007.

HAYES, E.B. Is it time for a new yellow fever vaccine? **Vaccine**, v. 28, n. 51, p. 8073-6, nov. 2010.

HEALTH CANADA. Health Products and Food Branch. Guidance Document. Plant Molecular Farming (PMF) Applications: Plant-derived biologic drugs for human use. **Health Canada – Publications**. Address Locator 0900C2 Ottawa, Ontario, 2014.

HOLTZ, B. R. et al. Commercial-scale biotherapeutics manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals. **Plant biotechnology journal**, v. 13, n. 8, p. 1180-1190, 2015.

HULEBAK, K.L.; SCHLOSSER, W. Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP). History and Conceptual Overview. **Risk analysis**, v.22, n.3, p. 547-552, jun. 2002.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **ICH Q5A(R1)**: Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. Setembro 1999. Disponível em: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> Acesso em setembro de 2014.

_____. **ICH Q5B**: Analysis of the expression construct in cells used for production of r-DNA derived protein products. Novembro 1995. Disponível em: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> Acesso em setembro de 2014.

_____. **ICH Q8(R2)**: Pharmaceutical development. Agosto 2009. Disponível em: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> Acesso em setembro de 2014.

_____. **ICH Q9**: Quality risk management. Novembro 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> Acesso em setembro de 2014

KIRK, D.D; MCINTOSH, K; WALMSLEY, A.M; PETERSON, R.K.D. Risk analysis for plant-made vaccines. **Transgenic Research**, v.14, p.449-62, 2005.

KLIMYUK, V.; POGUE, G.; HERZ, S.; BUTLER, J.; HAYDON, H. Production of recombinant antigens and antibodies in *Nicotiana benthamiana* using 'magniffection' technology: GMP-compliant facilities for small- and large-scale manufacturing. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 375 p. 127-54, 2014.

KUSNADI, A.R; HOOD, E.E; WITCHER, D.R; HOWARD, J.A; NIKOLOV, Z.L. Production and Purification of Two Recombinant Proteins from Transgenic Corn. **Biotechnology Progress**, v. 14, n.1, p. 149-155, 1998.

LAI, H; CHEN, Q. Bioprocessing of plant-derived virus-like particles of Norwalk virus capsid protein under current Good Manufacture Practice regulations. **Plant Cell Rep**, v.31, n.3, p. 573-84, mar. 2012.

LANDRY; N; WARD, B.J; TRÉPANIER, S; MONTOMOLI, E; DARGIS, M. et al. Preclinical and Clinical Development of Plant-Made Virus-Like Particle Vaccine against Avian H5N1 Influenza. **PLoS ONE**, v.5, n.12, e15559. doi:10.1371/journal.pone.0015559, 2010.

LEITMEYER, K. C; VAUGHN, D. W; WATTS, D. M; SALAS, R; VILLALOBOS, I; RAMOS, C; RICO-HESSE, R. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **Journal of Virology**, v.73, p. 4738–47, 1999.

LINDSEY, N.P; SCHROEDER, B.A; MILLER; E.R; BRAUN, M.M; HINCKLEY, A.F; MARANO, N. et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination. **Vaccine**, v. 26, n. 48 p. 6077-82, 2008.

LUSSER, M; PARISI, C; PLAN, D; RODRÍGUEZ-CEREZO, E. New plant breeding techniques – State-of-the-art and prospects for commercial development. **JRC Scientific and Technical Reports** - European Commission, Joint Research Centre (JRC), Institute for Prospective Technological Studies (IPTS) EUR 24760 EN – 2011.

MA, J. K-C; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nat. Rev. Genet**, v. 4, p. 794-805, 2003.

MA, J. K-C; CHRISTOU, P; CHIKWAMBA, R; HAYDON, H; PAUL, M; FERRER, M.P. et al. Realizing the value of plant molecular pharming to benefit the poor in developing countries and emerging economies. **Plant Biotechnology Journal**, v.11, n. 9, p.1029-33, dez. 2013.

METT, V; FARRANCE, C.E; GREEN, B.J; YUSIBOV, V. Plant as biofactories. **Biologicals**, v.36, n.6, p.354-8, nov. 2008.

MONATH, T.P.; CENTRON, M.S.; TEUWEN D.E. Yellow fever vaccine. In: PLOTKIN, S.; ORENSTEIN, W.; OFFIT, P. (Org.). **Vaccines**. 5a ed. Ed. Saunders, 2008. p. 959-1055.

MONATH, T.P; LEE, C.K; JULANDER, J.G; BROWN, A; BEASLEY, D.W; WATTS, D.M; et al. Inactivated yellow fever 17D vaccine: development and nonclinical safety, immunogenicity and protective activity. **Vaccine**, v. 14, n.22, p. 3827-40, maio 2010.

MONATH, T.P. Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses. **Expert Rev. Vaccines**, v. 11, n.4, p. 427-448 2012.

NANDA, S. Regulatory considerations for Plant-based Biologics manufactured in contained facilities. In: USDA ARS 2nd International Biosafety and Biocontainment Symposium, 2013. Alexandria, Virginia, EUA.

PARASURAMAN, A; ZEITHAML, V.A; BERRY, L.L. A conceptual model of service quality and its implications for future research. **Journal of Marketing**, v. 49, p.41-50, 1985.

PARASURAMAN, A; ZEITHAML, V.A; BERRY, L.L. SERVQUAL: a multiple-item scale for measuring consumer perceptions of service quality. **Journal of Retailing**, v.64, n.1, p. 12-40,1988.

PAUL, M; MA, J.K-C. Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 58, n.1, p.58–67, jan/fev. 2011.

PAUL, M. J.; TEH, A.Y.H.; TWYMAN, R. M.; MA, J.K-C. Target product selection – where can molecular pharming make difference? **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n.31, p. 5478-85, 2013.

PHAN, H.T.; FLOSS, D.M.; CONRAD, U. Veterinary vaccines from transgenic plants: highlights of two decades of research and promising example. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n.31, p. 5601-11, 2013.

PILLET, S; et al. A Plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine induces cross-reactive antibody and T Cell response in healthy adults. **Clinical Immunology**, 2016.

PLANET TECHNOLOGY. **Products** um arquivo dos produtos em desenvolvimento está disponível em:

<http://web.archive.org/web/20080531015736/http://www.planetbiotechnology.com/products.html>).

REDIGUIERI, C. F.; DIAS, A. P.; GRADIM, M. M. REGISTRO DE MEDICAMENTOS NOVOS. **A Regulação de Medicamentos no Brasil**, p. 41, 2013.

REPUBLICA DE CUBA. Ministerio de Salud Publica, Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. **Regulación No. 40/2006**. Requisitos químicos - farmacéuticos y biológicos para el registro de productos biofarmacéuticos obtenidos a partir de plantas transgénicas.

REY, F.A; et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, London, v.375, n. 6529, p. 291-298, maio 1995.

ROMANO, A.P.M; RAMOS, D.G; ARAÚJO, F.A.A; SIQUEIRA G.A.M; RIBEIRO, M.P.D; LEAL, S.G; ELKHOURY, A.N.M.S. Febre amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle., **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v.20, n.1, p. 101-106, jan-mar. 2011.

ROY, G; WEISBURG, S; FOY, K; RABINDRAN, S; METT, V; YUSIBOV, V. Co-expression of multiple target proteins in plants from a tobacco mosaic virus vector using a combination of homologous and heterologous subgenomic promoters. **Archives of Virology**, v. 156, n.11, p. 2057-2061, jul. 2011.

SABALZA, M.; VAMVAKA, E.; CHRISTOU, P.; CAPELL, T. Seeds as a production system for molecular pharming applications: status and prospects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n.31, p. 5543-5552, 2013.

SACK, M.; RADEMACHER, T.; SPIEGEL, H.; BOES, A.; HELLWIG, S.; DROSSARD, J.; STÖGER, E.; FISCHER, R. From gene to harvest: insights into upstream process development for the GMP production of a monoclonal antibody in transgenic tobacco plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, p. 1094-1105, 2015.

SAMPIERI, R. H.; COLLADO, C.F.; LUCIO, P. B. **Metodologia de Pesquisa**. 3. Ed, São Paulo: McGraw Hill, 2006.

SCHAAF, A.; TINTELNOT, S.; BAUR, A.; RESKI, R.; GORR, G.; DECKER, E.L. Use of endogenous signal sequences for transient production and efficient secretion by moss (*Physcomitrella patens*) cells. **BCM Biotechnology**, 5:30, 2005.

SCHUSTER, M.; JOST, W.; MUDDE, G.C.; WIEDERKUM, S.; SCHWAGER, C.; JANZEK, E.; ALTMANN, F.; STADLMANN, J.; STEMMER, C.; GORR, G. In vivo glyco-engineered antibody with improved lytic potential produced by an innovative non-mammalian expression system. **Biotechnology Journal**, v.2, p.700-708, 2007.

SHAALTIEL, Y.; BARTFELD, D.; HASHMUELI, S. et al. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 579-90, 2007.

SHAMLOUL, M; et al. Optimization and utilization of Agrobacterium-mediated transient protein production in Nicotiana. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 86, p. e51204-e51204, 2014.

SILVA, E. L; MENEZES, E, M. **Metodologia da pesquisa e elaboração de dissertação**. – 3. ed. rev. atual.– Florianópolis: Laboratório de Ensino a Distância da UFSC, 2001. 121p.

SPARROW, P.; BROER, I.; HOOD, E.E.; EVERSOLE, K.; HARTUNG, F.; SCHIEMANN, J. Risk Assessment and Regulation of Molecular Farming – A Comparison between Europe and US. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n.31, p. 5513-30, 2013.

SPARROW, P.A.C.; IRWIN, J.A.; DALE, P.J.; TWYMAN, R.M.; MA, J.K-C. Pharma-Planta: Road testing the developing regulatory guidelines for plant-made pharmaceuticals. **Transgenic Research**, v.16, n. 2, p. 147-61, abr. 2007.

SPOK, A.; TWYMAN, R.M; FISCHER, R.; MA, J.K-C; SPARROW, P.A.C. Evolution of a regulatory framework for pharmaceuticals derived from genetically modified plants. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 9 p. 506-517, 2008.

The European Parliament and the Council of the European Union. Council Directive 2009/41/EC of 6 May 2009 on the contained use of genetically modified micro-organisms. **Off. J. Eur. Union L** 125, 75-97.

The European Parliament and the Council of the European Union. Council Directive 2001/18/EC of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. **Off. J. Eur. Union L** 106, 1-38.

The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EC) No. 1829/2003 of 22 September 2003 on genetically modified food. **Off. J. Eur. Union L** 268, 1-23.

TAKEYAMA, N.; KIYONO, H.; YUKI, Y. Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials. **Therapeutic advances in vaccines**, p. 2051013615613272, 2015.

TUSÉ, D.; TU, T.; McDONALD, K. A. Manufacturing Economics of Plant-Made Biologics: Case Studies in Therapeutic and Industrial Enzymes. **BioMed Research International**, v. 4, p. 1-16, maio 2014.

TWYMAN, R. M.; STOGER, E.; SCHILLBERG, S.; CHRISTOU, P.; FISCHER, R. Molecular farming in plants: Host systems and expression technology. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 570-78, 2003.

TWYMAN, R. M.; SCHILLBERG, S.; FISCHER, R. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. **Expert Opin. Emerg. Drugs**, v. 10, p. 185-218, 2005.

TWYMAN, R. M.; SCHILLBERG, S.; FISCHER, R. Optimizing the yield of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n.31, p. 5486-94, 2013.

United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Introduction of Genetically Engineered Organisms. Draft Programmatic Environmental Impact Statement [Internet]. (Riverdale); 2007. [Acesso em julho 2014]. Disponível em: www.aphis.usda.gov/brs/pdf/complete_eis.pdf

United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Field-testing of plants engineered to produce pharmaceutical and industrial compounds. Federal Register. 2003 Mar; 7 *CFR Part 340* 68(46): 11337-40. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/brs/fedregister/BRS_20030310a.pdf

United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Introductions of plants genetically engineered to produce industrial compounds (interim

rule) Federal Register. 2003 Aug; 7 *CFR Part 340* 68(151): 46434-36. Disponível em: <http://www.gpo.gov/fdsys/granule/FR-2003-08-06/03-19877>

United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Draft guidance for APHIS permits for field testing or movement of organisms with pharmaceutical or industrial intent. [Internet]. (Riverdale); 2012. [Acesso em julho 2014]. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/brs/pdf/Pharma_Guidance.pdf

United States Department of Agriculture, AMS, Seed Regulatory and Testing Division (SRTD) - (ISTA – International Rules for Seed Testing).

United States Department of Agriculture, AMS, Seed Regulatory and Testing Division (SRTD) -ISTA – International Rules for Seed Testing, Chapter 3: The Purity Analysis.

VAN DER LAAN, J. W., MINOR, P., MAHONEY, R., ARNTZEN, C., SHIN, J., & WOOD, D. WHO informal consultation on scientific basis for regulatory evaluation of candidate human vaccines from plants, Geneva, Switzerland, 24–25 January 2005. *Vaccine*, 24(20), 4271-4278, 2006.

World Health Organization WHO, 2003. **WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations – Thirty-seventh Report**. WHO Technical report series 908 - Annex 7 - Application of Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) method to pharmaceuticals. Geneva: Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_908.pdf. Acesso em Agosto de 2011.

World Health Organization WHO, 2005. **WHO Informal Consultation on Scientific basis for regulatory evaluation of candidate human vaccines from plants**. Disponível em: www.who.int/entity/biologicals/publications/meetings/areas/vaccines/plants/en/. Acesso em Agosto de 2011.

World Health Organization WHO, 2012. Technical Report Series, No. 978. Annex 5 Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated yellow fever vaccines. Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 872 and of the Amendment to that annex in WHO Technical Report Series, No. 964).

World Health Organization WHO, 2010. Technical Report Series, Proposed replacement of TRS 878. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks.

World Health Organization WHO, 2011. **Committee on Biological Standardization**. Technical Report Series, No. 962.

YUSIBOV, V. et al. Plant viral vectors based on tobamoviruses. **Plant Biotechnology**, p. 81-94, 2000.

YUSIBOV, V.; RABINDRAN, S. Recent progress in the development of plant derived vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 7, n. 8, p. 1173-83, 2008.

ZEITLIN, L. et al. Antibody therapeutics for Ebola virus disease. **Current opinion in virology**, v. 17, p. 45-49, 2016.

7. APÊNDICE A - PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE BANCO DE CÉLULAS MESTRE E BANCO DE CÉLULAS DE TRABALHO DE *Agrobacterium tumefaciens* EM BPF.

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

Índice

1.0 Seção de Aprovação Pré-Fabricação	2
2.0 Procedimentos Operacionais Padrão	2
3.0 Garantia da Qualidade	3
4.0 Meio-Ambiente, Saúde & Segurança.....	4
5.0 Equipamentos	5
6.0 Lista de Materiais	7
7.0 Instruções de Processo	10
8.0 Documentação de suporte.....	29
9.0 Índice de Anexos.....	32
10.0 Histórico de revisão do documento	32
11.0 Registro de assinatura de todos os indivíduos que realizaram, verificaram ou revisaram etapas neste protocolo	33
12.0 Comentários	33
13.0 Revisão Completa do Protocolo [Aprovação Pós Execução]	34

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

1.0 Seção de Aprovação Pré-Fabricação

Supervisor de Fabricação - Assinatura	Data
Garantia da Qualidade - Assinatura	Data

2.0 Procedimentos Operacionais Padrão

Recomendação: Neste campo listar TODOS OS POP UTILIZADOS, por exemplo:

POP XX-1	Operação, limpeza e manutenção de Cabine de Segurança Biológica
POP XX-2	Operação e Manutenção de Sistema de descontaminação por peróxido de hidrogênio
POP XX-3	Limpeza das instalações
POP XX-4	Plano Mestre de limpeza
POP XX-5	Operação, limpeza e manutenção de lavadoras de vidrarias
POP XX-6	Operação, limpeza e manutenção de Autoclaves
POP-XX-7	Operação, limpeza e manutenção da espectrofotômetro
POP-XX-8	Operação, limpeza e manutenção do pH Metros / condutividade
POP-XX-9	Procedimento de Purificação de colônias individuais
POP-XX-10	Operação da Centrífuga
POP-XX-11	Controle de cadernos de laboratório e dados
POP-XX-12	Plano Mestre de Controle de mudança
POP-XX-13	Procedimento de Monitoramento Ambiental durante a fabricação e envase de Banco de células Mestre (BM) e Banco de células de trabalho (BT)
POP-XX-14	Pureza e Morfologia das colônias de culturas microbianas e dos estoques em glicerol
POP-XX-15	Identidade de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e dos estoques em glicerol
POP-XX-16	Gravação de dados originais
POP-XX-17	Práticas de vestimenta
POP-XX-18	Desenvolvimento, emissão, execução e aprovação de protocolos de produção de lote
POP-XX-19	Criação, controle e alteração de documentos
POP-XX-20	Gravação de Dados, Gestão de Cálculo e Especificações

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

3.0 Garantia da Qualidade

3.1 Requerimentos de vestimenta

3.1.1 Os requerimentos de vestimenta estão descritos no POP-XX.

3.2 Desvios

3.2.1 Referência POP-XX para instruções de como proceder em identificar e gerenciar desvios da Qualidade

3.3 Desenvolvimento, emissão, execução e aprovação de protocolos de produção de lote

3.3.1 Referência POP-XX para ações relacionadas a protocolos de produção de lotes. Essas ações são identificadas como: (1) desenvolvimento, (2) emissão, (3) execução, (4) aprovação, (5) treinamento, (6) revisão, e (7) tempo de retenção do documento.

3.4 Gravação de dados originais

3.4.1 Referência POP-XX para instruções de: (1) o que são considerados dados originais, (2) como gravar dados originais, e (3) tópicos relacionados com a gravação de dados originais.

3.5 Criação, controle e alteração de documentos

3.5.1 Referência POP-XX para instruções de criação, revisão, aprovação, preenchimento, distribuição e arquivamento de documentos controlados pela GQ.

3.6 Gravação de Dados, Gestão de Cálculo e Especificações

3.6.1 Referência POP-XX para instruções de: (1) realização de cálculos, (2) gravação de dados/liberação de resultados, e (3) determinação se a amostra sob teste está em conformidade com os critérios de aceitação.

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

4.0 Meio-Ambiente, Saúde & Segurança

- 4.1 Todas as políticas de Meio-Ambiente, saúde e segurança devem ser seguidas.
- 4.2 Cumprir qualquer instrução neste documento para etapas adicionais de MAS & S específicas para a tarefa a ser completada por este documento.
- 4.3 Quaisquer produtos químicos, reagentes e soluções utilizados neste documento podem ser perigosos. Referência a folha de material de segurança de dados (MSDS) ou as fichas de dados de segurança (FDS) para obter informações referentes a, mas não se limitando a, os seguintes: (1) Os requisitos mínimos de equipamento de proteção pessoal, (2) medidas de primeiros socorros, (3) práticas de manipulação de material e (4) requisitos de descarte.
- 4.4 Quaisquer produtos químicos, reagentes e soluções devem ser rotulados com informações: (1) as iniciais do operador, (2) data de preparação (3) nome da solução, e (4) riscos associados com a solução.

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

5.0 Equipamentos

Descrição	Número de ID	Data de Calibração	Realizado por / data	Verificado por / data
Cabine de segurança biológica				
Centrífuga de bancada				
Balança, 120 g				
Balança, 4100 g				
Incubadora tipo Shaker				
Autoclave				
Espectrofotômetro				
pHmetro/Condutivímetro				
Lavadora de vidraria				
Proveta de vidro autoclavável graduada de 100 mL	N/A	N/A		
Proveta de vidro autoclavável graduada de 250 mL.	N/A	N/A		
Proveta de vidro autoclavável graduada de	N/A	N/A		

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR	
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX		No. Documento	

Descrição	Número de ID	Data de Calibração	Realizado por / data	Verificado por / data
2 L.				
Balão de vidro com tampa autolavável de 250 mL	N/A	N/A		
Balão de vidro com tampa autolavável de 500 mL	N/A	N/A		
Bequer autoclavável 2 L	N/A	N/A		
Pipeta Eppendorf autoclavável, 1 mL				
Bomba para pipeta	N/A	N/A		

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

6.0 Lista de Materiais

Descrição	Quantidade	No. Lote interno	No. Lote Fornecedor	Data de validade	Realizado por / data	Verificado por / data
Banco de célula de pesquisa (RCB)	2 x 1 mL			N/A		
Glicerol, grau USP	60 mL					
Cloreto de sódio (NaCl), grau USP	12 g					
DMSO (dimethylsulfoxide), grau USP	5 mL					
Rifampicina, grau para HPLC	300 mg					
Sulfato de Canamicina, grau USP	300 mg					
Extrato de levedura	12 g					
Hidrolisado de soja	23 g					
Frascos criogênicos estéreis de 2 mL	120					
Frasco Erlenmeyer descartável com tampa de fecho ventilada, 2 L	2					

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

Descrição	Quantidade	No. Lote interno	No. Lote Fornecedor	Data de validade	Realizado por / data	Verificado por / data
Filtro de disco Nalgene 0.22 µm, hidrofílico	2					
Tubode centrífuga estéril, 250 mL	8					
Cubeta descartável	10					
Estantes para tubos	2	N/A	N/A	N/A		
Tubo de ensaio cônico estéril, 15 mL	10					
Luvas estéreis	1 caixa					
Mangas estéreis	1 caixa					
Máscaras estéreis	1 caixa					
Espátulas	10	N/A	N/A	N/A		
Seringa descartável estéril, 30 mL	2					
Alças de inoculação	20					
Ponteiras estéreis, 1 mL	1 caixa					

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR	
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento		

Descrição	Quantidade	No. Lote interno	No. Lote Fornecedor	Data de validade	Realizado por / data	Verificado por / data
Placas de agar de soja tríptico (TSA)	10					
Garrafas de álcool isopropílico (IPA) 70%, Estéril, grau USP	2					
Pipeta descartável estéril, 5 mL	5					
Pipeta descartável estéril, 25 mL	2					
Parafilme	1 caixa	N/A	N/A	N/A		

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

7.0 Instruções de Processo

NOTA 1

Executar todas as transferências de cultura ou adições na cabine de segurança biológica classe A usando técnicas assépticas (que inclui o uso de luvas estéreis e mangas estéreis). Durante o processamento do lote, novas luvas estéreis e novas mangas estéreis são necessárias se o operador remover suas mãos da cabine de segurança biológica.

NOTA 2

Preencha todas as informações necessárias nos *logbooks* para todos os equipamentos utilizados neste procedimento conforme instruções fornecidas em POPXXX.

NOTA 3

Todas as etapas, incluindo pesagem de produtos químicos devem ter um registro impresso de pesagem correspondente. Todas as impressões de pesagem devem ser rotuladas com o item que está sendo pesado e coladas no protocolo de produção de lotes. Entre cada produto químico que está sendo pesado para, uma tara da balança é necessária. Este valor de tara também deve ser impresso. Todos os registros impressos de pesagem devem incluir o número da etapa associada, data e rubrica do operador.

NOTA 4

A sala limpa é higienizada utilizando peróxido de hidrogênio vaporizado conforme POPXXX. O plano mestre de limpeza (PMLXXX) e POP de limpeza da instalação (POP-XXX) devem estar disponíveis na área. Requisitos de limpeza específicos para cada equipamentos estão descritos nos procedimentos operacionais padrão de cada equipamento. O plano mestre de troca de produto fornece a filosofia por trás da abordagem de limpeza (PMP-XXX) e um POP para limpeza de linha é usado pela Qualidade antes de fabricar um tipo de produto diferente.

NOTA 5

A sala limpa e a cabine de segurança biológica são monitoradas pelo Programa de Monitoramento Ambiental (PMA-XXX).

NOTA6

Todos os reagentes autoclavados deve ser utilizado no prazo de dois dias de autoclavagem.

NOTA 7

Todas as etapas deste documento devem a ser realizadas em compatibilidade com as Boas Práticas de Fabricação correntes (BPF).

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

7.1 Operações preliminares

- 7.1.1 Verificar se todas as vidrarias e utensílios não descartáveis foram lavados conforme as instruções do POP-XXX e que o tempo máximo de após lavagem não ultrapassou catorze (14) dias. Anexar a impressão da lavadora de vidraria na seção 8.1.

Data que os itens foram lavados: _____

_____ Realizado por / Data

- 7.1.2 Verificar se todas as vidrarias e utensílios não descartáveis foram autoclavados conforme as instruções do POP-XXX. Anexar a impressão da autoclave na seção 8.2.

Data que os itens foram autoclavados: _____

_____ Realizado por / Data

- 7.1.3 Preencher e enviar o formulário XXX para o departamento de CQ solicitando os dois frascos de RCB de interesse. Anexar o formulário ao Protocolo de produção do lote.

Data de submissão: _____

_____ Realizado por / Data

- 7.1.4 Anexar: (1) Certificado de análise do Banco de células de Pesquisa, (2) ID bacteriana do Banco de Células de Pesquisa, (3) Histórico da cepa do Banco de Células de Pesquisa, (4) Alinhamento da sequência alvo de DNA do Banco de Células de Pesquisa, e (5) Análise da Expressão do Banco de Células de Pesquisa ao Protocolo de produção do lote.

_____ Realizado por / Data

- 7.1.5 Preencher e enviar o formulário XXX para o departamento de CQ solicitando o número requerido de etiquetas (POP-XXX) para a produção do Banco de Células Mestre. Anexar o formulário ao Protocolo de produção do lote.

- 7.1.6

Data de submissão: _____

_____ Realizado por / Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

7.2 Preparo de Meios e Soluções

7.2.1 Preparo de Glicerol

Medir 60 mL de glicerol usando uma proveta graduada de 100 mL e transferir para um frasco de vidro de 250 mL com tampa. Fechar o frasco sem apertar. Etiquetar como Glicerol, com No. Lote, nome operador, data e autoclavar conforme POP-XXX. Anexar registro da autoclavação na seção 8.2.

Volume de glicerol: _____ mL

_____ Realizado por/Data

_____ Verificado por/Data

7.2.2 Preparo de 200 mL de meio rico (SYS) hidrolisado de soja, extrato de levedura e cloreto de sódio para ressuspensão de células.

Usar um frasco de vidro de 0,5 L para preparar o meio. Registrar a quantidade de cada componente na tabela abaixo. Tampar o frasco e dissolver os reagentes em água purificada (PW) gentilmente agitando com as mãos. Rotular e autoclavar o meio conforme POP-XXX. Anexar o registro da esterilização na seção 8.2 e o registro da balança na seção 8.3.

Reagente	Quantidade requerida (g)	Quantidade pesada (g)	Realizado por/Data	Verificado por /Data
NaCl	1,0 (0,95-1,05)			
Extrato de levedura	1,0 (0,95-1,05)			
Hidrolisado de soja	2,0 (1,95-2,05)			
Água purificada (PW)	200,0 (199,9-200,1)			

_____ Realizado por / Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

7.2.3 Preparo de meio rico SYS para dois Frascos Erlenmeyers

7.2.3.1 Preparo do Frasco #1

Preparar o meio usando um Erlenmeyer de 2 L #1. Pesar os componentes e dissolve-los em água purificada (PW) gentilmente agitando o frasco com as mãos. Registrar a quantidade de cada componente na tabela abaixo. Anexar o registro da balança na seção 8.3. Rotular o frasco Erlenmeyer como Frasco#1.

Reagente	Quantidade requerida (g)	Quantidade pesada (g)	Realizado por/Data	Verificado por /Data
NaCl	5,0 (4,95-5,05)			
Extrato de levedura	5,0 (4,95-5,05)			
Hidrolisado de soja	10.0 (9,95-10,05)			
Água purificada (PW)	1000,0 (999,9-1000,1)			

Realizado por / Data

7.2.3.2 Preparo do Frasco #2

Repetir a etapa 7.2.3.1 para o frasco #2. Rotular o frasco #, registrar as informações abaixo, e anexar o registro da balança na seção 8.3

Reagente	Quantidade requerida (g)	Quantidade pesada (g)	Realizado por/Data	Verificado por /Data
NaCl	5,0 (4,95-5,05)			
Extrato de levedura	5,0 (4,95-5,05)			
Hidrolisado de soja	10.0 (9,95-10,05)			
Água purificada (PW)	1000,0 (999,9-1000,1)			

Realizado por/Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

7.2.3.3 Calibrar o pHmetro /condutivímetro conforme POP-XXX. Medir e registrar o pH do meio SYS de ambos os frascos.

Frasco #1:
pH _____ (7,00 ± 0,20)

Frasco #2:
pH _____ (7,00 ± 0,20)

Se o pH não estiver dentro da faixa especificada, informar o supervisor para ajustar o pH para o intervalo necessário para ambos os frascos de agitação.

Realizado por/Data

Verificado por/Data

7.2.3.4 Autoclavar os frascos conforme POP-XXX. Anexar registro de esterilização do meio na seção 8.2.

Realizado por / Data

7.2.4 Preparo do meio com glicerol

Permitir que o meio rico SYS preparado na etapa 7.2.2 e o glicerol preparado na etapa **Erro! Fonte de referência não encontrada.** esfriem após a esterilização. Usando um proveta graduada estéril de 100 mL, assepticamente transferir 50 mL do glicerol preparado na etapa **Erro! Fonte de referência não encontrada.** para o meio SYS da etapa 7.2.2 na cabine de segurança biológica. Misturar a solução, gentilmente agitando o frasco com a mão e então fechar o frasco. Rotular o frasco com "Meio com Glicerol".

Quantidade de glicerol adicionada: _____ mL

Realizado por/Data

Verificado por/Data

7.2.5 Preparo de Solução estoque de Canamicina 50 mg/mL

Registrar a pureza do sulfato de canamicina e calcular a quantidade de sulfato de canamicina necessária para 5 mL de uma solução estoque de 50 mg / mL:

5 mL x 50 mg/mL ÷ Pureza: _____ % x 100

= Quantidade de sólidos de sulfato de canamicina: _____ mg
(Registrar com XXX)

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

Realizado por/Data

Verificado por/Data

- 7.2.6 Usar uma pipeta descartável de 5 mL para adicionar a quantidade de água purificada requerida em um tubo de 15 mL e então adicionar os sólidos de sulfato de canamicina pesados. Fechar a tampa do tubo e agitar até a completa dissolução do sulfato de canamicina. Filtrar a solução para um outro tubo de 15 mL dentro da cabine de segurança biológica, usando uma membrana filtrante estéril de 0,22 µm e uma seringa. Rotular a solução filtrada de canamicina. Imprimir os registros da balança e anexar na seção **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

Reagente	Quantidade requerida (g)	Quantidade pesada (g) ou medida	Realizado por/Data	Verificado por /Data
Sulfato de canamicina	(± 5 mg)			
Água purificada (PW)	5 mL			

Realizado por /Data

- 7.2.7 Preparo de Solução estoque de Rifampicina 25 mg/mL

Registrar a pureza da Rifampicina e calcular a quantidade de Rifampicina necessária para 4 mL de uma solução estoque de 25 mg/mL:

$$4 \text{ mL} \times 25 \text{ mg/mL} \div \text{Pureza: } \underline{\hspace{2cm}} \% \times 100$$

$$= \text{Quantidade de sólidos de Rifampicina: } \underline{\hspace{2cm}} \text{ mg}$$

(Registrar com XXX)

- 7.2.8 Usar uma pipeta descartável de 5 mL para adicionar a quantidade de DMSO para um tubo de 15 mL e então adicionar os sólidos de Rifampicina pesados. Fechar a tampa do tubo e agitar até a completa dissolução da Rifampicina. Rotular a solução de Rifampicina. Imprimir os registros da balança e anexar na seção **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX		No. Documento

Reagente	Quantidade requerida (g)	Quantidade pesada (g) ou medida	Realizado por/Data	Verificado por /Data
Rifampicina	(± 5 mg)			
DMSO	4 mL			

Realizado por/Data

7.3 Preparo do Banco de Células

7.3.1 Desinfetar a cabine de segurança biológica conforme POP-XXX. Limpar os itens abaixo com IPA 70% estéril e colocá-los na cabine de segurança biológica:

- Alças de inoculação
- Dois frascos Erlenmeyer autoclavados de 2 L contendo meio rico SYS
- Tubos de ensaio cônicos estéreis de 15 mL
- Caneta marcadora preta
- Cubetas para espectrofômetro
- Pipeta Eppendorf de 1 mL
- Pipetas descartáveis estéreis de 5 mL
- Pipetas descartáveis estéreis de 25 mL
- Ponteiras estéreis de 1 mL
- 3 placas de petri com meio TSA
- 5 mL da solução estoque de Canamicina filtrada
- 4 mL da solução estoque de Rifampicina

Realizado por/Data

7.3.2 Assepticamente abrir os dois frascos de 2 L contendo o meio de cultura esterilizado e já resfriado. Usar a pipeta Eppendorf para transferir 1 mL da solução filtrada estoque de Canamicina 50 mg/mL preparada na etapa 7.2.6 para cada frasco de meio de cultura, e transferir 1 mL da solução estoque de Rifampicina 25 mg/mL preparada na etapa 7.2.87.2.7 para cada frasco de meio.

Quantidade de solução estoque filtrada de Canamicina adicionada a:

Frasco Erlenmeyer 1: _____ mL

Frasco Erlenmeyer 2: _____ mL

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

Quantidade de solução estoque de Rifampicina adicionada a:

Frasco Erlenmeyer 1: _____ mL

Frasco Erlenmeyer 2: _____ mL

Realizado por/Data

Verificado por/Data

- 7.3.3 Misturar gentilmente os frascos com a mão. Usar a pipeta descartável de 25 mL para transferir 15 mL do meio de um frasco para um tubo de ensaio cônico estéril para ser usado como amostra de referência. Rotular o meio no tubo como "Amostra de meio de cultura contendo antibióticos".

Realizado por /Data

- 7.3.4 Remover os dois frascos de RCB do freezer na sala de fermentação. Limpar a superfície dos tubos com álcool 70% estéril e colocá-los na CSB. Descongelar os frascos de RCB e utilizar um frasco para estriar duas placas de petri contendo meio TSA conforme o POP-XXX. Uma placa TSA deve ser usada como controle negativo. Usar parafilme para selar as placas. Submeter as três placas ao Controle de Qualidade para a verificação de pureza e morfologia das colônias conforme POP-XXX. Rotular as duas placas estriadas como "Pureza e Morfologia da colônia" e a outra placa como "Controle".

Realizado por /Data

- 7.3.4.1 Quando os dados de pureza e morfologia do CQ estiverem disponíveis, registrar os resultados de acordo com instruções fornecidas no POP-XXX. Verificar o resultado do teste CQ abaixo e anexar os impressos e a folha de resultados neste protocolo.

Passou: _____ (Sim) _____ (Não)

Registrado por /Data

- 7.3.5 Transferir 1 mL do RCB (frasco inteiro) para cada um dos frascos Erlenmeyer usando um pipeta Eppendorf e uma ponteira estéril. Tampar os Erlens com tampas de fecho ventiladas. Rotular os Erlens com a identidade da cultura conforme o rótulo do frasco do lote semente de pesquisa. Informar inicial do operador e data.

Realizado por /Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

- 7.3.6 Remover a etiqueta do frasco do RCB e anexar aqui neste Documento abaixo a informação da etiqueta caso não seja possível removê-la ou se rasgar.

Anexar a etiqueta aqui

Realizado por /Data

- 7.3.7 Ligar o espectrofotômetro no mínimo 30 min antes do uso para realizar as medidas de densidade celular. O POP-XXX deve ser usado como instrução de uso do equipamento.

Realizado por /Data

- 7.3.8 Usar uma pipeta descartável estéril de 5 mL para tirar uma alíquota de 1 mL do meio inoculado de cada Erlenmeyer para as medidas de densidade celular da cultura inicial. Tampar os frascos.

Realizado por /Data

- 7.3.9 Remover os frascos Erlenmeyer da cabine de segurança biológica e colocá-los na incubadora por agitação, que foi ajustada para $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Ajusta a velocidade de agitação para 225 ± 25 rpm. Registrar as seguintes informações de incubação:

Temperatura de incubação: _____ °C

Velocidade de agitação: _____ rpm

Hora de início: _____

Realizado por/Data

Verificado por/Data

- 7.3.10 Usar a “Amostra de Meio Contendo Antibiótico” obtida na etapa 7.3.3 como referência zero e a amostra inoculada obtida na etapa 7.3.8 para o valor de DO inicial. Registrar os resultados nas tabelas da etapa 7.3.13.

Realizado por /Data

- 7.3.11 No dia 2, se informar e verificar os dados do CQ de Monitoramento Ambiental (MA) antes de envasar os frascos.

Realizado por /Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

7.3.12 Após os resultados de MA estarem disponíveis pelo CQ anexar neste protocolo.

Realizado por /Data

7.3.13 Retirar amostras levando os frascos para a cabine de segurança biológica após aproximadamente 12 horas de inoculação de forma a atingir o seguinte valor de DO₆₀₀ (ou A₆₀₀):

Valor A₆₀₀ = 1.0 (faixa de 0,5 – 1,5)

Continuar a amostragem em múltiplos pontos temporais durante o período de incubação do frasco e registrar os valores nas tabelas a seguir. Usar o meio no tubo de ensaio de 15 mL da etapa 7.3.3 para obter uma cubeta de referência, se necessário. Anexar as impressões de DO abaixo:

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR	
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX		No. Documento	

Resultados de DO para o frasco #1

Data	Hora	Tempo de cultivo	A ₆₀₀ leitura	Fator de diluição	A ₆₀₀ Calculada	Realizado por /Data	Verificado por / Data

Realizado por /Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR	
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX		No. Documento	

Resultados de DO para o frasco #2

Data	Hora	Tempo de cultivo	A ₆₀₀ leitura	Fator de diluição	A ₆₀₀ Calculada	Realizado por /Data	Verificado por / Data

Realizado por /Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

7.3.14 Enquanto a cultura de *Agrobacterium* está crescendo, eliminar todos os materiais usados da cabine de segurança biológica. Limpar o interior da cabine de segurança biológica com IPA 70% estéril. Limpar os seguintes itens com IPA 70% estéril, e em seguida, colocá-los na cabine de segurança biológica. Verificar e garantir que todos os itens necessários estejam limpos e disponíveis.

- 1 bomba para pipeta
- Pipeta Eppendorf de 1 mL
- 3 tubos de ensaio cônicos de 15 mL

- 1 estante para tubos

- Bequer de 2 L autoclavado

- Ponteiras estéreis de 1 mL

- Pipetas estéreis descartáveis de 5 mL e 25 mL

- 6 placas de petri com meio TSA

- Alças de inoculação
- Uma frasco de vidro limpo e autoclavado de 250 mL

- Provetas graduadas autoclavadas de 2 L e 250 mL

- Um frasco de 500 mL contendo 250 mL de meio com glicerol

- 8 tubos de centrifuga descartáveis.

_____ /Data

7.3.15 Ligar a centrifuga refrigerada e ajustar a temperatura para 4°C e certificar-se que a temperatura alvo seja atingida antes da utilização.

_____ /Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

- 7.3.16 Quando a A_{600} de ambas as culturas atingir o valor de 1,0 (variação de 0,5 – 1,5), remover os frascos Erlenmeyer da incubadora. Limpar a superfície exterior com IPA 70% estéril antes de colocar os frascos na cabine de segurança biológica.

_____ /
Realizado por /Data

- 7.3.17 Registrar a hora final do cultivo de agrobactéria e calcular o tempo total de cultivo tomando como base a hora inicial documentada na etapa 0:

Hora final de cultivo: _____ hrs

Tempo total de cultivo: _____ hrs _____ min

_____ /
Realizado por/ Data Verificado por /Data

- 7.3.18 O tempo total de cultivo está entre 12 – 24 horas?

_____ (Sim) _____ (Não)

Contactar o supervisor se for “Não”.

_____ /
Realizado por/ Data Verificado por /Data

- 7.3.19 Misturar o cultivo dos dois frascos Erlenmeyer transferindo o cultivo de um frasco para o outro. Misturar delicadamente com as mãos.

_____ /
Realizado por /Data

- 7.3.20 Retirar uma amostra do cultivo misturado para medir a DO. Repetir a medição três (3) vezes. Calcular a média da leitura de A_{600} final.

(A1: _____ +A2: _____ +A3: _____) x _____ ÷ 3
Fator de diluição

= Média A_{600} : _____
(Registrar com X, XX)

Anexar abaixo a impressão do resultado de DO:

_____ /
Realizado por/ Data Verificado por /Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

7.3.21 Transferir 2 mL do cultivo de agrobactéria para um tubo de ensaio cônico de 15 mL, usando uma pipeta descartável estéril de 5. Estriar 4 placas de petri contendo meio TSA com o cultivo de agrobactéria conforme instrução do POP-XXX. Usar uma placa TSA como controle negativo. Rotular duas placas como “Ensaio de identidade”, duas placas como “Pureza e morfologia da colônia”, e uma placa como “Controle negativo”. Submeter todas as placas para o CQ.

_____ /
Realizado por /Data

7.3.21.1 Quando os dados do CQ estiverem disponíveis, registrar os resultados do ensaio de identidade (etapa 7.3.21) conforme POP-XXX. Anexar a folha de resultados neste protocolo

Passou: _____ (Sim) _____ (Não)

_____ /
Registrado por/Data

7.3.21.2 Registrar os resultados de Pureza e morfologia da colônia (etapa 7.3.21) conforme POP-XXX. Anexar a folha de resultados neste protocolo

Passou: _____ (Sim) _____ (Não)

_____ /
Registrado por/Data

7.3.22 Transferir o cultivo de agrobactéria provenientes dos dois Erlenmeyers para uma proveta graduada estéril de 2 L. Medir o volume na proveta e calcular o volume a ser adicionado em cada um dos 8 tubos de centrifuga:

Volume total de cultivo: _____ mL ÷ 8

= Volume para cada tubo de centrifuga: _____ mL
(Registrar com XXX)

_____ /
Realizado por/ Data _____ /
Verificado por /Data

7.3.23 Registrar o volume real de cada tubo (Nota: O volume não deve ser maior do que o volume calculado).

Volume real em cada tubo de centrifuga: _____ mL

_____ /
Realizado por/ Data _____ /
Verificado por /Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

7.3.24 Uniformemente transferir todo o conteúdo da proveta graduada de 2 L em cada um dos oito tubos de centrifuga descartáveis de 250 mL. Centrifugar 4 tubos de cada vez em 4000 ± 500 rpm durante 15 min a 4°C ($2-8^\circ\text{C}$) de acordo com instruções fornecidas no POP-XXX. Após a cultura ser centrifugada, remover os tubos de centrifuga da centrífuga e limpar a superfície exterior com IPA 70% estéril. Decantar o sobrenadante do tubo de centrifuga para um béquer autoclavado de 2 L dentro da cabine de segurança biológica.

Ciclo de centrifugação 1:

Velocidade da centrífuga: _____ rpm

Tempo de centrifugação: _____

Temperatura da centrífuga: _____ °C

Ciclo de centrifugação 2:

Velocidade da centrífuga: _____ rpm

Tempo de centrifugação: _____

Temperatura da centrífuga: _____ °C

Realizado por/ Data

Verificado por /Data

7.3.25 Retirar uma amostra do sobrenadante do béquer de 2 L e medir A_{600} e anexar o resultado abaixo:

A_{600} do sobrenadante: _____ x Fator de diluição: _____

= A_{600} : _____

Realizado por/ Data

Verificado por /Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

- 7.3.26 Calcular o volume final de ressuspensão do cultivo em cada tudo da seguinte forma, para poder alcançar o valor alvo de DO (A_{600}) de 10:

[A_{600} da amostra (Etapa 7.3.20): _____

— A_{600} do sobrenadante (Etapa 7.3.25): _____]

x Volume de cultivo em cada tubo (Etapa 7.3.23):

_____ mL ÷ 10 (valor alvo A_{600})

= Volume final de ressuspensão do cultivo: _____ mL
(Registrar com XX)

Realizado por/ Data

Verificado por /Data

- 7.3.27 Usar uma pipeta de 25 mL descartável e estéril para transferir a quantidade de meio rico SYS contendo glicerol (preparado na etapa **Erro! Fonte de referência não encontrada.**) calculado na etapa 7.3.26 para cada um dos 8 tubos de centrífuga

Quantidade real de meio contendo glicerol transferido para cada tubo de centrífuga:

_____ mL (± 2 mL)

Realizado por/ Data

Verificado por /Data

- 7.3.28 Tampar os tubos. Ressuspender o pellet por agitação suave e/ou por aspiração com uma pipeta descartável estéril de 25 mL. Continuar ressuspendendo até que o pellet não seja mais visível. Depois que o pellet for ressuspensão, transferir o conteúdo de cada tubo de centrífuga para um frasco de vidro estéril de 250 mL.

Realizado por/ Data

- 7.3.29 Usar uma pipeta Eppendorf para transferir uma amostra de 0.5 mL do frasco de 250 mL para um tubo de ensaio cônico de 15 mL. Fazer as diluições requeridas até que a leitura de DO seja menor que 1,0 usando para a diluição o meio de cultura preparado na etapa 7.3.3. Registrar o valor e anexar o impresso da leitura de DO abaixo.

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

A₆₀₀ do cultivo diluído ressuspenso: _____

x Fator dediluição: _____

= A₆₀₀ do cultivo ressuspenso: _____

A A₆₀₀ do cultivo deve ser > 5.0. Notificar o supervisor se a especificação não for alcançada.

Realizado por/ Data

Verificado por /Data

- 7.3.30 Remover todos os equipamentos e materiais desnecessários da cabine de segurança biológica. Limpar toda a superfície da cabine de segurança biológica com IPA 70% estéril. Descartar: (1) o segundo par de luvas (reter o primeiro par, que está abaixo das luvas estéreis) e (2) mangas estéreis. Vestir novas luvas estéreis e novas mangas. Borrifar as luvas com IPA 70% estéril. Abrir o saco de criotubos, afrouxar as tampas e colocar os criotubos em uma estante. Destampar o frasco que contém a cultura de agrobactéria com glicerol (Etapa 7.3.2828). Usar uma pipeta para transferir 1 mL da cultura de agrobactéria para um tubo de ensaio cônico de 5 mL, rotular e estocar este tubo em um freezer a -80°C freezer como uma amostra de retenção:

Nome da amostra

Lote #

Inicial do operador

Data

Realizado por /Data

- 7.3.31 Asepticamente pipetar 1 mL do cultivo que está no frasco de 250 mL para um criotubo de 2 mL. Repetir até que todo o volume do cultivo esteja envasado. Fechar as tampas dos criotubos. Fixar uma etiqueta da etapa 7.1.5 em cada criotubo e anexar uma etiqueta abaixo neste protocolo. Encaminhar os criotubos para serem estocados em um freezer a -80 °C, no CQ e anexar o formulário a este protocolo.

Número de criotubos envasados: _____

Anexar etiqueta aqui

Realizado por/ Data

Verificado por /Data

- 7.3.32 Verificar se o CQ realizou o monitoramento ambiental durante o envase dos criotubos.

Realizado por /Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

7.3.33 Após liberação dos dados de MA pelo CQ, anexar os resultados neste protocolo.

_____ /Realizado por/ Data

7.3.34 Calcular o quantitativo de etiquetas:

Número total de etiquetas requeridas da Qualidade: _____

Número de tubos etiquetados: _____

+ Número de etiquetas que não foram usadas: _____

+ Número de etiquetas coladas no protocolo: _____

+ Número de etiquetas restantes: _____

= Número total de etiquetas calculado: _____

_____ /Realizado por/ Data

_____ /Verificado por/ Data

7.3.35 O valor total calculado acima é igual ao valor total de etiquetas obtidas da Qualidade?

_____ (Sim) _____ (Não)

Contactar o supervisor se a resposta for "Não". Retornar todas as etiquetas não utilizadas para a Qualidade.

_____ /Realizado por/ Data

_____ /Verificado por/ Data

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

8.0 Documentação de suporte

- 8.1 Anexar as fitas da lavadora de vidraria nesta página (conforme instrução do POP-XXX). Documentar o número do lote, iniciais do operador e data.

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

	PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR	
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

8.2 Anexar as fitas da autoclave nesta página (conforme instrução do POP-XXX). Documentar o número do lote, iniciais do operador e data.

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

	PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR	
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

8.3 Anexar as fitas da balança nesta página (conforme instrução do POP-XXX). Documentar o número do lote, iniciais do operador e data.

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

9.0 Índice de Anexos

Anexo Número	Descrição
1	Certificado de Análise do Banco de Células de Pesquisa
2	ID bacteriana do Banco de Células de Pesquisa
3	Histórico da cepa do Banco de Células de Pesquisa
4	Alinhamento de sequência do DNA do Banco de Células de Pesquisa
5	Análise de expressão do Banco de Células de Pesquisa
6	Formulários do Controle de Qualidade CQ
7	Formulários de Monitoramento Ambiental

10.0 Histórico de revisão do documento

REV	DATA	RESUMO DA MUDANÇA
RASCUNHO		Novo Documento

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

11.0 Registro de assinatura de todos os indivíduos que realizaram, verificaram ou revisaram etapas neste protocolo

Nome por extenso	Assinatura	Rubrica

12.0 Comentários

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

		PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE LOTE (MODELO PROPOSTO)	LOGOTIPO DO PRODUTOR
Título do Documento	Produção de Banco de Células Mestre de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Proteína / Vacina XX	No. Documento	

13.0 Revisão Completa do Protocolo [Aprovação Pós Execução]

A equipe de Fabricação confirma que todas as etapas de processamento foram executados por ordem de itens neste protocolo (e documentos associados) e se foram observados desvios, todas os desvios foram relatados de forma adequada.

Assinatura do supervisor de Fabricação: _____ Data: _____

Qualidade confirma que todas as etapas de processamento e de teste foram plenamente atendidas; Se não foi observado o cumprimento integral, a Qualidade confirma que todas os desvios foram relatados de forma adequada. Qualidade também confirma que toda a documentação de apoio associada a este protocolo de fabricação está em conformidade com os sistemas de Garantia da Qualidade.

Assinatura do representante da Qualidade: _____ Data: _____

Assinatura da GQ:	Número do Lote:
Descrição da campanha:	

**8. APENDICE B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA VIGILÂNCIA SANITÁRIA
EM DEBATE**

Produção de biológicos em plataformas vegetais e seus impactos na segurança alimentar – análise de lacunas na regulação vigente

Plant-made pharmaceuticals and their impact on food security – gap analysis of the current regulations

Rosane Cuber Guimarães^{1,*}

Marcos da Silva Freire¹

Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida^{II}

RESUMO

O uso de plantas geneticamente modificadas (GM) para sintetizar proteínas que são posteriormente processadas, reguladas e vendidas como medicamentos já é uma realidade mundial. No entanto, a questão do desenvolvimento tecnológico e a produção industrial de produtos biológicos sendo expressos em plantas transgênicas e seu impacto na segurança da cadeia alimentar necessitam ser discutidas mais profundamente. Neste artigo, foi realizada uma extensa revisão bibliográfica nas normas e diretrizes regulatórias e de biossegurança do Brasil que tratam da produção de biológicos em plataformas vegetais, foi feita uma comparação com a regulação de outros países como Estados Unidos, Canadá, União Europeia, Cuba e Argentina e uma análise das lacunas existentes na regulação brasileira. Sugerimos que algumas regulações sejam revisadas e concluímos que as entidades regulatórias brasileiras devem estabelecer um arcabouço regulatório conjunto e interrelacionado que permita a produção industrial mantendo, todavia, a proteção à saúde humana e animal e a proteção ao meio ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas Geneticamente Modificadas; Plantas Produtoras de Biológicos; Segurança Alimentar; Regulação; Análise de Lacunas

ABSTRACT

The use of genetically modified plants to synthesize proteins that are subsequently processed, regulated, and sold as pharmaceuticals is already a global reality. However, the issue of technological development and industrial production of biological products being expressed in transgenic plants and their impact on the safety of the food chain needs to be discussed more deeply. In this paper, we present an extensive literature review on the standards and regulatory guidelines as well as on biosafety in Brazil with regard to the production of plant-made pharmaceuticals; compare them with the regulatory guidelines of other countries/regions such as USA, Canada, European Union, Cuba, and Argentina; and analyze gaps in the Brazilian regulation. We suggest that some regulations must be reviewed and conclude that the Brazilian regulatory authorities should establish an interrelated regulatory framework together, which would enable industrial production while protecting human and animal health as well as the environment.

KEYWORDS: Genetically Modified Plants; Plant-made Pharmaceuticals; Food Security; Regulation; Gap Analysis

^I Instituto de Tecnologia em Imunológicos, Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos / Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS / Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: rosane@bio.fiocruz.br



INTRODUÇÃO

A produção de proteínas heterólogas através da tecnologia do DNA recombinante (rDNA) teve um profundo impacto na produção de proteínas industriais e farmacêuticas¹. As proteínas recombinantes podem ser usadas como reagentes para diagnóstico, vacinas e biofármacos, e isto cria uma grande demanda para a produção das mesmas em escala industrial. A produção comercial de proteínas recombinantes tem sido tradicionalmente realizada através de fermentação microbiana ou através do uso de linhagens celulares de mamíferos, porém, estes sistemas possuem desvantagens em termos de custo, produção em escala e segurança, características que levaram pesquisadores a buscar novas alternativas².

As plantas produzem uma vasta gama de produtos farmacologicamente ativos que têm sido usados há milhares de anos para prevenir e curar doenças. Todavia, nos últimos 25 anos, também se tornou possível usar plantas como uma plataforma de expressão heteróloga para proteínas recombinantes³.

O enorme progresso feito no genoma das plantas abriu a possibilidade de utilização de plantas como biorreatores para a produção de produtos farmacêuticos recombinantes, que podem variar desde imunógenos (peptídeos solúveis individuais ou estruturas mais complexas, tais como partículas semelhantes a vírus) aos adjuvantes, microbicidas e anticorpos monoclonais⁴. A habilidade das plantas em expressar genes humanos foi estabelecida em 1986, quando Barta e colaboradores mostraram que tecido de calos indiferenciados de tabaco e girassol poderiam produzir transcritos de um gene fusionado de hormônio do crescimento humano, embora neste caso nenhuma proteína fosse detectada. As primeiras proteínas terapêuticas potencialmente expressas em plantas foram a soroalbumina humana expressa em folhas de tabaco, folhas de batata e células em suspensão, em 1990, e um anticorpo monoclonal que foi expresso em folhas de tabaco, em 1989. Destes estudos pioneiros emergiu o conceito de *molecular farming* ou *plant-made pharmaceuticals* que é a produção de proteínas recombinantes valiosas em plantas e células de plantas^{3,5}.

De acordo com vários trabalhos publicados, embora ainda haja uma certa inércia e conservadorismo na área industrial, as plantas vêm emergindo como uma das mais promissoras plataformas de produção para os biológicos do futuro².

A Biotecnologia Vegetal para a expressão de proteínas recombinantes agora engloba uma gama de diferentes tecnologias. As primeiras abordagens utilizando plantas transgênicas foram complementadas por novas técnicas, tendo em vista melhorar dramaticamente o rendimento e a consistência do produto⁵.

O desenvolvimento tecnológico nesta área conduziu a um aumento do número de sistemas disponíveis bem desenvolvidos para a produção de medicamentos recombinantes em plantas. Muitas espécies de plantas são agora passíveis de manipulação genética. O uso de um determinado conjunto de elementos genéticos em combinação com o transgene de interesse tem

permitido a expressão com alto rendimento tanto em raízes e folhas de linhagens de plantas transgênicas, bem como em expressão transitente em linhagens de *Nicotiana benthamiana* não transgênicas⁵.

Os primeiros produtos de proteínas recombinantes produzidos por biotecnologia vegetal que chegaram ao mercado não foram os farmacêuticos, e sim as enzimas e reagentes para diagnóstico. Os processos de produção e purificação de avidina e beta-glucuronidase bacteriana (GUS) para propósitos comerciais foram inicialmente publicados em 1998 e comercializados através de uma colaboração entre as empresas ProdiGene (College Station, TX, EUA) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Ambos os produtos são expressos em plantações de milho transgênico, em campo aberto, de forma a ter como vantagem competitiva o alto rendimento proteico desta plantação e a escala e economia das práticas agrônomas convencionais^{6,7}.

Todavia o uso de culturas alimentares para a produção de proteínas recombinantes tem sido associado mundialmente a um sentimento negativo entre grupos de consumidores e a indústria alimentícia, o que levou a agência regulatória americana FDA a adotar uma política de “tolerância zero” com relação a liberação de transgenes de plantas produtoras de biológicos e contaminação de plantações de culturas alimentares⁸. O fato que levou a adoção de regras mais estritas e rígidas pelo Serviço de Inspeção de Saúde Animal e Vegetal (APHIS) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, foi a perda do alto nível de contenção de culturas de milho geneticamente modificadas para produção de biológicos, plantadas em campos de teste e colhidas em 2001, pela empresa ProdiGene Inc. A evidência da perda de contenção deu-se no ano seguinte (2002), quando agricultores plantaram soja para consumo humano nas áreas usadas pela ProdiGene e sobras de sementes de milho transgênico do campo de teste brotaram em meio a soja. Este acontecimento, levou o APHIS a impor exigências adicionais em todos os futuros lançamentos de campo de plantas produtoras de biológicos nos EUA⁹.

Sparrow e colaboradores publicaram, em 2013, uma extensa revisão sobre o assunto, comparando a legislação vigente entre União Europeia e Estados Unidos. Neste artigo, também é explorada a necessidade de se realizar uma extensa avaliação do risco para se determinar o impacto da planta geneticamente modificada na saúde humana e animal e no meio-ambiente em comparação com a mesma espécie não modificada, levando-se em conta entre outras coisas as seguintes características: (1) a caracterização molecular da planta geneticamente modificada, que informa a estrutura e expressão do inserto(s) e sua estabilidade; (2) a análise comparativa da composição fenotípica e característica agrônômica para que se possam identificar mudanças pretendidas e não pretendidas na planta geneticamente modificada; (3) a avaliação toxicológica da modificação genética, que determina o impacto na saúde humana e animal da mudança biológica relevante na planta geneticamente modificada; (4) a avaliação do potencial alergênico da(s) nova(s) proteína(s) que, no caso das plantas produtoras de biológicos, deve



ser determinado antes da liberação para plantação em campo aberto; (5) a avaliação nutricional, cujo objetivo é demonstrar que o alimento derivado da planta geneticamente modificada não é nutricionalmente desvantajoso para humanos e/ou animais; (6) mudanças potenciais na habilidade de persistência e invasividade da planta geneticamente modificada; (7) potencial de transferência gênica; (8) interações entre a planta geneticamente modificada e organismos alvos; (9) interações entre a planta modificada e organismos não alvos; (10) efeitos adversos potenciais nos processos biogeoquímicos; (11) impactos da alteração de práticas de manejo agrícola associados ao cultivo de plantas geneticamente modificadas; (12) interações potenciais com o ambiente abiótico; e (13) a qualidade científica do plano de monitoramento ambiental pós-venda proposto¹⁰.

Além disso, uma avaliação dos efeitos diretos e indiretos, bem como imediatos e tardios, incluindo efeitos cumulativos de longo prazo são necessários em diversos países¹¹.

Pode-se argumentar que muitos dos critérios acima referidos, não seriam aplicáveis a plantas produtoras de biológicos, uma vez que estas culturas não são projetadas para entrar na cadeia alimentar. No entanto, se estas plantas produtoras de biológicos são também espécies de culturas alimentares, então, será necessária a realização de avaliações completas, como parte do Princípio de Precaução – ou seja, o que aconteceria se estas plantas geneticamente modificadas se misturassem na cadeia alimentar^{10,11}.

Neste interim, a escolha do sistema de produção, ou melhor, a biologia da planta hospedeira, precisa ser considerada tanto pela perspectiva de produção, quanto por como ela impacta no meio-ambiente, segurança alimentar e saúde humana. É muito improvável que uma única espécie satisfaça todos os critérios requeridos. Existem, algumas vezes, considerações conflitantes que necessitam serem balanceadas para selecionar a melhor espécie para uma aplicação particular. Segundo Sparrow e colaboradores publicaram em 2007, três classes de espécies de plantas podem ser potencialmente utilizadas: espécies não cultivadas, culturas não alimentares e culturas alimentares. As culturas alimentares também podem ser divididas em três grupos principais: (a) sementes; (b) hortaliças; e (c) frutas/folhas verdes. A Tabela 1 sintetiza para cada classe e grupo de plantas as vantagens e desvantagens do ponto de vista de biossegurança e produção¹².

Embora Estados Unidos, União Europeia e Canadá estejam à frente das discussões regulatórias, bem como possuam consistência na avaliação e gerenciamento do risco para a produção de biológicos em plataformas vegetais¹³, um número expressivo de países incluindo África do Sul, Brasil e Argentina tem desenvolvido extensiva experiência e expertise na avaliação do risco e no gerenciamento do risco de plantações geneticamente modificadas e estão em uma forte posição para determinar os riscos ambientais associados a transgenia quando comparados a outros países onde os cultivos transgênicos são muito mais limitados¹².

Finardi Filho¹⁴ declara que o Brasil é hoje o vice-líder global na adoção da biotecnologia agrícola e tem 37 eventos agrônômicos transgênicos aprovados para consumo e plantio. Além de

algodão, milho e soja, há também o feijão transgênico resistente ao vírus do mosaico dourado, único produto geneticamente modificado do mundo desenvolvido inteiramente por uma instituição pública de pesquisa, a Embrapa. Cabe também ressaltar as 17 vacinas para uso animal e as duas leveduras para produção de biocombustíveis também avaliadas e liberadas¹⁴.

No entanto, a questão de desenvolvimento tecnológico e produção industrial de produtos biológicos sendo expressos em plantas transgênicas e seu impacto na segurança da cadeia alimentar pode e deve ser discutida em todos os setores envolvidos incluindo o terceiro setor. Este trabalho objetivou a realização de uma extensa revisão bibliográfica nas normas e diretrizes regulatórias e de biossegurança do Brasil que tratem da produção de biológicos em plataformas vegetais, uma comparação com a regulação de outros países e a análise das lacunas existentes na regulação brasileira.

METODOLOGIA

Segundo Assis e colaboradores¹⁵, a pesquisa sobre regulação pode ser desenvolvida a curto, médio e longo prazo. Ela é focada inteiramente em como modelar e formalizar documentos normativos para regular bens, serviços, e equipamentos que são liberados pelos setores industriais para uso ou consumo sem controle regulamentar, mas que podem afetar a saúde e a segurança da população, bem como o meio ambiente, incluindo alimentos, água e ar. Este tipo de pesquisa também tem como objetivo manter um acompanhamento regulamentar para acompanhar os resultados obtidos pela ciência e tecnologia no curto, médio e longo prazos. De fato, o controle de produtos tecnológicos é a parte final do processo regulatório, que começa com acompanhamento correto de resultados de investigação pura e estende-se até o momento em que os bens ou serviços afetados por esta pesquisa são entregues a esse mercado. E, claro, espera-se que estes produtos devam ser seguros, e que devam ser rastreáveis “do berço ao túmulo”¹⁵.

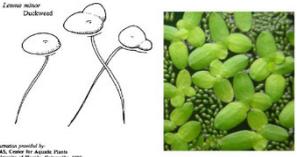
O levantamento do arcabouço regulatório e de biossegurança foi realizado através de busca de artigos científicos em base de dados acadêmicos como “ISI Web of Knowledge”, Scopus, Scirus, “Web of Science” e “Carrot 2”. Também foram consultadas os *websites* da ANVISA, CTNBio e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os *websites* internacionais consultados foram: nos Estados Unidos, USDA-APHIS^{9,21,22}, US permits for pharmaceutical plants²³, FDA⁸ EPA³⁴; no Canadá, CFIA^{24,25}; na União Europeia, EFSA³⁵, EMA³⁶ e Internacional Cartagena Biosafety Protocol³⁷.

A análise de lacunas é uma técnica que surgiu na década de 1980 quando o alcance da qualidade em produtos e serviços tornou-se uma preocupação central^{16,17}. Atualmente é uma técnica que as empresas usam para determinar que medidas devem ser tomadas a fim de mover-se de seu estado atual para o estado futuro desejado. Também é chamada de análise de necessidades e avaliação de necessidades.

A análise de lacunas consiste em: (1) lista de fatores característicos (como atributos, competências, níveis de desempenho) da situação atual (“o que é”); (2) lista de fatores necessários para atingir objetivos futuros (“o que deveria ser”); e (3) destacando as lacunas que existem e precisam ser preenchidas.



Tabela 1. Modelos de plantas usadas para produção de biológicos.

Espécie	Exemplo	Vantagens	Desvantagens	Imagem
Não-cultivadas	<i>Lemna minor</i>	Não é parte da cadeia alimentar humana; podem ser cultivadas em contenção ou em biorreatores	Há pouco conhecimento da genética e biologia destas espécies, principalmente a respeito da produção ou não de toxinas e de seu potencial para cruzamento	
Culturas não alimentares	Tabaco	Não é parte da cadeia alimentar humana nem animal; métodos eficientes e bem estabelecidos para transferência de genes e expressão, alto rendimento de biomassa e boa produção de sementes	Muitos cultivares de tabaco produzem alto nível de alcaloides tóxicos; presença de substâncias fenólicas	
	Linho	Não é parte da cadeia alimentar humana nem animal; mudas transgênicas podem ser cultivadas em biorreatores e completamente contidas	Baixo rendimento, necessidade de remoção de fibras e óleos no processo de purificação	
Culturas alimentares (Sementes)	Arroz, trigo, cevada, milho, ervilha, soja, cártamo e canola	A expressão de proteínas em sementes permite a estocagem por longo tempo, mesmo à temperatura ambiente; sistemas eficientes já estabelecidos para produção e processamento; a proteína recombinante não está presente em folhas, brotos ou raízes	Parte da cadeia alimentar humana e animal; necessidade de floração levando à possibilidade de transferência de pólen; possibilidade de perdas de sementes e mistura durante o transporte e manuseio	
Culturas Alimentares (Hortaliças)	Batata, cenoura	Estabilidade da proteína recombinante, produção de vacina oral (batata) e cultivo de células em suspensão em completa contenção (cenoura)	Parte da cadeia alimentar humana e animal; potencial influência no meio-ambiente; diferenciação entre transgênico e não-transgênico	
Culturas Alimentares (Frutas e folhas verdes)	Banana, tomate, alface, espinafre	Vacinas comestíveis que podem ser consumidas sem necessidade de processamento (cruas)	Parte da cadeia alimentar humana e animal; inconsistência lote a lote; instável, baixo rendimento; potencial exposição a herbívoros	

Na pesquisa científica na área de Ecologia e Biodiversidade, a análise de lacunas também é uma ferramenta utilizada na conservação da vida selvagem para identificar lacunas em áreas de conservação (por exemplo, áreas, protegidas e reservas naturais) ou outras áreas naturais onde ocorrem espécies vegetais e animais significativos e seu habitat ou características ecológicas importantes. Gerentes de conservação ou cientistas podem usá-la como base para a formulação de recomendações para melhorar a

representatividade das reservas naturais ou a eficácia das áreas protegidas para que essas áreas ofereçam o melhor valor para a conservação da diversidade biológica.

Na sua forma mais simples, uma análise de lacunas é uma avaliação do grau em que um sistema de áreas protegidas atende metas de proteção estabelecidas por uma nação ou região para representar a sua diversidade biológica. A análise pode variar



de exercícios simples com base em uma comparação espacial da biodiversidade, com áreas protegidas para estudos complexos que necessitam de coleta detalhada de dados e análise, mapeamento e uso de pacotes de software de decisão existentes^{18,19,20}.

A análise de lacunas também é uma metodologia muito utilizada por auditores de terceira parte para avaliações de Sistemas de Gestão de Segurança de Alimentos para certificação FSSC22000³⁸.

Neste trabalho, utilizamos esta ferramenta de análise de lacunas para comparar o estado da arte da regulação mundial com as leis, normas e diretrizes brasileiras na área de produção de biológicos em plantas geneticamente modificadas e, por consequência, seu impacto na segurança alimentar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma intensa pesquisa exploratória foi realizada nas legislações dos Estados Unidos, União Europeia e Canadá e uma visão geral das legislações atuais pode ser vista na Tabela 2.

Nos Estados Unidos, após a publicação, em 1984, da Nota de Registro Federal “Proposta de um Arcabouço Coordenado para a Regulação da Biotecnologia, três agências federais estruturaram uma matriz de leis e regulações que governam a avaliação, produção e a distribuição de produtos finais biológicos derivados de plantas transgênicas. Tais produtos estão sob a autoridade do FDA, Departamento de Agricultura (USDA) e da agência de Proteção Ambiental (EPA), dependendo da natureza do produto e sua intenção de uso³⁰. Estes órgãos reguladores norte-americanos e a indústria de biotecnologia consideram os produtos biológicos derivados de plantas transgênicas como uma categoria distinta de culturas geneticamente modificadas para consumo humano e animal, com requisitos de manuseio e controle muito mais rígidos³⁰.

Atualmente, no Canadá, a Agência de Inspeção Alimentar Canadense (CFIA) regula as plantas transgênicas produtoras de biológicos da mesma maneira que regula as outras plantas transgênicas (com características inéditas), usando regulamentações que estão sob a Lei Canadense de Sementes e sua regulação, parte 5. Todavia, o Canadá está também revisando estas regulamentações de forma a cobrir questões de liberação ambiental destas plantas transgênicas produtoras de biológicos, especificamente as que serão comercializadas. A CFIA está desenvolvendo uma abordagem que enfoca que estas plantas produtoras de biológicos constituem um risco potencial para a segurança da cadeia alimentar e/ou para o meio-ambiente. Esta nova abordagem reforça a necessidade de um sistema de produção que seja segregado de qualquer outro sistema de produção pertencente à cadeia alimentar e, onde apropriado, minimize sua exposição ao meio-ambiente²⁹.

Na União Europeia não existe um único órgão ou uma única regulação que contemple as plantas transgênicas produtoras de biológicos em todo seu ciclo produtivo. O uso de plantas transgênicas na Europa está inicialmente sob a regulação de seus países de origem e, com isso, submetido ao cumprimento de exigências de uma série de órgãos reguladores. A produção de biológicos

em transgênicos tem que aderir aos regulamentos que cobrem desde a utilização confinada de organismos geneticamente modificados (2009/41/EC), para as fases iniciais de P&D, até material geneticamente modificado usado em biorreatores, bem como o crescimento de plantas inteiras para produção de biológicos em instalações confinadas como casas de vegetação.

A supervisão regulatória para plantas produtoras de biológicos no campo é abrangida pela Diretiva 2001/18/EC, que regula a liberação deliberada no ambiente de organismos geneticamente modificados. A parte B desta diretiva regula a liberação em campo experimental. A parte C da presente diretiva regula a importação, o cultivo, processamento e a comercialização. A EFSA, que supervisiona a avaliação das plantas geneticamente modificadas para serem deliberadamente liberados no ambiente, publicou notas de orientação, em 2009, sobre a avaliação de riscos de plantas geneticamente modificadas utilizadas para fins não alimentares, incluindo plantas transgênicas como plataforma de produção para biológicos e insumos industriais.

No Brasil, foi feita uma busca nos sites dos órgãos que possuem ligação direta com este assunto: (a) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); (b) Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT); e (c) Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS), e as leis, decretos, resoluções, instruções normativas e diretrizes relacionadas a plantas, sementes, OGM e produtos biológicos foram analisadas. A lista dos documentos analisados e seu escopo estão dispostos na Tabela 3.

A análise de lacunas foi realizada, primeiro, analisando todas as referências dos Estados Unidos, Canadá e União Europeia (Tabela 2) e elencando quais os critérios importantes que todas as regulações citavam como itens a serem discutidos, inspecionados e ou regulados. Depois, foram lidos todos os documentos brasileiros citados na Tabela 3 e pesquisados se estes documentos continham ou faziam menção aos critérios elencados, considerados importantes para a biossegurança na produção de biológicos em plantas transgênicas e o impacto na segurança alimentar. As lacunas na regulação brasileira quando comparada com a regulação dos Estados Unidos, Canadá e União Europeia estão representadas na Tabela 4.

Da análise das lacunas observadas pode-se dizer que, embora a legislação de Biossegurança seja muito abrangente, ainda não há no arcabouço regulatório, regulações ou diretrizes específicas para plantas transgênicas produtoras de biológicos, sejam estas pertencentes à cadeia alimentar ou não.

A CTNBio dispõe, na Resolução Normativa nº 5, de 12 de março de 2008, sobre a liberação de OGM. A resolução em vigor atribui à necessidade de avaliar e identificar os riscos os efeitos adversos potenciais do OGM e seus derivados na saúde humana e animal, assim como no meio-ambiente e nos vegetais, mantendo a transparência, o método científico e o Princípio da Precaução. Todavia, as demais providências citadas nas regulações internacionais quando do uso de plantas transgênicas para a produção de biológicos não estão contempladas nestas resoluções.



Tabela 2. Visão geral da regulação atual da EU, EUA e Canadá sobre Plantas Produtoras de Biológicos.

Pais	Autoridade	Escopo de regulação	Leis e regulações	Regulações específicas e guias para plantações farmacêuticas
Estados Unidos	USDA-APHIS Biotechnology Regulatory Service (BRS)	Desenvolvimento e produção no campo: da semente ao grão	Lei de Proteção à Planta (PPA)	Teste de campo de plantas transgênicas para produção de compostos farmacêuticos e industriais ²¹
		Incluindo o transporte e liberação ambiental	Lei de Proteção Ambiental Nacional (NEPA)	Introdução de plantas geneticamente modificadas para produção de compostos industriais (regra interna) ²² Guia para Indústria: Medicamentos, biológicos e componentes médicos derivados de plantas transgênicas para uso em humanos e animais ⁸ Guia para a APHIS: Permissão de teste de campo ou movimento de organismos com intenções farmacêuticas ou industriais ²³
	FDA Administração de alimentos e Medicamentos	Supervisão adicional para a segurança alimentar	Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (FFDCA)	Ver referência 8
	EPA Agência de Proteção Ambiental	Revisando a avaliação ambiental da APHIS e suas regulações	Lei Federal de Inseticidas, Fungicidas e Rodenticidas (FIFRA) Lei Nacional de Proteção Ambiental (NEPA) Lei de Controle de Substâncias Tóxicas	Não disponível
Canadá	CFIA Agência de inspeção alimentar canadense Plant Biosafety Office (PBO)	Liberação ambiental	Lei das sementes e regulação de sementes	Diretiva 2000-07 (conduzindo pesquisa em estudos de campo confinado em plantas com características inéditas no Canadá) e seu aditivo provisório para plantas produtoras de biológicos no campo ²⁴ Os critérios de avaliação para a avaliação da segurança ambiental de plantas com características inéditas destinados à produção comercial de biológicos ²⁵
	CFIA Sessão de Sementes	Vendas, propaganda, importação, exportação de sementes de plantações farmacêuticas	Lei das sementes e regulação de sementes	Embora não haja nenhum guia específico para plantações farmacêuticas, para a maioria das plantações agrícolas no Canadá o registro da variedade é requerido antes da venda (Seeds Regulation Part III)
	HC	Supervisão adicional para a segurança alimentar		Como parte do quadro regulamentar do PBO-CFIA, os proponentes podem ser obrigados a apresentar dados de exposição e de risco para que os impactos sobre a saúde humana e animal resultantes da exposição à planta em análise possam ser avaliados. Além disso, os riscos potenciais decorrentes da introdução acidental de material vegetal para as cadeias alimentares e pecuária será avaliado. Prevê-se que HC irá rever esta exposição e os dados sobre os perigos em nome da PBO
União Europeia	Autoridades competentes nacionais dos Estados Membros	Fases iniciais de P&D em laboratório; OGM crescido em sistemas fechados de cultura de células Biorreatores); plantas GM crescidas em confinamento tais como estufas ou salas de ambiente controlado.	Diretiva 2009/41/EC	Uso de OGM em confinamento ²⁶
	Autoridades competentes nacionais dos Estados Membros	Parte B: Liberação de estudos de campo experimentais	Diretiva 2001/18/EC	Liberação deliberada no meio-ambiente de organismos geneticamente modificados ²⁷
	Autoridades competentes nacionais dos Estados Membros, Comissão Europeia e Autoridade de segurança alimentar europeia	Parte C: Importação, cultivo, processamento, comercialização		
	Autoridades competentes nacionais dos Estados Membros, Comissão Europeia e Autoridade de segurança alimentar europeia	Aplica-se somente se partes da planta GM entrarem na cadeia alimentar humana ou animal ou pode também ser aplicada se uma cultura alimentar é usada para a produção, mesmo que para fins não alimentares / alimentação	Regulação (EC) 1829/2003	Regulação em alimentos geneticamente modificados ²⁸

Fonte: Revisto e adaptado de [10,29,30].



Tabela 3. Legislação vigente no Brasil relacionada a plantas; transgênicos e produtos biológicos.

Plantas		
MAPA	Lei nº 10.711, de 05 de agosto de 2003 ³⁹	Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças, e dá outras providências
	Decreto nº 5.153 de 23 de julho, de 2004 ⁴⁰	Aprova o Regulamento da Lei nº 10.711 de 05 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças-SNSM, e dá outras providências
	Instrução Normativa nº 9, de 02 de junho de 2005 ⁴¹	Aprovar as Normas para Produção, Comercialização e Utilização de Sementes, e seus respectivos anexos
Biossegurança		
CTNBio (MCT)	Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005 ⁴²	Estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam OGM e seus derivados
	Resolução Normativa nº 2, de 27 de novembro de 2006 ⁴³	Dispõe sobre a classificação de riscos de OGM e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção
	Resolução Normativa nº 5, de 12 de março de 2008 ⁴⁴	Dispõe sobre normas para liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados e seus derivados
MS	Diretrizes Gerais para Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos, 3ª Edição – 2010 ⁴⁵	Orientar a estruturação física, recursos humanos e materiais que permitam o procedimento seguro dos serviços e práticas em laboratórios e unidades de saúde que manipulem agentes biológicos
Produtos Biológicos		
ANVISA	RDC nº 55, de 16 de dezembro de 2010 ⁴⁶	Registro de Produtos Biológicos Novos e Produtos Biológicos
	RDC nº 17, de 16 de abril de 2010 ⁴⁷	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos
	RDC nº 249, de 13 de setembro de 2005 ⁴⁸	Regulamento Técnico das Boas Práticas de Fabricação de Produtos Intermediários e Insumos Farmacêuticos Ativos
	RDC nº 57, de 19 de novembro de 2012 ⁴⁹	Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de insumos farmacêuticos ativos obtidos por culturas de células/fermentação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança; MCT: Ministério da Ciência e Tecnologia; MS: Ministério da Saúde; ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; RDC: Resolução da Diretoria Colegiada.
Fonte: Elaboração da autora

O mesmo pode ser avaliado com relação às leis, decretos e instruções normativas sob a responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Em sua regulação do uso e comércio de sementes, não há menção às sementes transgênicas para sistemas de produção em campo aberto de produtos biológicos. Também não há qualquer menção aos controles de qualidade necessários, quando as sementes possuem DNA exógeno.

Já na avaliação das resoluções da ANVISA, pode-se ressaltar que não há menção na resolução de registro de produtos biológicos e produtos biológicos novos (RDC nº 55 de 2010) a produtos biológicos que sejam produzidos em plataformas vegetais. Também não há requerimentos para o preparo e manutenção de bancos de células mestre (BCM) e banco de células trabalho (BCT) quando aplicados a produtos provenientes de plataformas vegetais. A diferença entre um BCM para células cultiváveis e um BCM para plantas é que sementes não podem ser congeladas em nitrogênio líquido. Sementes devem ser estocadas em uma temperatura e umidade que mantenham sua viabilidade. Na RDC nº 249 de 2005, que dispõe sobre o regulamento técnico de Boas Práticas de Fabricação para produtos intermediários e insumos farmacêuticos ativos, também não há menção aos sistemas de produção baseados em plantas transgênicas e ou transformação transiente e, assim, não há critérios para a escolha da planta fonte e sua caracterização.

Quando avaliamos a posição do Brasil frente a outros países da América Latina, evidenciamos que Cuba, através de seu órgão regulador para medicamentos (CECMED), já possui uma regulação para registro de produtos biofarmacêuticos obtidos através de plantas transgênicas e que a Diretoria de Biotecnologia do Ministério da Agricultura da Argentina já reconheceu a necessidade de desenvolver regulação específica para plantas transgênicas produtoras de biológicos, já que a regulação argentina atual cobre apenas testes experimentais e não é adequada para requerimentos de atividades de produção contínua após os testes de fase experimental em campo aberto^{32,33}.

A análise da regulação de outros países e a análise de lacunas em relação ao arcabouço regulatório brasileiro também nos permitiu identificar que, diferentemente de países como Estados Unidos e Canadá e membros da União Europeia, o Brasil não possui um arcabouço regulatório que reúna todos os órgãos competentes no assunto (MAPA, ANVISA e CTNBio) e uma matriz regulatória que permita uma articulação entre as leis, normas, resoluções, instruções normativas já existentes. Nossa proposta, que está sintetizada na Figura, é que estes entes regulatórios comecem a discutir a

Tabela 4. Análise de Lacunas entre a Legislação vigente no Brasil e outros países.

Critério	União Europeia	Estados Unidos	Canadá	Brasil	Lacuna observada
Uso de OGM em contenção	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Legislação específica para plantas geneticamente modificadas produzindo biológicos	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Diretrizes para sementes transgênicas	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Hospedeiro e caracterização da planta fonte	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Banco de sementes	Não	Sim	Sim	Não	Sim
Confinamento	Sim	Sim	Sim	Não	Sim

Fonte: Elaboração da autora



plataforma vegetal na produção de biológicos de maneira integrada, incluindo nesta discussão todos os representantes envolvidos como a sociedade civil, instituições de pesquisa na área e empresas produtoras. O assunto é vasto e complexo, pois, além de representar um desenvolvimento tecnológico significativo e uma produção industrial considerável, o uso desta plataforma deve ser bem avaliado a fim de que sejam preservadas a saúde e o bem estar humano e animal, além do impacto que possa causar no meio ambiente.

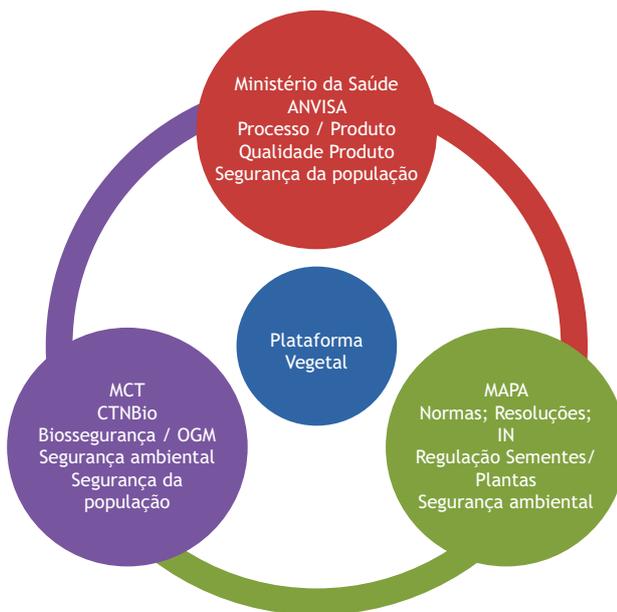


Figura. Arcabouço Regulatório a ser estabelecido.

CONCLUSÃO

A definição mais vigente de Segurança Alimentar, no Brasil, construída por ocasião da elaboração do documento brasileiro para a Cúpula Mundial de Alimentação, realizada em Roma em novembro de 1996, é:

A Segurança Alimentar e Nutricional significa garantir, a todos, condições de acesso a alimentos básicos de qualidade, em quantidade suficiente, de modo permanente e sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, com base em práticas alimentares saudáveis, contribuindo,

assim, para uma existência digna, em um contexto de desenvolvimento integral da pessoa humana.

Representa um conceito bastante abrangente, comportando as noções do alimentar e do nutricional; enfatizando os aspectos do acesso e da disponibilidade em termos de suficiência, continuidade e preços estáveis e compatíveis com o poder aquisitivo da população; ressaltando a importância de qualidade; valorizando os hábitos alimentares adequados e colocando a segurança alimentar e nutricional como uma prerrogativa básica para a condição de cidadania.

Neste contexto, estamos propondo que se inicie uma extensa discussão acerca do desenvolvimento tecnológico de plataformas vegetais para a produção industrial de biológicos, principalmente no que tange esta produção em cultivares utilizados para alimentação tanto humana quanto animal.

As agências reguladoras de medicamentos tem repetido sistematicamente que as diretrizes existentes, em princípio, se aplicam também as plantas produtoras de biológicos. Porém, é muito difícil seguir estritamente tais diretrizes, porque elas foram desenvolvidas para sistemas de produção baseado em células, que são processos estéreis e confinados, nos quais os meios de cultura e o ambiente podem ser precisamente controlados.

O uso de sistemas de produção agrícolas para medicamentos e biológicos apresenta novos desafios para os órgãos regulatórios brasileiros MAPA, ANVISA e CTNBio, em termos de regular uma plantação no que poderia ser chamado de “Boas Práticas Agrícolas”. Estes métodos de controle seriam similares àqueles sobre as Boas Práticas de Fabricação para a manufatura de medicamentos biológicos tradicionais. A aplicação destas boas práticas agrícolas é necessária para garantir que os processos de crescimento e colheita das plantações farmacêuticas sejam propriamente documentados e controlados, que procedimentos existam para prevenir que adulterantes perigosos entrem no produto e que a plantação esteja na contenção necessária de forma a proteger o meio ambiente e a saúde humana e animal.

Assim, se faz necessário que as entidades regulatórias brasileiras que estão envolvidas com as questões de segurança na saúde humana e animal e os efeitos no meio-ambiente estabeleçam um arcabouço regulatório conjunto e interrelacionado que permita ao Brasil o desenvolvimento tecnológico e a produção industrial de plantas produtoras de biológicos, porém mantendo o Princípio da Precaução no qual a segurança seja o fator de maior impacto.

REFERÊNCIAS

1. Egelkroust E, Rajan V, Howard JA. Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant Sci.* 2012;184:83-101.
2. Fisher R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol.* 2004;7(2):152-8.
3. Fisher R, Schillberg S, Hellwig S, Twyman RM, Drossard J. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnol Adv.* 2012;30(2):434-9.
4. Buonaguro FM. Plant-derived vaccines: technology & applications. London: Future Medicine; 2011.
5. Paul M, Ma JK. Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. *Biotechnol Appl Biochem.* 2011;58(1):58-67. <http://dx.doi.org/10.1002/bab.6>
6. Kusnadi AR, Hood EE, Witcher DR, Howard JA, Nikolov ZL. Production and Purification of Two Recombinant Proteins from Transgenic Corn. *Biotechnology Progress.* 1998; 14(1):149-55.



7. Evangelista RL, Kusnadi AR, Howard JA, Nikolov ZL. Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant B-Glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnol Progr.* 1998;14(4):607-14. <http://dx.doi.org/10.1021/bp980047c>
8. Food and Drug Administration (US). Draft guidance for industry: drugs, biologics, and medical devices derived from bioengineered plants for use in humans and animals. 2002 [Acesso em: 10 maio 2014]. Disponível em: www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm124811.pdf
9. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Introduction of genetically engineered organisms. draft programmatic environmental impact statement. 2007. [Acesso em: julho 2014]. Disponível em: www.aphis.usda.gov/brs/pdf/complete_eis.pdf
10. Sparrow P, Broer I, Hood EE, Eversole K, Hartung F, Schiemann J. Risk assessment and regulation of molecular farming: a comparison between Europe and US. *Curr Pharm Des.* 2013; 19(31):5513-30. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612811319310007>
11. Kirk DD, McIntosh K, Walmsley AM, Peterson RKD. Risk analysis for plant-made vaccines. *Transgenic Res.* 2005;14(4):449-62.
12. Sparrow PAC, Irwin JA, Dale PJ, Twyman RM, Ma JKC. Pharma-Planta: Road testing the developing regulatory guidelines for plant-made pharmaceuticals. *Transgenic Res.* 2007;16(2):147-61. <http://dx.doi.org/10.1007/s11248-007-9074-2>
13. Alderborn A, Sundstrom J, Soeria-Atmadja D, Sandberg M, Andersson HC, Hammerling U. Genetically modified plants for non-food or non-feed purposes: Straightforward screening for their appearance in food and feed. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(2):453-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.049>
14. Finardi Filho F. CTNBio: rigor e transparência na avaliação de biossegurança de OGM no Brasil. [acesso em agosto de 2014]. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/18375.html>
15. Assis AS, Azevedo CA, Rech MM. Regulatory research. *Vigil Sanit Debate.* 2013;1(2):16-21. <http://dx.doi.org/10.3395/vd.v1i2.15>
16. Parasuraman, A, Zeithaml, VA & Berry, LL. A conceptual model of service quality and its implications for future research. *J Mark.* 1985;49(4):41-50. <http://dx.doi.org/10.2307/1251430>
17. Parasuraman, A, Zeithaml, VA & Berry, LL. SERVQUAL: a multiple-item scale for measuring consumer perceptions of service quality. *J Retailing.* 1988;64(1):12-40.
18. Scott JM, Schipper J. Gap analysis: a spatial tool for conservation planning. In: Groom MJ, Meffe GK, C. Carroll R. *Principles of conservation biology.* 3rd ed. Sunderland: Sinauer. 2006. p. 518-9.
19. Tisdell C, Wilson C, Swarna Nantha H. Policies for saving a rare Australian glider: economics and ecology. *Biol Conserv.* 2005;123(2):237-48.
20. Fearnside PM, Ferraz J. A conservation gap analysis of Brazil's Amazonian vegetation. *Conserv Biol.* 1995;9(5):1134-47. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1739.1995.9051127.x-i1>
21. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Field-testing of plants engineered to produce pharmaceutical and industrial compounds. *Federal Register.* 2003 Mar 7 *CFR Part 340 68(46): 11337-40.* Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/brs/fedregister/BRS_20030310a.pdf
22. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Introductions of plants genetically engineered to produce industrial compounds (interim rule) *Federal Register.* 2003 Aug; 7 *CFR Part 340 68(151): 46434-36.* Disponível em: <http://www.gpo.gov/fdsys/granule/FR-2003-08-06/03-19877>
23. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Draft guidance for APHIS permits for field testing or movement of organisms with pharmaceutical or industrial intent. (Riverdale); 2012 [Acesso em: jul 2014]. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/brs/pdf/Pharma_Guidance.pdf
24. Canadian Food Inspection Agency. Directive 2000-07. Conducting confined research field trial of plants with novel traits in Canada and its interim amendment for plant molecular farming field trials. [Internet]. 2003. [Acesso em: jul 2014]. Disponível em: <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-dir2000-07/eng/1304474667559/1304474738697>
25. Canadian Food Inspection Agency, Plant Biosafety Office. Directive 94-08. Assessment criteria for determining environmental safety of plants with novel traits. 2004 [Acesso em: jul. 2014]. Disponível em: <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/eng/1304475469806/1304475550733>
26. The European Parliament and the Council of the European Union. Council Directive 2009/41/EC of 6 May 2009 on the contained use of genetically modified micro-organisms. *Off. J. Eur. Union L 125, 75-97.*
27. The European Parliament and the Council of the European Union. Council Directive 2001/18/EC of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. *Off. J. Eur. Union L 106, 1-38.*
28. The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EC) No. 1829/2003 of 22 September 2003 on genetically modified food. *Off. J. Eur. Union L 268, 1-23.*
29. Spök A, Twyman RM, Fisher R, Ma JKC, Sparrow PAC. Evolution of a regulatory framework for pharmaceutical derived from genetically modified plants. *Trends Biotechnol.* 2008;26(9):506-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.007>



30. Breyer D, Goossens M, Herman P, Sneyers M. Biosafety considerations associated with molecular farming in genetically modified plants. *J Medicl Plants Res.* 2009;3(11):825-38.
31. Berberich SA and Devine RA. US Regulation of plant-made biopharmaceuticals, Part 1. *BioPharma Internat.* 2005;18:38-46.
32. Republica de Cuba, Ministerio de Salud Publica, Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación No. 40/2006. Requisitos químicos - farmacéuticos y biológicos para el registro de productos biofarmacéuticos obtenidos a partir de plantas transgênicas.
33. Ma JK-C, Christou P, Chikwamba R, Haydon H, Paul M, Ferrer MP et al. Realizing the value of plant molecular pharming to benefit the poor in developing countries and emerging economies. *Plant Biotechnol J.* 2013;11(9):1029-33. <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12127>
34. United States Environmental Protection Agency - EPA. [Acesso em: jul 2014]. Disponível em: <http://www.epa.gov/>
35. European Food Safety Authority - EFSA. [Acesso em: julho 2014]. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/>
36. European Medicines Agency - EMA. [Acesso em: jul 2014]. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
37. Conventional on Biological Diversity - International Cartagena Biosafety Protocol. [Acesso em: jul 2014]. Disponível em: <http://bch.cbd.int/protocol>
38. Food Safety System Certification FSSC 22000. [Acesso em: jul 2014]. Disponível em: <http://www.fssc22000.com/>
39. BRASIL. Lei no. 10.711 de 05 de Agosto de 2003. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências. *Diário Oficial da União.* 6 ago. 2003;Seção 1.
40. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004. Aprova o regulamento da Lei no. 10.711, de 05/08/2003. *Diário Oficial da União.* 26 jul. 2004;Seção 6.
41. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa nº 9, de 2 de junho de 2005. Aprovar as normas para produção, comercialização e utilização de sementes, e seus respectivos anexos. *Diário Oficial da União.* 10 jun. 2005; Seção 1:4.
42. BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. 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 União.* 25 mar 2005.
43. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. 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 União.* 28 nov 2006.
44. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Resolução Normativa nº 5, de 12 de março de 2008. Dispõe sobre normas para liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados e seus derivados. *Diário Oficial da União.* 13 mar 2008; Seção 1.
45. Ministério da Saúde (BR). Secretária de Ciências, Tecnologias e Insumos Estratégicos. Diretrizes gerais para trabalho em contenção com Agentes Biológicos. 3a ed, Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2010.
46. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 55 de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de Produtos Biológicos Novos e Produtos Biológicos. *Diário Oficial da União.* 17 dez. 2010.
47. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. *Diário Oficial da União.* 17 abr 2010a.
48. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 249, de 13 de setembro de 2005. Regulamento técnico das Boas Práticas de Fabricação de Produtos Intermediários e Insumos Farmacêuticos Ativos. *Diário Oficial da União.* 14 set 2005.
49. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 57, de 19 de novembro de 2012. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos obtidos por cultura de células / fermentação. *Diário Oficial da União.* 21 nov 2012.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.
Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

**9. APENDICE C - ARTIGO SUBMETIDO AO THE AMERICAN JOURNAL OF
TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE**



April 12, 2016

The Editor
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

Dear Editor,

Under this cover, we submit our primary scientific research-based manuscript by Tottey S. et al. entitled “**Plant-produced subunit vaccine candidates against yellow fever induce virus neutralizing antibodies and confer protection against viral challenge in animal models**” to be considered for publication in *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.

Authors contributing to the manuscript: Stephen Tottey, Yoko Shoji, R. Mark Jones, Jessica A. Chichester, Brian J. Green, Konstantin Musiychuk, Huaxin Si, Slobodanka Manceva, Amy Rhee, Moneim Shamloul, Joey Norikane, Rosane C. Guimarães, Elena Caride, Andrea N.M.R. Silva, Marisol Simões, Patricia C.C. Neves, Renato Marchevsky, Marcos S. Freire, Stephen J. Streatfield, and Vidadi Yusibov.

Yellow fever (YF) is a viral disease transmitted by mosquitoes and endemic mostly in South America and Africa, with 20-50% fatality. All current licensed YF vaccines, including YF-Vax[®] (Sanofi-Pasteur, France) and 17DD-YFV (Bio-Manguinhos, Brazil), are based on live attenuated virus produced in hens’ eggs and have been widely used. The YF vaccines are considered safe and highly effective. However, a recent increase in demand for YF vaccines and reports of rare cases of YF vaccine-associated fatal adverse events have provoked interest in developing a safer YF vaccine that can be easily scaled up to meet this increased global demand.

*In this study, we have engineered the YF virus envelope protein (YFE), previously shown to elicit protective immune responses in animal models, and transiently expressed it in *Nicotiana benthamiana* as a stand-alone protein (YFE) or as fusion to bacterial enzyme lichenase (YFE-LicKM). Immunogenicity and challenge studies in mice demonstrated that both YFE and YFE-LicKM elicited virus neutralizing (VN) antibodies and protected animals from the lethal challenge infection. Furthermore, these two YFE-based vaccine candidates induced VN antibody responses with high serum avidity in non-human primates and protected animals against challenge with 17D strain of YF virus. We believe that these results,*

demonstrating protective efficacy of YFE variants expressed in N. benthamiana, support further development of both YF vaccine candidates.

We confirm that the material presented in this manuscript is original, has not been published, and has not and will not be submitted for publication elsewhere as long as it is under consideration by the *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.

We confirm that all contributing authors have participated in the study and concur with the submission and subsequent revisions of the manuscript.

The authors have no relationship or support which might be perceived as constituting a conflict of interest.

Thank you for your attention. We look forward to your comments.

Sincerely,

Vidadi Yusibov, Ph.D.
Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology
Newark, DE
Email: Vidadi.Yusibov@fhcmb.org

Rosane C. Guimarães

Elena Caride

Andrea N.M.R. Silva

Marisol Simões

Patricia C.C. Neves

Renato Marchevsky

Marcos S. Freire

10. ANEXO A – Tabela de Pontuação de Riscos para todos os critérios

Question	Response Suggestions
Likelihood of Infection	
Transmissibility	
Humans	
Inhalation	
Is this agent known to cause infection via inhalation in humans (to cause infection via droplets or droplet nuclei that have entered the upper or lower respiratory tract) in a laboratory setting?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is the infectious dose (ID50) of this agent for this route less than 1000 or unknown in humans?	4 = Yes 2 = No 0 = If this is not an infectious route
Percutaneous	
Is this agent known to cause infection via percutaneous exposure in humans (to cause infection through compromised skin or direct injection into the blood stream) in a laboratory setting?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is the infectious dose (ID50) of this agent for this route less than 1000 or unknown in humans?	4 = Yes 2 = No 0 = If this is not an infectious route
Direct Contact	
Is this agent known to cause infection via direct contact in humans (to cause infection through the mucosal membranes) in a laboratory setting?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is the infectious dose (ID50) of this agent for this route less than 1000 or unknown in humans?	4 = Yes 2 = No 0 = If this is not an infectious route
Ingestion	
Is this agent known to cause infection via ingestion in humans (to cause infection via contact with the gastrointestinal tract) in a laboratory setting?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is the infectious dose (ID50) of this agent for this route less than 1000 or unknown in humans?	4 = Yes 2 = No 0 = If this is not an infectious route

Animals	
Inhalation	
Is this agent known to cause infection via inhalation to animal hosts (to cause infection via droplets or droplet nuclei that have entered the upper or lower respiratory tract)?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is the infectious dose (ID50) of this agent for this route less than 1000 or unknown in the animal host?	4 = Yes 2 = No 0 = If this is not an infectious route
Direct Contact	
Is this agent known to cause infection via direct contact in an animal host (to cause infection through the mucosal membranes)?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is the infectious dose (ID50) of this agent for this route less than 1000 or unknown in an animal host?	4 = Yes 2 = No 0 = If this is not an infectious route
Percutaneous	
Is this agent known to cause infection via percutaneous exposure in an animal host (to cause infection through compromised skin or direct injection into the blood stream)?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is the infectious dose (ID50) of this agent for this route less than 1000 or unknown in an animal host?	4 = Yes 2 = No 0 = If this is not an infectious route
Ingestion	
Is this agent known to cause infection via ingestion in an animal host (to cause infection via contact with the gastrointestinal tract)?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is the infectious dose (ID50) of this agent for this route less than 1000 or unknown in an animal host?	4 = Yes 2 = No 0 = If this is not an infectious route
Likelihood of Exposure	
Potential Exposure From Laboratory Processes	
Type of Material	
What type of material will be used in this procedure? (If the procedure will have both	4 = Purified biological materials 2 = Diagnostic samples (e.g. blood, urine, tissue, saliva, etc) 1 = Environmental samples (e.g. soil, water, etc)

purified material and diagnostic samples, select the purified material option)	
What is the greatest volume of material existing at one time in the procedure?	4 = Over 10 liters 2 = Up to 10 liters 1 = Milliliter volume
Inhalation Exposure	
What is the potential for aerosols to be generated as a byproduct of this procedure (e.g. pipetting, sonication, etc.)?	4 = A notable potential for the generation of aerosols may be produced 1 = A limited quantity of aerosols may be produced 0 = No procedures in use which may generate an aerosol
Are aerosolization experiments being conducted as part of this procedure?	4 = Large scale aerosolization experiments are being performed 3 = Small scale aerosolization experiments are being performed 0 = No aerosol experiments are being performed
Percutaneous Exposure	
What is the amount of sharps used in this procedure?	4 = A large volume of sharps in use (e.g. scalpels or needles in use at least daily in this procedure) 3 = A small volume of sharps in use (e.g. scalpels or needles rarely used for this procedure) 0 = There are no sharps in use
What is the amount of breakable material or items with sharp edges in this laboratory?	4 = A large amount of breakable material (e.g. glassware common in laboratory) 3 = A small amount of breakable material 0 = There is no breakable material in the laboratory
Contact Exposure	
How is contaminated waste stored in the laboratory?	4 = Contaminated waste is not stored properly (using standard containers) and is not handled according to best practices. 1 = Contaminated waste is stored properly and handled according to best practices 0 = There is no contaminated waste in laboratory
What is the potential and extent of a splash or spill in this procedure?	4 = There is a potential for a high pressure sustained release of infectious material 3 = There is a potential for a spill or splash of infectious material 0 = Material does not exist in a spill-able form in the laboratory
Decontamination	
What is the implemented process for the decontamination of equipment prior to maintenance?	4 = There is no decontamination of equipment prior to maintenance or repair 3 = Decontamination of equipment prior to maintenance or repair is performed, but not validated 0 = No equipment is maintained or repaired without decontamination, and the process is documented and validated
How easy are the surfaces in the laboratory to decontaminate?	4 = Surfaces are very difficult to decontaminate (e.g. wood, grout, etc) 2 = Some surfaces are difficult to decontaminate (e.g. edges) 0 = All surfaces can be decontaminated
Potential Exposure from Animals in Laboratory	

Animals Properties	
How many animals are in use in this procedure?	<p>4 = A large number of animals exist in the laboratory (e.g. more than 50 small animals or rodents, or more than 5 larger animals)</p> <p>3 = A small number of animals exist in the laboratory (e.g. less than 50 small animals or rodents, or less than 5 larger animals)</p> <p>0 = There are no animals in the laboratory</p>
What is the typical size of these animals?	<p>4 = Large animals (> 15 lbs)</p> <p>3 = Medium animals (5 to 15 lbs)</p> <p>3 = Arthropods</p> <p>1 = Small animals (< 5lbs)</p> <p>0 = There are no animals in the laboratory</p>
General Animals	
Are there more than one species of animal in use in the laboratory?	<p>4 = More than 2 different species in use</p> <p>2 = Only 2 species of animals in use</p> <p>1 = Only 1 species of animal in use this laboratory during the duration of this procedure</p> <p>0 = There are no animals in the laboratory</p>
Are animals which have the potential to shed infectious particles used in this procedure?	<p>0 = There are no animals in this laboratory</p> <p>3 = Animals are used, but not expected to shed infectious particles</p> <p>4 = Animals are used and can shed infectious particles (via sneezing, coughing, in saliva, in skin lesions, in urine, in feces, etc.)</p>
How much waste do the laboratory animals used in this procedure generate?	<p>4 = The animals generate large quantities of animal by-products/waste</p> <p>3 = The animals generate small quantities of animal by-products/waste</p> <p>0 = There are no animal by-products in the laboratory</p>
Biosafety Mitigation Measures	
Containment	
Are Biosafety cabinets used in this procedure?	<p>0 = Biosafety cabinets are not in use or not in existence</p> <p>1 = Biosafety cabinets exist, but are used only periodically - and/or</p> <p>1 = Biosafety cabinets exist, but no formal training programs or procedures are in place for their use - and/or</p> <p>1 = Biosafety cabinets exist, but they are not validated/certified on a regular basis (ideally, annually)</p> <p>4 = Biosafety cabinets are always used, they are routinely validated/certified, well- maintained, and there are procedures in place for proper use</p>
Is all the equipment used in this procedure with a potential to generate infectious aerosols (e.g. centrifuge, vortexer, sonicator) isolated or sealed in a manner to prevent aerosol escape (e.g. sealed rotor cups, equipment in BSC or in a biobubble, etc) prior to use?	<p>0 = Equipment is located and used on an open bench or in an open area and has no internal sealing mechanisms</p> <p>1 = Equipment is used in isolation or is internally sealed (e.g. used in a BSC, equipment uses sealed rotor cups, etc), but there are no formal procedures for use - and/or</p> <p>1 = Equipment is used in isolation (e.g. used in a BSC) or is internally sealed, but the mechanism has not been validated or certified</p>

	<p>4 = Equipment is always isolated/sealed and devices are validated/certified and well- maintained (Please leave blank if there is no aerosol-generating equipment in use for this procedure/laboratory)</p>
Are other forms of Primary Containment used in this procedure?	<p>0 = No primary containment devices are used for this procedure 1 = Primary containment devices exist, but are used only periodically - and/or 1 = Primary containment devices exist, but there is no formal training program or procedures in place for their use - and/or 1 = Primary containment devices exist, but they are not validated/certified on a regular basis 4 = Primary containment devices are always used in this procedure, are validated/certified, well-maintained, and there are procedures in place for proper use</p>
Are measures in place to reduce infectious aerosols exiting the laboratory?	<p>4 = All air exhausted from this laboratory is via well-maintained HEPA filters 3 = All air exhausted from this laboratory is via duct work which is not recirculated into other space 2 = All laboratory air is not recirculated, but not specifically exhausted via ducts 0 = Laboratory air is potentially circulated into other facility or community space</p>
How is sharp waste handled?	<p>4 = No sharp material ever leaves this laboratory 3 = Sharp waste is first decontaminated and then leaves the facility in puncture-resistant containers 1 = Sharp waste is first decontaminated and leaves the facility in non-puncture-resistant waste containers (e.g. plastic bags) 0 = Sharp waste is removed from the facility prior to decontamination</p>
PPE	
What types of gloves are used for this procedure?	<p>0 = Gloves are not typically worn 3 = A single or double pair of latex or nitrile type gloves are worn during the duration of the procedure 4 = A single or double pairs of latex or nitrile type gloves are worn and the outer most pair is changed after handling contaminated or potentially contaminated objects</p>
What type of protective clothing (PPE) is used in this laboratory?	<p>0 = Personnel wear street clothes in the laboratory and typically do not use gowns or lab coats. 3 = Gowns or lab coats are always worn over street clothes 4 = Personnel wear dedicated laboratory clothing (e.g. scrubs) which is not worn outside the laboratory, anteroom, or change room</p>
What type of protective eyewear is used in this laboratory?	<p>0 = No eyewear protection is typically used 1 = Personnel wear safety glasses 3 = Personnel wear goggles or a face shield 4 = Personnel wear goggles and a face shield</p>
What types of shoes are worn in the laboratory?	<p>0 = Persons can wear open-toe shoes in the laboratory 1 = Persons must wear closed-toed shoes 2 = Solid shoes are worn 3 = Shoe covers are worn over solid shoes, shoe covers are not worn outside laboratory, anteroom, or change room 4 = Laboratory-dedicated solid shoes are worn, shoes are never worn outside laboratory, anteroom, or change room</p>
Is respiratory protection used in this procedure? (surgical masks are not considered respiratory protection)	<p>0 = No respiratory protection exists or is in use 1 = Respirators (e.g. N95, N100, PAPR, Positive Pressure Suit, etc) are used (sometimes, often?) but there is no formal</p>

	<p>respiratory protection program (standardized fit testing or training) in place prior to use</p> <p>4 = Respirators are (always?) used and there is a formal respiratory protection/training program in place prior to use</p>
Are face shields or masks worn for this procedure?	<p>0 = Personnel do not wear any face protection</p> <p>3 = Surgical masks are used to protect mouth/nose from contact</p> <p>4 = Face shields are always used to protect the eyes/mouth/nose from contact</p>
Special Procedures	
Specific Animal Procedures	
Are animals housed in a manner that is isolated or sealed to prevent aerosol escape (e.g. isolator cages or cages inside a biobubble)?	<p>0 = Animals are housed in cages which are located in an open area and have no internal sealing/air filtering mechanism</p> <p>1 = Animals are housed in some form of isolator, but there are no formal procedures in place for its use</p> <p>1 = Animals are housed in some form of isolator, but the isolator is not regularly validated/certified.</p> <p>4 = Animals are housed in isolated or self-contained air-isolating devices which are validated/certified and well-maintained</p> <p>(Please leave blank if there are no animals in use for this procedure/laboratory)</p>
Are animals handled in isolation to prevent aerosol escape (e.g. in a BSC or handled inside a biobubble)?	<p>0 = Animals are handled in an open area</p> <p>1 = Animals are handled in some form of isolator, but there are no formal procedures in place for its use</p> <p>1 = Animals are handled in some form of isolator, but the isolator is not regularly validated/certified.</p> <p>4 = Animals are always handled in an air-isolating device (e.g. BSC) which is validated/certified and well-maintained</p> <p>(Please leave blank if there are no animals in use for this procedure/laboratory)</p>
Are animals transported in a manner that prevents aerosol escape (e.g. isolator cages)?	<p>0 = Animals are transported in open cages or no cages</p> <p>1 = Animals are transported in some form of isolator, but there are no formal procedures in place for its use</p> <p>1 = Animals are transported in some form of isolator, but the isolator is not regularly validated/certified.</p> <p>4 = Animals are transported in isolated or self-contained air-isolating devices which are validated/certified and well-maintained</p> <p>Please leave blank if there are no animals in use for this procedure/laboratory)</p>
Does this laboratory have animal handling procedures in place to reduce/eliminate exposures, which meet defined best practices?	<p>0 = Personnel are not specifically trained/taught how to minimize animal handling exposures</p> <p>1 = Proper practices for animal handling exist, but they are not taught, enforced, verified or documented</p> <p>4 = Proper practices for animal handling are identified in the laboratory procedures, are taught, and verified on a regular basis</p> <p>Please leave blank if there are no animals in use for this procedure/laboratory)</p>
Procedures	

<p>What types of gloves are in use while using sharps (e.g. needles, scalpels, etc) in this procedure?</p>	<p>0 = No gloves are typically worn while handling sharps 0 = A single pair of latex or nitrile type gloves are typically worn while handling sharps 1 = Two pairs of latex or nitrile type gloves are typically worn while handling sharps 4 = Heavy gloves (e.g. leather or thick rubber gloves) are typically worn while handling sharps</p>
<p>How are sharps handled in the laboratory?</p>	<p>0 = Sharps are always handled by hand 2 = Sharps are rarely handled by hand 4 = Sharps are never handled by hand directly (e.g. needles are not recapped, a mechanical system like forceps are used to remove needles and/or scalpel blades, etc)</p>
<p>Does this laboratory have procedures in place for sharps handling to reduce/eliminate percutaneous exposure that meet defined best practices?</p>	<p>0 = Personnel are not specifically trained how to minimize percutaneous exposures 1 = Proper practices for reducing percutaneous exposure exist, but are not taught, enforced, verified or documented 4 = Proper practices for reducing percutaneous exposure are identified in the laboratory procedures, are taught, and verified on a regular schedule</p>
<p>Does this laboratory have procedures in place for agent handling to reduce/eliminate aerosols? These procedures should meet defined best practices</p>	<p>0 = Personnel are not specifically trained how to minimize the production of aerosols 1 = Proper practices for reducing/eliminating aerosols exist, but are not taught, enforced, verified, or documented 4 = Proper practices for reducing/eliminating aerosols are identified in the laboratory procedures, are taught, and verified on a regular schedule</p>
<p>Are absorbent materials used on the bench or BSC to contain spills and reduce splashing?</p>	<p>0 = Absorbent material is never used 0 = Absorbent material is used on the bench or BSC but only replaced periodically 1 = Absorbent material is sometimes used 4 = Absorbent material is used for all procedures (on the bench or BSC) and disposed of after each use</p>
<p>After working with potentially contaminated material (cultures, infectious waste), how are objects that should not become contaminated (door handles, computer keyboards) handled?</p>	<p>0 = Hands are never decontaminated prior to handling "Clean" objects 4 = Hands are always decontaminated prior to handling "Clean" objects</p>
<p>Does this laboratory have procedures in place for spill response that meet defined best practices?</p>	<p>0 = The laboratory does not have spill response procedures in place 2 = The lab has basic spill response procedures in place, but does not conduct validation exercises on these procedures 4 = The lab has validated and exercised spill response procedures, including spill response kits (which contain appropriate PPE, cleaning items, and other required items), training on spill response, plans for validation of spill cleanup, spill response SOPs, and spill response decontamination mechanisms including waste validation.</p>
<p>Does this laboratory have procedures in place for lab workers to reduce/eliminate contact exposure through broken skin, that meet defined best practices?</p>	<p>0 = No procedures exist to reduce/eliminate contact exposure through broken skin 1 = Proper practices for reducing/eliminating contact exposure through broken skin exist, but are not taught, enforced, verified or documented 4 = Proper practices for reducing/eliminating contact exposure through broken skin are identified in the laboratory procedures and are taught and verified on a regular basis</p>
<p>How frequently are hands washed?</p>	<p>0 = No formal hand washing policies exist 2 = Hands are washed only when leaving the lab 4 = Hands are always washed frequently during the procedure (e.g. hands are washed between each procedure step)</p>

How is contaminated waste handled?	0 = Contaminated waste is safely and efficiently treated within lab 1 = Contaminated waste leaves lab for external treatment 4 = Contaminated waste is removed from lab and not treated
How is liquid waste (effluent) handled?	0 = Liquid waste is safely and efficiently treated within lab 1 = Liquid waste leaves lab for external treatment 4 = Liquid waste is removed from lab and not treated
Standard Procedures	
Are all biological agents in this laboratory inventoried?	0 = There is no inventory system at this laboratory 1 = This laboratory has a limited inventory system 4 = This laboratory has a complete and well-maintained inventory system
Is there a shipping and receiving program in place at this laboratory?	0 = There is no shipping and receiving program at this laboratory 1 = This laboratory has limited procedures in place for shipping and receiving 2 = This laboratory has some procedures in place for shipping and receiving, but lacks oversight in implementation 4 = This laboratory has an active shipping and receiving program, and well-defined procedures and plans in place
Are there procedures in place for preventative equipment maintenance to reduce/eliminate accidents or equipment failure, which meet defined best practices? These would include equipment calibration, validation, certification, etc.	0 = There is no equipment maintenance program at this laboratory 1 = This laboratory has limited procedures in place for equipment maintenance, but maintenance is generally reactive rather than preventative 2 = This laboratory has some procedures in place for maintenance, but lacks oversight in implementation 4 = This laboratory has an active preventative equipment maintenance program, and well-defined procedures and plans in place
Are there standard operating procedures in place for unexpected or catastrophic incidents, including the release of or exposure to an infectious agent (e.g. Incident response plans)?	0 = There is no incident response program at this laboratory 1 = This laboratory has limited procedures in place for incident response, but maintenance is generally reactive rather than preventative 2 = This laboratory has some procedures in place for incident response, but lacks oversight in implementation 4 = This laboratory has an active incident response program, and well-defined procedures and plans in place
Is there a formal personal protective equipment (PPE) program in place?	0 = There is no PPE program at this laboratory 1 = This laboratory has a limited PPE program in place 2 = This laboratory has some procedures in place for PPE, but lacks oversight in implementation 4 = This laboratory has an active PPE program which includes, well-defined procedures for donning, doffing, storing, and maintaining PPE
Does this laboratory implement standard good laboratory practices for safety?	0 = This laboratory does not have established procedures in place which includes standard good laboratory practices 1 = This laboratory has limited established procedures in place which include standard good laboratory practices 2 = This laboratory has some procedures in place which include standard good laboratory practices, but lacks oversight in implementation 4 = This laboratory has an active good laboratory practice program and well-defined procedures that employees are familiar with and implement

Management	
Does the institution have defined roles and responsibilities for biosafety?	<p>0 = There is no identification of, or education on, biosafety roles and responsibilities</p> <p>2 = Facility personnel are educated on their biosafety roles and responsibilities</p> <p>3 = A biosafety officer is identified at this facility</p> <p>4 = Management at this facility ensures roles, responsibilities, and authorities are defined, documented, and communicated</p>
Has the institution made a commitment to safety?	<p>0 = Management at this facility is not aware, or interested in, biosafety concerns</p> <p>1 = Management at this facility is aware of biosafety concerns, but has not implemented a biosafety policy or devoted resources to address the issue</p> <p>2 = Management at this facility have made some efforts to improve biosafety at the facility, but they are not comprehensive and/or are not fully implemented</p> <p>3 = This facility has a comprehensive biosafety policy in place, which was developed, authorized, and signed by top management. The policy is appropriate to the nature and scale of the risk. Management establishes the commitment and objectives of the biosafety system, and communicates this to all stakeholders.</p> <p>4 = Management at this facility identifies and prioritizes program needs and allocates funds as necessary</p>
Does the institution have comprehensive biosafety documentation?	<p>0 = This facility has no biosafety policies, manuals, or SOPs</p> <p>1 = This facility has no specific biosafety documentation</p> <p>2 = This facility has some biosafety documentation, but they are not comprehensive and / or not fully implemented</p> <p>3 = This facility has biosafety policies, manuals, and SOPs</p> <p>4 = This facility's biosafety documentation also includes risk assessment and incident response information</p>
Does the institution conduct biosafety drills or exercises?	<p>0 = This facility does not conduct any biosafety exercises</p> <p>1 = This facility conducts tabletops or other exercises on an ad hoc basis</p> <p>2 = This facility conducts annual exercises</p> <p>4 = This facility includes external responders in their exercises</p>
Does the institution periodically review the biosafety program?	<p>0 = There is no review of the biosafety program</p> <p>1 = The biosafety program is reviewed and revised as necessary after any incidents or near-incidents</p> <p>3 = The biosafety program is subject to internal self-assessments</p> <p>4 = Management at the facility ensures continual improvement, conducts routine self-assessments, and ensures corrective and preventive actions. Reviews include assessing opportunities for improvement and any needs for changes to the system, procedures, policies, and objectives.</p>
Consequence of Disease	
Consequence of Disease to Humans	
Agent Characteristics	

Does this agent or one of its by-products cause a carcinogenic or mutagenic reaction in a human host?	4 = Yes 2 = Unknown 0 = No
Does this agent have toxin or enzyme production which has a negative impact in a healthy human host?	4 = Yes 2 = Unknown 0 = No
Does this agent suppress a human host's immune system? (E.g. cause dramatic suppression which renders the host unable to respond to other infections)	4 = Yes 2 = Unknown 0 = No
Does this agent have the ability to alter once in a host or in the natural environment to become infectious through new route or new hosts, or to cause increased consequences?	4 = Yes 2 = Unknown 0 = No
Morbidity	
What is the duration of illness (the average length of time of clinical signs of infection) in a normally healthy human host?	4 = long duration (months or more) 3 = moderate duration (week(s)) 1 = short duration (days) 0 = No signs of infection
What is the severity of illness (the average severity of illness, ranging from no signs of illness to hospitalized in critical condition) in a normal health human host?	4 = Extreme sign of disease (mechanical assistance required to sustain life or death imminent) 3 = High sign of disease (not able to function (hospitalized)) 2 = Moderate sign of disease (able to function in a limited manner (bed rest)) 1 = Low sign of disease (able to function but showing symptoms) 0 = No sign of disease
What is the duration of infection (the length of time the host is infected with the organism) in a normal healthy human host?	4 = Infection present for life of host 3 = Infection present post clinical signs for months 2 = Infection present post clinical signs for weeks 1 = Infection present if clinical signs 0 = No sign of disease
Does this disease cause any long-term conditions (sequelae) in a normal healthy human host?	4 = High long-term impact which renders the host unable to function normally 2 = Moderate long-term impact which hinders the hosts ability to function normally 1 = Mild long-term impacts do not impede the hosts ability to function normally 0 = No long term impact
Mortality	
What is the frequency of death in humans caused by this disease in a defined population during a specified interval of time (Mortality Rate)?	4 = High mortality (75% or more) 2 = Medium mortality (15% to 74%) 1 = Low mortality (1% to 14%) 0 = No Mortality (0%)
Mitigation	
Do effective diagnostic tests exist for humans?	0 = No 2 = Unknown 4 = Yes
Do post exposure treatments (including immunoglobulin, vaccines and anti-microbials) exist for humans?	0 = None exist 2 = Exist, but are only considered partially effective 4 = Effective post exposure treatments exist

Do preventative measures (vaccines) exist for humans?	0 = No preventative measures exist 2 = Exist, but are only considered partially effective (will not prevent but will limit the impact of the disease) or (are only effective in a small population) 4 = Effective preventative measures exist
Consequence of Disease to Animals	
Morbidity	
If the agent infects animals, what is the expected morbidity rate to a naïve but otherwise healthy animal population?	4 = High Morbidity (> 75%) 3 = Moderate Morbidity (25% to 75%) 1 = Low Morbidity (1% to 25%) 0 = Very Low Morbidity (< 1%)
Species	
What species of animals can this agent infect?	4 = Affects multiple, significant agricultural species which are used for export and/or the by-products are a major source of protein for our country 3 = Affects a single but significant livestock species which is used for export and/or the by-products are a major source of protein for our country 2 = Affects a less significant livestock species which is used for export and/or the by-products are a source of protein for our country 0 = Affect a livestock species which has no economic impact in our country
Mitigation	
Do effective diagnostic tests exist for animals?	0 = No 2 = Unknown 4 = Yes
Do post exposure treatments (including immunoglobulin, vaccines and anti-microbials) exist for animals?	0 = None exist 2 = Exist, but are only considered partially effective 4 = Effective post exposure treatments exist
Do preventative measures (vaccines) exist for animals?	0 = No preventative measures exist 2 = Exist, but are only considered partially effective (will not prevent but will limit the impact of the disease) or (are only effective in a small population) 4 = Effective preventative measures exist
Secondary Consequence of Disease to Humans	
Routes	
Is this agent known to cause infection via inhalation in humans (to cause infection via droplets or droplet nuclei that have entered the upper or lower respiratory tract) in the natural environment?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is this agent known to cause infection via percutaneous exposure in humans (to cause	4 = Preferred Route 2 = A possible route

infection through compromised skin or direct injection into the blood stream) in the natural environment?	1 = Unknown 0 = Not a route
Is this agent known to cause infection via direct contact in humans (to cause infection through the mucosal membranes) in the natural environment?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is this agent known to cause infection via ingestion in humans (to cause infection via contact with the gastrointestinal tract) in the natural environment?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is this agent known to cause infection via vector-borne transmission in humans (to cause infection by direct mucosal membrane contact or percutaneous exposure from a vector (e.g. arthropod))?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is this agent known to cause infection via vertical transmission in humans (to cause infection from mother to fetus in the womb or via ingestion of infected breast milk)?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is this agent known to cause infection via sexual transmission in humans (to cause infection through sexual contact including intercourse)?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Transmission	
How easily does this agent transmit between human hosts?	4 = Agent can easily transmit between human hosts 2 = Agent is transmissible between human hosts via close contact only (direct fluid transmission between hosts) 2 = Human to human transmission suspected 0 = Human to human transmission has never been demonstrated
How easily does this agent transmit from animal to human hosts?	4 = Agent can easily transmit from animals to humans 2 = Agent is transmissible from animals to human hosts via close contact only (direct fluid transmission between hosts) 2 = Animal to human transmission suspected 0 = Animal to human transmission has never been demonstrated
How easily does this agent transmit from human to animal hosts?	4 = Agent can easily transmit from humans to animals 2 = Agent is transmissible from humans to animals via close contact only (direct fluid transmission between hosts) 2 = Human to animal transmission suspected 0 = Human to animal transmission has never been demonstrated
Stability	
What is this agent's stability outside of a host?	1 = Agent not stable outside the host 2 = Agent stable on interior surfaces for days to weeks 3 = Agent stable in the exterior environment for days to weeks 4 = Agent stable in the environment for months
Reportability	
What level of national or international reporting is required for outbreaks of this disease?	4 = Internationally Reportable 2 = Nationally Reportable 0 = Not Reportable

Secondary Consequence of Disease to Animals	
Routes	
Is this agent known to cause infection via vector-borne transmission (to cause infection by direct mucosal membrane contact or percutaneous exposure from a vector (e.g. arthropod))?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is this agent known to cause infection via vertical transmission in an animal host (to cause infection from mother to fetus in the womb or via ingestion of infected breast milk)?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Is this agent known to cause infection via sexual transmission in an animal host (to cause infection through sexual contact including intercourse)?	4 = Preferred Route 2 = A possible route 1 = Unknown 0 = Not a route
Transmission	
How easily does this agent transmit from animal to human hosts?	4 = Agent can easily transmit from animals to humans 2 = Agent is transmissible from animals to human hosts via close contact only (direct fluid transmission between hosts) 2 = Animal to human transmission suspected 0 = Animal to human transmission has never been demonstrated
How easily does this agent transmit from human to animal hosts?	4 = Agent can easily transmit from humans to animals 2 = Agent is transmissible from humans to animals via close contact only (direct fluid transmission between hosts) 2 = Human to animal transmission suspected 0 = Human to animal transmission has never been demonstrated
How easily does this agent transmit between animal hosts?	4 = Agent can easily transmit between animal hosts 2 = Agent is transmissible between animal hosts via close contact only (direct fluid transmission between hosts) 2 = Animal to animal transmission suspected 0 = Animal to animal transmission has never been demonstrated
Stability	
What is this agent's stability outside of a host?	1 = Agent not stable outside the host 2 = Agent stable on interior surfaces for days to weeks 3 = Agent stable in the exterior environment for days to weeks 4 = Agent stable in the environment for months
Reportability	
What level of national or international reporting is required for outbreaks of this disease?	4 = Internationally Reportable 2 = Nationally Reportable 0 = Not Reportable