



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Instituto de Química

Aline Louzada Santos Barreira

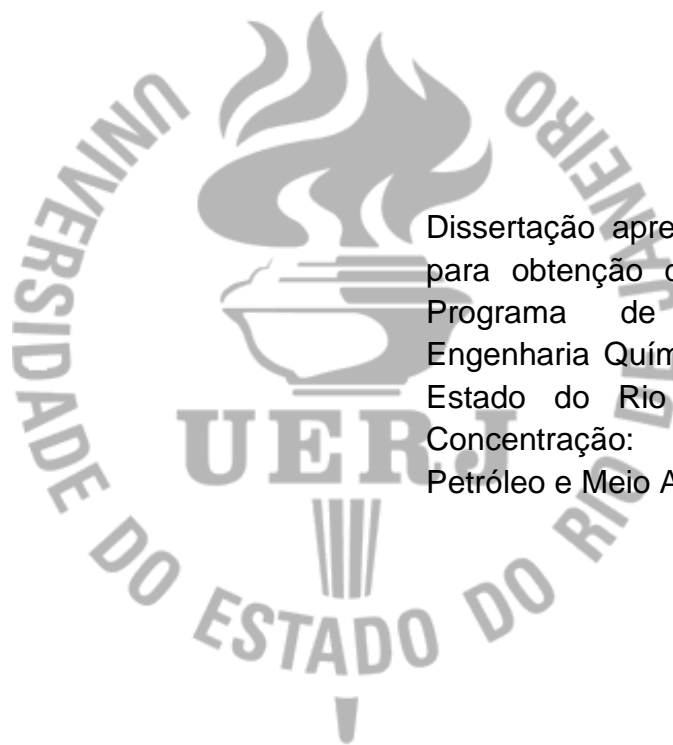
**Validação dos processos envolvidos na obtenção
do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b
conjugado com toxóide tetânico utilizado para produção de
vacina**

Rio de Janeiro

2013

Aline Louzada Santos Barreira

Validação dos processos envolvidos na obtenção do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide tetânico utilizado para produção de vacina



Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Orientadores: Prof. Dr. Antônio Carlos Augusto da Costa
Prof. Dr. Aderval Severino Luna

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

S237

Santos, Aline Louzada.

Validação dos processos envolvidos na obtenção do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide tetânico utilizado para produção de vacina. / Aline Louzada Santos. - 2013.

118 f.

Orientador: Antônio Carlos Augusto da Costa.

Orientador: Aderval Severino Luna.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Vacinas - Teses. 2. Validação de processos – Teses. 3. *Haemophilus influenza* – Teses. I. Costa, Antonio Carlos Augusto da. II. Luna, Aderval Severino. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 614.37

Autorizo, apenas para fins acadêmicos ou científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura Data

Aline Louzada Santos Barreira

Validação dos processos envolvidos na obtenção do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide tetânico utilizado para produção de vacina

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovado em 17 de julho de 2013

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa (Orientador)
Instituto de Química - UERJ

Prof. Dr. Aderval Severino Luna (Orientador)
Instituto de Química - UERJ

D.Sc. Rodrigo Coelho Ventura Pinto
Bio-Manguinhos - FIOCRUZ

D^{ra}. Jaline Coutinho Silverio
Bio-Manguinhos - FIOCRUZ

Prof^a. D^{ra}. Marta Antunes Pereira Langone
Instituto de Química - UERJ

Rio de Janeiro

2013

A minha princesa Ana Clara
Aos meus pais, Sérgio e Mariléia
Ao meu marido Luciano
por estarem ao meu lado neste momento importante e
me amarem incondicionalmente

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, pela luz e direção nesta árdua jornada de longos 2 anos, onde desistir era o mais fácil dos caminhos, mais ele me fortaleceu e eu venci.

Aos meus pais Mariléia e Sérgio, pela ajuda na superação dos momentos difíceis, pelo incentivo de sempre aos estudos, e mesmo com tão pouca instrução, eles sempre estiveram ao meu lado nem que fosse para dizer uma simples frase, porém muito especial: Vai dar tudo certo!

A minha avó Judith, que sempre torceu e pediu muito a Deus por mim, pela ajuda e incentivo aos estudos deste a minha infância e por compreender minha ausência durante a dedicação ao mestrado.

A minha madrinha Márcia Louzada, que sempre torceu e me incentivou aos estudos para eu ser uma pessoa melhor. Pela referência profissional que ela sempre me foi se tornando um espelho pra mim, quando eu era ainda pequenina.

Aos meus orientadores Prof. Dr Antônio Carlos Augusto da Costa e Prof. Dr. Aderval Severino Luna pela paciência e compreensão da pesada tarefa de conciliar o mestrado com as atividades profissionais. Todas as críticas, ajudas e sugestões foram de extrema importância para a finalização deste trabalho.

À minha amiga, madrinha e “parceira” Alessandra Casaes, talvez nem ela saiba, mas foi ela quem me deu a maior força para ir até o fim. Certo dia, ela me mandou um e-mail no fim de semana dizendo que ia desistir do mestrado, eu quase pirei, me senti só diante do “monstro” chamado Mestrado em Engenharia Química, chorei quase o fim de semana todo, mas na segunda-feira decidi! Vou lutar, vou me desdobrar e vou conseguir! O seu momento e a sua vez também vai chegar amiga!

Aos meus amigos especiais Frank Fairbairn e Bárbara Schangarelli pela amizade de sempre, pela palavra amiga nos momentos de tristeza, por compreender meus anseios e medos (ele já passou por isso e ela está passando...). Obrigada por dividir as alegrias e tristezas na mesma intensidade!

À minha chefe Rita de Cássia Benedetti pela oportunidade inigualável, pelo incentivo e confiança de que eu seria capaz de cursar o mestrado junto com as minhas atividades profissionais.

À minha ex-chefe Rosane Cuber e ao meu atual chefe Vinicius Peçanha, por sempre compreender minhas ausências durante o curso, por acreditar que eu conseguiria conciliar o mestrado com as atividades profissionais e por concretizar meus anseios profissionais.

À equipe do Departamento de Bacterianas em especial Felipe Rodrigues e Thais Alves, a equipe da Seção de Validação de Processos em destaque Roberta do Sol pelo apoio ao trabalho, por toda contribuição técnica, e pela competência e responsabilidade no desenvolvimento das suas atividades profissionais. Com certeza a contribuição de vocês foi primordial para a finalização desta dissertação.

Este trabalho foi árduo e talvez o mais desafiador da minha vida profissional! Mas, tudo foi recompensado pelo sorriso inocente da minha princesa Ana Clara. Um agradecimento especial por tentar compreender a minha ausência sem me deixar perceber que isso te entristecia, pelas viagens que deixei de fazer em família, pelas tarefas da escola que eu não tive paciência em desenvolver com você porque eu precisava estudar, pelas festinhas que abdiquei de te levar porque eu precisava escrever a dissertação e por me amar sempre. Eu te amo filha incondicionalmente e dedico a você este trabalho!

Dentre as pessoas que eu já agradei com certeza ainda falta a mais especial, meu marido Luciano Barreira. Não foi a toa que te escolhi para compartilhar de todos os momentos da minha vida. Nem na pior fase das nossas vidas você deixou de acreditar no meu potencial. Obrigada por ter confiado em mim e me dado o suporte que eu precisava com a nossa filha para que eu tivesse a oportunidade de chegar até o fim. Sem sombra de dúvidas você é meu porto seguro, Te Amo para toda vida!

Aos membros da banca por aceitarem o convite.

RESUMO

BARREIRA, A. L. S. *Validação dos processos envolvidos na obtenção do polissacarídeo capsular de Haemophilus influenzae tipo b conjugado com toxóide tetânico utilizado para produção de vacina*. 2013. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Haemophilus influenzae tipo b (Hib) é a principal causa de pneumonia bacteriana e meningite em crianças com menos de 5 anos de idade. A doença pode ser prevenida através da vacinação com uma vacina conjugada polissacarídeo-proteína, uma vez que a vacina de polissacarídeo não é eficaz. Desde 1999, o Ministério da Saúde incluiu a vacina conjugada Hib na rotina do calendário de imunização para crianças rotineiramente. Sendo este um processo de grande importância para as pessoas e demanda de produção significativa para o governo brasileiro, é necessário que os processos estejam de acordo com as normas nacionais e internacionais de regulamentação e devem ser validados. Uma operação validada assegura a produção de lotes uniformes que atendem as especificações exigidas, conseqüentemente, garantindo ao fabricante a capacidade de proporcionar um produto de qualidade. O trabalho propõe o desenvolvimento de uma metodologia que evidencie e garanta o processo de produção de um conjugado de polissacarídeo-proteína pelo método de conjugação química e que será produzido de forma consistente e de acordo com as suas especificações pré-definidas. Os atributos de qualidade garantem o não desabastecimento da vacina *Haemophilus influenzae* tipo b por desvios de processo, o que contribui com aumento do valor agregado ao produto em questão. Portanto, a metodologia de validação foi aplicada ao estudo de validação. O estudo baseou-se em três etapas. A primeira foi baseada em análise de parâmetros do processo de conjugação química para mapear e estabelecer intervalos críticos de controle quanto a estes parâmetros, a segunda fase foi realizada com a produção de três lotes consecutivos, em escala industrial, com monitorização regular dos parâmetros críticos mapeados anteriormente. A fase final consistiu em amostras recolhidas, em tempo pré-determinado, durante o processo de produção e de controle do produto final em tamanho 50% a mais que na rotina de produção. Estas amostras foram analisadas utilizando os métodos de análise que foram anteriormente validados, a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados. A robustez do processo foi assegurada uma vez que todos os parâmetros do processo avaliados apresentaram resultados dentro do padrão de conformidade com os resultados de controle determinados durante o processo, e no produto final para a população de amostragem dentro de especificações definidas pelas metodologias analíticas validadas garantindo os resultados. O trabalho proposto assegura status de processo validado para o conjugado polissacarídeo-proteína com excepcionais rendimentos obtidos, combinado com características químicas bem definidas.

Palavras-chave: Validação. Vacina conjugada. *Haemophilus influenzae* tipo b.

ABSTRACT

BARREIRA, A. L. S. *Processes validation involved in obtaining of capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae b with tetanus toxoid conjugate used for vaccine production.* 2013. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Haemophilus influenzae type b (Hib) is a primary cause of bacterial pneumonia and meningitis in children under 5 years of age. The disease can be prevented by immunization with a population of polysaccharide-protein conjugate vaccine, once the polysaccharide vaccine is not effective. Since 1999, the Ministry of Health included the Hib conjugate vaccine in the routine immunization schedule children routinely. Since this is a production process of importance to people and significant demand for the Brazilian government, it is required under rules that national and international regulatory processes of this kind should be validated. An operation validated ensures the production of uniform batches that attend the required specifications, consequently generating to the manufacturer charge of providing a quality product. The work proposes the development of a methodology that provides evidence that the process and ensures the production of a polysaccharide-protein conjugate by chemical conjugation method will be produced consistently and according to its predefined specifications. The quality attributes, guaranteeing, not the lack of *Haemophilus influenzae* type b by process deviations, which would cause increased value added to the product in question. Therefore, the validation methodology was applied to the validation study. The study was based on three stages. The first one was based on examination of chemical conjugation process parameters for mapping and establishing critical control ranges for these parameters; the second phase was carried out with the production of three consecutive batches on an industrial scale with regular monitoring of critical parameters mapped previously. The final stage consisted in collected samples, at predetermined time, during the process management and control of the final product in a lot 50% higher than in the routine production. These samples were analyzed using research methods that they have been validated before to ensure reproducibility of the results. The robustness of the process was ensured since all process parameters evaluated showed results within the compliance standard determined with results of in-process control and final product for the population sampled within specifications defined by analytical methodologies validated ensuring the results. The proposed work secured status validated process for polysaccharide-protein conjugate with exceptional yields obtained and combined with well-defined chemical characteristics.

Keywords: Validation. Conjugate Vaccine. *Haemophilus influenzae* type b.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	Água deionizada
ADH	Diidrazida do ácido adípico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CFR	Code of Federal Regulation
CNBr	Brometo de cianogênio
DTP	Difteria, tétano e pertussis
EDAC	1-etil-3(dimetilaminopropil)carbodiimida
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FCC	Fração correspondente ao meio não conjugado
FDA	Food and drug administration
FEI	Fração eluída de interesse (Polissacarídeo conjugado purificado)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Hib	Haemophilus influenzae tipo b
ICH	International Conference for Harmonization
KDa	KiloDaltons
mAU	Unidade de absorvância
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMT	Proteína monomérica tetânica
PRP	Poliribosil-ribitol-fosfato
PRP-ADH	Polissacarídeo de Hib derivatizado com ADH
PRP-ADH-TT	Polissacarídeo de Hib conjugado com toxóide tetânico
PRP-OMP	Vacina conjugada de polissacarídeo de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b com proteína de membrana externa
PS-TT	Concentrado vacinal de Hib
QI	Qualificação de Instalação
QD	Qualificação de desempenho
QO	Qualificação de Operação
RDC	Resolução da diretoria colegiada
TDif	Toxóide diftérico
TD	timo dependente
TI	timo independente
TT	Toxóide Tetânico
WFI	Water for injection” (Água para injetáveis)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Colônias de Hib em meio Agar Chocolate. Cultivo de 24 horas, à 37 °C, 5% CO ₂ , encontrada na saliva de paciente com pneumonia.....	21
Figura 2-	Estrutura do polissacarídeo capsular de <i>Haemophilus Influenzae</i> tipo b	23
Figura 3-	Resposta imune T-independente e T-dependente às vacinas polissacarídica (A) e conjugada (B). O polissacarídeo liga-se aos receptores presentes na superfície dos linfócitos B, induzindo a produção de anticorpos. No caso da vacina conjugada, ocorre uma interação entre os linfócitos B e T, com liberação de citocinas que estimulam a produção de anticorpos contra a porção polissacarídica do antígeno além da produção de células de memória imunológica.....	27
Figura 4-	Reação de conjugação pelo método da carbodiimida. Os ácidos carboxílicos reagem com EDAC, gerando O-áciluréia, um intermediário ativo. Em presença de um nucleófilo, como, por exemplo, uma amina primária, há a formação do composto com ligação amídica e de isouréia (subproduto).....	29
Figura 5-	Conjugação do polissacarídeo de Hib pelo método da carbodiimida. O polissacarídeo é ativado através de reação com o brometo de cianogênio (CNBr), gerando um intermediário ao qual, posteriormente são adicionados grupamentos amino, a partir da reação com a diidrazida do ácido adípico (ADH). Os grupos carboxílicos da molécula protéica são ativados com o EDAC e conjugados aos grupamentos amino introduzidos no polissacarídeo.....	30
Figura 6-	Método de conjugação para obtenção da vacina PS-TT. (1) PRP poliribosilribitol fosfato. (2) Brometo de cianogênio (CNBr). (4) Diidrazida do ácido adípico (ADH). (5) PRP derivatizado com ADH. (6) Proteína Toxóide Tetânico (TT). (7) Conjugado final PRP-ADH-TT.....	34
Figura 7-	Modelo de validação de processo.....	42
Figura 8-	Reator de conjugação e ativação.....	46
Figura 9-	Controlador de pH do reator de ativação.....	47
Figura 10-	Titulador automático Titrino.....	48
Figura 11-	Bioprocess System.....	49
Figura 12-	Tanque de coleta.....	49
Figura 13-	Sistema de filtração tangencial.....	51
Figura 14-	Esquema da reação de ativação.....	51
Figura 15-	Reação de ativação. O polissacarídeo é ativado através de reação com o brometo de cianogênio (CNBr), gerando um intermediário ao qual, posteriormente são adicionados grupamentos amino, a partir da reação com a diidrazida do ácido adípico (ADH). Figura também mostra as reações indesejadas do éster: hidrólise e rearranjos.....	52
Figura 16-	Reação de conjugação. A proteína (PMT) reage com o ácido carboxílico derivatizado em presença do reagente EDAC,	

	gerando um composto com ligação amídica e um derivado isouréia (subproduto).....	53
Figura 17-	Fluxograma do método de conjugação.....	54
Figura 18-	Fluxograma para avaliação do método de validação apropriado..	55
Figura 19-	Fluxograma de etapas da validação prospectiva.....	56
Figura 20-	Curva de pH durante a reação de ativação.....	61
Figura 21-	Reações indesejadas do Isocianato: hidrólise e rearranjos.....	62
Figura 22-	Reações do imidocarbonato.....	62
Figura 23-	Representação da placa de 96 poços e esquema de análise	72
Figura 24-	Cromatogramas de purificação dos lotes 1, 2 e 3 de PRP-TT purificado das três corridas de validação.....	89
Figura 25-	Resultados obtidos nas 3 diafiltrações. (a) grupo de resultados em duplicata das três corridas somente da 1 ^a diafiltração. (b) grupo de resultados em duplicata das três corridas somente da 2 ^a diafiltração. (c) grupo de resultados em duplicata das três corridas somente da 3 ^a diafiltração.....	94
Figura 26-	Resultados de polissacarídeo livre obtidos no estudo de estabilidade de longa duração para a Vacina contra <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (conjugada).....	99
Figura 27-	Resultados de polissacarídeo livre obtidos no estudo de estabilidade de longa duração para o concentrado Vacinal de Hib.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Vacinas conjugadas de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.....	35
Tabela 2-	Parâmetros críticos de processo.....	57
Tabela 3-	Atributos de qualidade para o produto.....	59
Tabela 4-	Critérios de aceitação parâmetros de processo.....	65
Tabela 5-	Critérios de aceitação atributos de qualidade para o produto.....	67
Tabela 6-	Resultado do monitoramento dos parâmetros críticos de processo para ativação.....	78
Tabela 7-	Controle de pH do meio reacional durante a reação de ativação.....	81
Tabela 8-	Resultado do monitoramento dos parâmetros críticos de processo para conjugação.....	84
Tabela 9-	Controle de pH do meio reacional durante a reação de conjugação...	85
Tabela 10-	Resultados obtidos para os atributos de qualidade para o produto.....	91
Tabela 11-	Resultado da razão PS/PT na molécula.....	95
Tabela 12-	Resultado de polissacarídeo livre no concentrado vacinal e na vacina final.....	98

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	21
1.1	Histórico	21
1.2	Micro-organismo <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	22
1.3	A doença causada pela bactéria Hib	23
1.4	Vacinas de subunidades	26
1.5	Vacinas conjugadas	26
1.6	Eficácia e estabilidade das vacinas conjugadas	28
1.6.1	<u>Métodos de conjugação</u>	28
1.6.2	<u>Natureza da proteína carregadora</u>	31
1.6.3	<u>Tamanho da cadeia polissacarídica</u>	31
1.6.4	<u>Presença da molécula espaçadora</u>	32
1.6.5	<u>Proporção polissacarídeo/proteína</u>	33
1.7	Processo de obtenção da vacina conjugada contra Hib	33
1.8	Aplicabilidade da vacina Hib no Brasil	35
1.9	Qualidade na indústria farmacêutica	36
1.9.1	<u>Fundamentos da validação de processos</u>	39
2	MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1	Equipamentos principais	46
2.1.1	<u>Reator</u>	46
2.1.2	<u>Controlador de pH do reator</u>	46
2.1.3	<u>Titulador automático Titrino</u>	47
2.1.4	<u>Sistema de cromatografia</u>	48
2.1.5	<u>Tanque</u>	49
2.2	Procedimento	50
2.2.1	<u>Reação de ativação</u>	50
2.2.2	<u>Reação de conjugação</u>	52
2.2.3	<u>Metodologia de validação adotada</u>	54
2.2.4	<u>Seleção dos pontos críticos de controle</u>	59
2.2.4.1	Controle das variáveis de interesse durante o processo de ativação.....	60
2.2.4.2	Controle das variáveis de interesse durante o processo de conjugação.....	62
2.2.5	<u>Purificação do conjugado PRP-ADH-TT bruto</u>	63
2.2.6	<u>Definição dos pontos de amostragens</u>	64
2.2.7	<u>Crítérios de aceitação</u>	65
2.3	Metodologias analíticas	68
2.3.1	<u>Determinação do conteúdo de polissacarídeo – Método colorimétrico orcinol</u>	68
2.3.2	<u>Determinação da concentração de ADH</u>	68
2.3.3	<u>Determinação do percentual de ADH livre</u>	69
2.3.4	<u>Determinação da concentração de proteínas</u>	69
2.3.5	<u>Determinação da taxa de conjugação</u>	70
2.3.6	<u>Determinação da distribuição da massa molar (%kDa)</u>	70
2.3.7	<u>Determinação de polissacarídeo livre</u>	71
2.3.8	<u>Determinação de proteína livre</u>	72
2.3.9	<u>Determinação da taxa de ativação</u>	73
2.3.10	<u>Determinação de EDAC</u>	73

2.3.11	<u>Determinação de cianeto</u>	73
2.3.12	<u>Determinação de pH</u>	74
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1	Obtenção do concentrado vacinal de Hib.....	75
3.1.1	<u>Avaliação da operação</u>	75
3.1.2	<u>Qualificação do titulador automático Titrimo e sistema de cromatografia Bioprocess</u>	76
3.2	Monitoramento dos parâmetros críticos de processo	77
3.3	Monitoramento dos atributos de qualidade do produto	90
	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXO A – Método aaminação redutiva com formação da base de Schiff.....	112
	ANEXO B – Avaliação da Operação.....	113
	ANEXO C – Avaliação da qualificação dos equipamentos principais....	114
	ANEXO D – Avaliação qualificação/ calibração demais instrumentos utilizados.....	115
	ANEXO E - Resultado do monitoramento dos parâmetros críticos de processo para as diafiltrações tangenciais.....	117
	ANEXO F – Resultado do monitoramento dos parâmetros críticos de processo para purificação e finalização do conjugado.....	118
	ANEXO G – Avaliação da validação das metodologias analíticas utilizadas.....	119

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos produzir com qualidade tem sido fundamental na busca da excelência para as indústrias de um modo geral. Todos os caminhos levam à busca da qualidade total e torna-se indispensável conhecer perfeitamente cada fase de um processo produtivo. É imprescindível que se trabalhe de forma adequada e que se garanta o seu produto final, a fim de se demonstrar o grau de confiabilidade de um determinado produto que será disponibilizado ao cliente ou consumidor em geral. As competências de uma indústria devem ir além da produção, deve haver um investimento contínuo em ferramentas de qualidade avançadas que possam garantir os processos de produção. O cumprimento dos requerimentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF), assim como a certificação de qualidade nos diversos setores dentro de uma empresa faz a diferença para a competitividade tecnológica e sobrevivência no mercado atual para qualquer companhia.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) alega que qualidade e produtividade são fatores essenciais para a competitividade e deve ser preocupação constante dos setores produtivos. A busca incessante pela qualidade por anos fez com que tal abordagem se modificasse muito ao longo do tempo, porém até hoje é fator chave de sucesso. O sistema de qualidade objetiva dar o suporte para que os produtos estejam adequados ao seu uso indicado.

Para uma indústria produtora de imunobiológicos, o padrão de qualidade exigido é muito alto, o produto final (aquilo que será produzido) terá impacto direto na vida de crianças e até mesmo de adultos. Por este motivo, órgãos reguladores como a ANVISA e a Organização Mundial de Saúde (OMS) propõem resoluções que devem ser seguidas a fim de garantir o que se está produzindo e o que será proposto à sociedade. Segundo o que é preconizado por estes órgãos, os aspectos da validação são essenciais e devem ser utilizados como ferramenta principal para busca da qualidade total. A aplicação desta ferramenta garante a confiabilidade das utilidades, instalações, dos equipamentos e, principalmente, dos processos de produção (ANVISA, 2006).

A Validação, segundo a OMS, é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados esperados.

Para a *Food and Drug Administration* (FDA), a validação de um processo fundamenta-se em estabelecer, através de evidências objetivas, que um processo produz de forma consistente um resultado ou produto dentro de suas especificações pré-determinadas. Em outras palavras, seria a evidência documentada, clara e evidente de que se pode confiar com um alto nível de segurança de que um processo encontra-se estável a ponto de fazer aquilo que propõe rotineiramente de forma consistente e dentro das especificações e atributos de qualidade preestabelecidos (FDA, 1987).

De acordo com Moretto (1998), a indústria farmacêutica deve se responsabilizar pela qualidade dos produtos farmacêuticos, assegurando a adequabilidade dos mesmos com relação aos fins para os quais tenham sido produzidos. Além disso, deve cumprir com as exigências relativas ao registro, não colocando os pacientes em risco, em função de sua inadequabilidade em termos de segurança, qualidade ou eficácia.

Validar um processo significa garantir que o produto seja sempre fabricado da mesma forma, com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância rigorosamente pré-estabelecidos (ATHAIDE, 2000; MORETTO, SHIB, 2000; EMANUELLI, SCANDIUZZI, 2000). Portanto, está claramente definido que validar processos se torna cada vez mais necessário ao cenário atual, uma vez que produzir de forma consistente garante ao produtor inúmeras vantagens. Dentre estes benefícios, podem ser relacionados a redução de custos com desvios de processo, a manutenção de tempos de processo já pré-estabelecidos na rotina de produção de um produto específico, a garantida entrega nos tempos pré-determinados, e principalmente cumprir a demanda imposta pela sociedade de um determinado produto importante para a melhoria da saúde pública do país.

Sabe-se que validar processos é uma normativa nacional e internacional, porém a aplicação de tal ferramenta ainda hoje é muito obscura. Não existe claramente definido como deve ser realizado tal procedimento. Não é encontrado na literatura, em guias ou normativas nacionais ou internacionais um desenho ou proposta formalmente aprovado para execução de tais experimentos, sendo esta uma dificuldade dos produtores em geral. Guias e normativas descrevem exhaustivamente sobre tal necessidade, estas fazem uma definição superficial sobre tal procedimento, não há o planejamento ou norteamento de como executar, existe a falta de uma

padronização de linguagem do setor de validação, o que cria uma barreira para o entendimento total dos termos (ATHAIDE, 2000).

A diversidade e particularidade dos diversos processos hoje existentes nas diferentes áreas deve explicar tal dificuldade de se encontrar o mapeamento ideal para as validações de processos. Hoje, é responsabilidade do produtor estudar seus processos de forma exaustiva a fim de garantir através de um protocolo experimental robusto que a validação a ser executada vai garantir a diminuição dos riscos de desvios de qualidade e os riscos de não conformidades aos requisitos estabelecidos.

As validações de processo podem ser do tipo prospectivo, concorrente ou retrospectivo. Portanto, torna-se necessário fazer um estudo prévio e entendimento suficiente de cada uma destas validações para a escolha adequada da metodologia a que se pretende aplicar ao seu processo a fim de garantir o objetivo final.

De acordo com o processo em questão e em se tratando de um processo bem estabelecido com relação à metodologia de produção, sendo este fruto de uma transferência de tecnologia repassada por uma empresa multinacional e muito bem estabelecida no mercado, foram utilizados os conceitos de validação concorrente para base de planejamento do experimento proposto neste trabalho.

O presente trabalho teve por objetivo principal validar os processos de produção do insumo farmacêutico ativo Polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide tetânico utilizado para formulação da vacina contra Hib. Utilizou-se uma metodologia de validação para garantir resultados confiáveis e um produto dentro dos seus parâmetros específicos de qualidade, o que assegura um processo controlado e a eficácia da vacina final.

A validação deste processo permitirá a reprodução de lotes satisfatórios pelo aspecto das Boas Práticas de Fabricação, a diminuição dos índices de perdas e a redução das reclamações de clientes.

Desta forma, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- ❖ Identificação de todas as variáveis existentes nos processos de ativação e conjugação;
- ❖ Definição das variáveis críticas a serem monitoradas, tanto com relação ao processo quanto com relação ao produto;

- ❖ Definição das características/atributos de desempenho do processo e produto a serem monitorados, juntamente com os métodos de teste e limites de aceitação;
- ❖ Verificação dos detalhes dos equipamentos críticos a serem utilizados durante os processos, bem como seu *status* de qualificação/calibração;
- ❖ Definição da amostragem, isso inclui, indicar os pontos de amostragem e a frequência de retirada destas amostras, bem como tamanho desta amostragem e quantitativo.
- ❖ Produzir 03 lotes consecutivos do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide tetânico conforme procedimento de validação estabelecido.

Como se trata de uma transferência de tecnologia, o processo de obtenção do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide tetânico é fruto de um acordo formal com garantia de sigilo com uma multinacional farmacêutica. Portanto, é necessária a omissão de alguns dados brutos do processo, conseqüentemente trata-se de uma dissertação de caráter sigiloso o que gera algumas limitações e um desafio à realização deste trabalho.

1– FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1–Histórico

A bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) é um coco-bacilo, Gram-negativo, anaeróbico facultativo. Possui cápsula polissacarídica e é estimada como a maior causadora de infecção bacteriana. Ocorre principalmente em crianças com idade inferior a 5 anos e idosos, o que pode levar a um diagnóstico de otite média aguda, bacteremia, meningite, pneumonia e artrite séptica (PELTOLA, 2000; WENGER *et al.*, 1997; JORDENS e SLACK, 1995).

Richard Pfeiffer descreveu pela primeira vez a bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) em 1892, quando neste momento ocorreu a maior pandemia de influenza. A bactéria foi encontrada na saliva de pacientes doentes, onde esta foi associada casualmente aos sintomas conhecidos da gripe (PITTMAN, 1931).

Winslow *et al.* em 1920 redefiniram a bactéria, até então reconhecida como bacilo de Pfeiffer, para a denominação até hoje conhecida, *Haemophilus influenzae*. Tal diferenciação foi detectada ao se estudar os fatores de crescimento da bactéria quando se observou que uma das exigências para o cultivo do microrganismo foi a presença dos fatores sanguíneos X (hemina) e V (adenosina dinucleotídeo nicotinamida-NAD). Observou-se ainda a formação de pequenas colônias de forma convexa, lisas, claras, cinzas ou transparentes (MICHAELS *et al.*, 1976).

Na Figura 1 pode-se visualizar colônias de *Haemophilus influenzae* tipo b em meio Agar Chocolate.

Figura 1- Colônias de Hib em meio Agar Chocolate. Cultivo de 24 horas, à 37 °C, 5% CO₂, encontrada na saliva de paciente com pneumonia.



A *Haemophilus influenzae* pode ser isolada na forma encapsulada ou não encapsulada segundo Margaret Pittman (1931). Dentro da linhagem encapsulada, foi identificado e denominado seis sorotipos antigenicamente distintos (a-f), porém o sorotipo b é o único de interesse médico (WENGER *et al.*, 1990; PELTOLA, 1984). Segundo Pittman toda linhagem isolada a partir de sangue ou fluido cérebro-espinhal de jovens com meningite pertencia ao sorotipo tipo b, enquanto as linhagens não encapsuladas eram encontradas nas secreções do trato respiratório superior de adultos (PITTMAN, 1931).

Ao final dos anos 60, cientistas voltaram suas atenções para a necessidade de se desenvolver uma vacina contra Hib. Schneerson (1971) observou que a presença do anticorpo obtido contra a cápsula tipo b desenvolvia proteção contra a doença causada por Hib, desta forma iniciaram-se as tentativas na busca da imunidade com polissacarídeo capsular como antígeno (SCHNEERSON, 1971).

A primeira vacina contra Hib foi desenvolvida nos anos 70, sendo esta composta somente por polissacarídeo capsular purificado (RODRIGUES *et al.*, 1971; ANDERSON *et al.*, 1972; ADAMS *et al.*, 1993). Esta vacina foi aprovada pelo FDA por ter se mostrado eficaz em crianças acima dos 18 meses de idade (GRANOFF e CATES, 1985; MMWR, 1991; ADAMS *et al.*, 1993).

1.2 – Micro-organismo *Haemophilus influenzae* tipo b

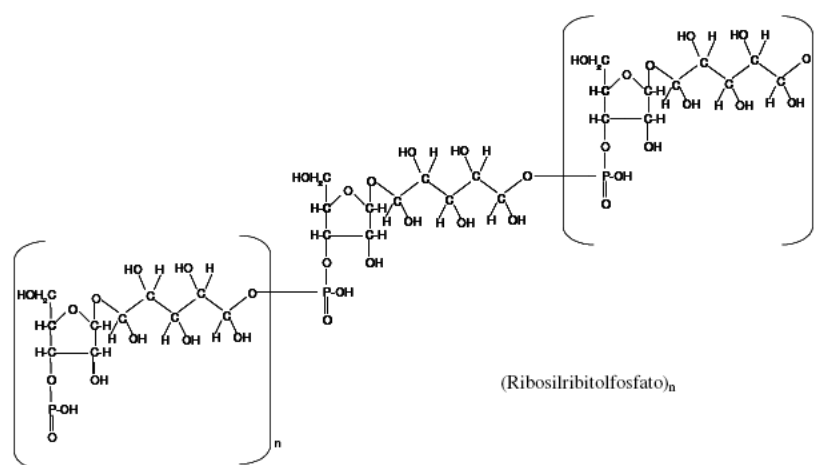
Através das propriedades fenotípicas detectadas por testes bioquímicos, a espécie *Haemophilus influenzae* foi subdividida em 4 biotipos, classificados de I a IV (KILIAN, 1976), porém atualmente, estão definidos 8 biotipos de I a VIII, existindo uma forte correlação entre o biotipo I e a cápsula do tipo b, ocorrendo em maior predominância entre os demais (VAN ALPHEN, 1994).

As diferenças estruturais e antigênicas da molécula polissacarídica determinam seu sorotipo, que pode ir de a-f. A cápsula do tipo b é constituída de polissacarídeo de alta massa molecular e possui unidades repetitivas de poliribosil-ribitol-fosfato (PRP) (KNISKERN e MARBURG, 1994; COCHI *et al.*, 1985; CRISEL *et al.*, 1975) considerado como maior fator de virulência do microrganismo.

A cápsula polissacarídica é um dos fatores críticos na patogênese da infecção. Seis tipos de cápsulas, sorologicamente distintas, podem ser expressadas de diferentes linhagens de *H. influenzae*. Para os sorogrupos a e b, existem

os heteropolímeros lineares compostos de unidades alternadas de glicose (tipo a) e ribose (tipo b) e ribitol, unidos por uma ligação fosfodiéster na proporção 1:1:1, conforme a Figura 2. Sorogrupos c e f possuem em sua constituição N-acetil glicosamina e N-acetil galactosamina unidos por uma ligação fosfodiéster em suas unidades repetidas. Enquanto, os sorogrupos d e e possuem N-acetil glicosamina e ácido manurônico em sua unidade repetida (ROBBINS, 1984). Somente o sorotipo b, dentre todos os citados, é o responsável pelas infecções invasivas o que ressalta a sua importância clínica e imunobiológica (WENGER *et al.*, 1990; PELTOLA, 1984).

Figura 2—Estrutura do polissacarídeo capsular de *Haemophilus Influenzae* tipo b.



Fonte: Hermanson, 1996.

1.3 –A doença causada pela bactéria Hib

A gripe H invasiva, ou doença de Hib, é uma infecção causada pela bactéria Hib, um patógeno restrito de humanos, que pode ser encontrado na flora comensal normal das vias respiratórias superiores, podendo durar meses sem a detecção dos sintomas, no caso de portadores assintomáticos.

Antes do desenvolvimento da vacina, Hib podia ser isolado em cerca de 0,5 a 3% das crianças, enquanto que nos adultos não era praticamente detectado. Acredita-se que até a idade de 5 anos a maior parte das crianças já tenha entrado em contato com o patógeno. A transmissão do micro-organismo de um portador para outros indivíduos ocorre através de gotículas de saliva ou pelo contato direto.

Dependendo do tamanho do inóculo em alguns indivíduos, o micro-organismo pode causar infecção invasiva (SCHWARTZ, *et al.*, 1989) que pode levar à meningite bacteriana (uma infecção do cérebro é potencialmente fatal), à

pneumonia, à epiglotite (inchaço severo acima das cordas vocais que torna a respiração difícil) e a infecções do sangue, das articulações, dos ossos e do pericárdio (a membrana que reveste o coração).

O diagnóstico desta doença é silencioso, o que retarda o início do tratamento, não possui um quadro clínico único e específico. A confirmação desta doença no organismo humano requer coleta de sangue ou de fluido cérebro-espinhal para isolamento e identificação do microrganismo em laboratório. Em paralelo, o tratamento com antibióticos deve ser indicado mesmo antes de se confirmar tal patologia (WATT *et al.*, 2003), já que a letalidade por esta doença inclui as doenças meningite e pneumonia que podem igualmente ser causadas por outros agentes infecciosos como, *Neisseria meningitidis* ou *Streptococcus pneumoniae*, de quadro clínico similar.

Infelizmente esta doença invasiva possui como principal alvo a população infantil, entre 2 meses e 5 anos de idade, sendo este o intervalo imunológico entre o desaparecimento dos anticorpos maternos e o aparecimento de seus próprios anticorpos protetores (JORDENS e SLACK, 1995).

Nos países desenvolvidos, antes de 1987, 1 em cada 200 crianças menores de 5 anos foram alvo desta doença invasiva. Este ano ficou marcado pela introdução da vacina conjugada nos países desenvolvidos. Deste número, 5 a 8% morriam, enquanto que 15 a 30% garantiram sequelas para toda vida relacionada à perda de audição e retardo mental (WATT *et al.*, 2003; SELL, 1987). Este número apresentou redução significativa marcada nos anos 90, quando as primeiras vacinas conjugadas licenciadas foram introduzidas no esquema de vacinação mostrando-se eficazes no combate à infecção por Hib. Deve-se ressaltar que a OMS possui dados que demonstram que essa enfermidade ainda acomete cerca de 3 milhões de pessoas, ocasionando em torno de 300 mil mortes a cada ano, relacionado diretamente à meningite e pneumonia (OMS, 1998).

Nos Estados Unidos, no início dos anos 80, a estimativa anual era de 40 a 50 casos de meningite causada por Hib a cada 100 mil crianças com menos de 5 anos de idade (VAN ALPHEN, 1994). Esse número foi reduzido com a introdução da vacina.

No Alasca, a doença mostrou uma incidência elevada de 400 a 600 casos a cada 100 mil crianças em 1991. Quando foi implementada a vacina no programa de

imunização, estes índices reduziram de forma significativa (KELLY *et al.*, 2004; PELTOLA, 2000).

De 20 a 40% dos pacientes na África morrem da doença e um grande número de sobreviventes ficam com sequelas neurológicas (BIJILMER, 1994). O número de portadores de Hib em nasofaringe é maior nos países em desenvolvimento (BIJILMER *et al.*, 1989). Dos países africanos, Gâmbia é um modelo de sucesso após implantação da vacina contra Hib, a incidência da doença era de 200 casos para cada 100 mil crianças, e passou a 21 casos em cada 100 mil crianças, quando a partir de 1997 passou a imunizar crianças com a vacina conjugada.

Dentre os países latino-americanos, o primeiro a adotar a vacina conjugada foi o Chile (PELTOLA, 2000). O número de casos girava em torno de 40 casos para 100 mil crianças e reduziu em 90%.

Infelizmente, no Brasil não existe um serviço de vigilância estruturado para identificar com precisão a etiologia de doenças infecciosas. Raramente são identificados os agentes causadores de pneumonia e, mesmo nos casos de meningite, muitas vezes não se consegue isolar e identificar os agentes etiológicos, mesmo nos melhores centros hospitalares. Entre 1987 e 1991, o Hib foi o principal agente identificado como causa de meningite bacteriana em crianças menores de 5 anos. Além disso, diversos estudos realizados em hospitais identificaram esta bactéria como o segundo agente causador de pneumonia bacteriana em crianças brasileiras menores de 5 anos (BOUSKELA, 1995). Em 1991, o coeficiente de incidência da doença invasiva por Hib em crianças brasileiras menores de 5 anos foi de 18,4 por 100.000 habitantes. Apesar do coeficiente de incidência de doenças invasivas por Hib ter sido menor do que o encontrado em países desenvolvidos, deve-se considerar que, raramente são identificados os agentes causadores de meningite, pneumonia, bacteremia e outras doenças graves, sendo altamente provável que estes dados não reflitam a real incidência desta doença no país. Além disso, é importante verificar que 24% das doenças invasivas graves por Hib ocorrem em crianças menores de 6 meses de idade, enquanto entre nativos do Alasca, EUA e Finlândia os percentuais de doença invasiva grave por Hib em menores de 6 meses são de 30%, 18% e 5%, respectivamente. Estes fatos indicam que, no Brasil, a vacinação contra o Hib deveria ter sido iniciada precocemente, pelo alto risco de doença em lactentes de baixa idade.

A primeira imunização contra meningite no país através da rede pública de saúde foi em 1999, contra o Hib. Na época, esse tipo de meningite era a segunda causa mais comum da doença, sendo responsável por 1.700 casos por ano e uma incidência média anual de 23,4 casos para cada 100 mil crianças menores de um ano. Com a introdução da vacina, o Brasil registrou uma redução de mais de 90% no número de casos, e óbitos por meningite por Hib (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

1.4 – Vacinas de subunidades

Vacinas de subunidades são as que possuem o próprio polissacarídeo componente da cápsula e principal fator de virulência como antígeno em sua formulação. No caso da vacina Hib, a vacina de polissacarídeo é composta por polímeros de PRP que corresponde à subunidade constitutiva da cápsula.

Resumidamente, a resposta imunológica é gerada pelo polissacarídeo quando este interage com moléculas de imunoglobulina da superfície de células B, que são responsáveis pela secreção de anticorpos, na presença de um segundo sinal. Quando o segundo sinal é recebido, a célula B diferencia-se em célula plasmática e passa a secretar anticorpos (JONES, 2005).

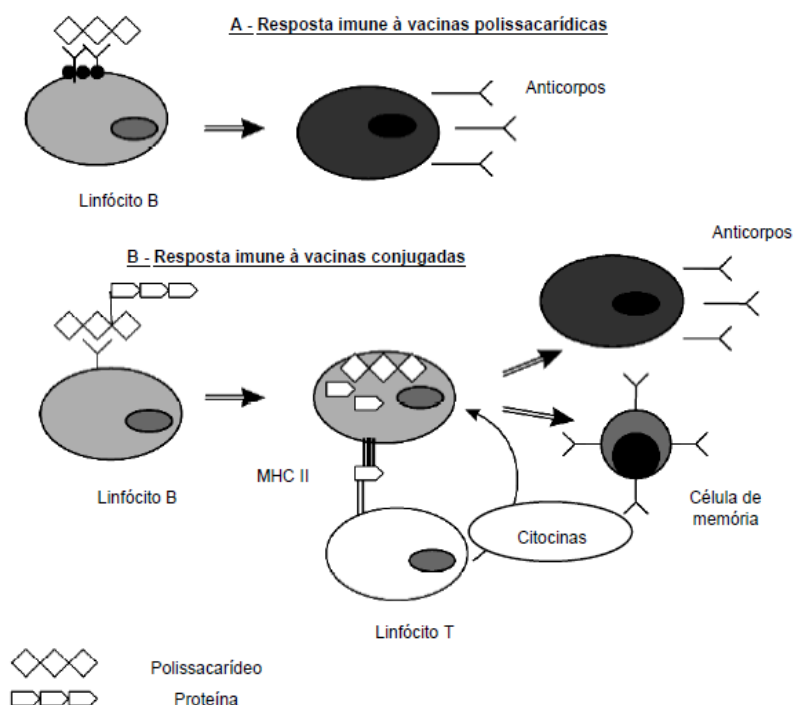
A vacina polissacarídica contra Hib possui limitação imunológica, isto porque a idade do indivíduo imunizado influencia e muito na resposta imunológica (ADA e ISAACS, 2003). Para crianças entre 2 e 6 anos, o polissacarídeo purificado como vacina induz resposta imunológica forte; em crianças entre 18 e 24 meses a resposta é intermediária, já em crianças abaixo dos 18 meses a resposta é muito fraca, o que torna esta formulação ineficaz (ADA e ISAACS, 2003, KAYHTY *et al.*, 1994). Desta forma, a fim de reverter as limitações imunológicas das vacinas constituídas de polissacarídeo, a conjugação com proteínas carreadoras passou a ser adotada garantindo a imunização das crianças abaixo dos 18 meses.

1.5 – Vacinas conjugadas

Karl Landsteiner, no início do século XX, mostrou que pequenas moléculas denominadas haptenos podem, após se ligarem a um antígeno protéico, tornar-se imunogênicas, ou seja, capazes de induzir a produção de anticorpos anti-hapteno. Este princípio foi empregado pela primeira vez em 1929 para aumentar a

imunogenicidade de polissacarídeos. Avery e Goebel (1929), mostraram que através da conjugação entre um glicídio e uma proteína era possível obter resposta com produção de anticorpos direcionados para a porção glicídica da molécula. A Figura 3 mostra a diferença entre a resposta imune obtida através das vacinas polissacarídicas e conjugadas. Neste esquema, o polissacarídeo liga-se a receptores presentes na superfície dos linfócitos B, induzindo a produção de anticorpos. Já no caso da vacina conjugada, ocorre uma interação entre os linfócitos B e T, com liberação de citocinas que estimulam a produção de anticorpos contra a porção polissacarídica do antígeno, além da produção de células de memória imunológica.

Figura 3—Resposta imune T-independente e T-dependente às vacinas polissacarídica (A) e conjugada (B). O polissacarídeo liga-se aos receptores presentes na superfície dos linfócitos B, induzindo a produção de anticorpos. No caso da vacina conjugada, ocorre uma interação entre os linfócitos B e T, com liberação de citocinas que estimulam a produção de anticorpos contra a porção polissacarídica do antígeno além da produção de células de memória imunológica.



Fonte: Nieminen, 1999.

Os primeiros estudos para obtenção de uma vacina conjugada contra Hib foram realizados na década de 80, por Gordon (1986), que conjugou o polissacarídeo de Hib através da técnica de aminação reductiva, ocorrendo a ligação deste

polissacarídeo a uma proteína carregadora. Atualmente existem algumas vacinas conjugadas licenciadas disponíveis para a população, e estas são geralmente obtidas através da ligação química entre o polissacarídeo capsular de Hib e proteínas, mas diferem no tipo de carregador proteico, tamanho da cadeia polissacarídica e método de conjugação química adotado.

1.6 – Eficácia e estabilidade das vacinas conjugadas

O polissacarídeo é um polímero que apresenta em cada subunidade constitutiva de sua estrutura química pelo menos um grupo funcional (hidroxila ou carboxila). Já na molécula de proteína, grupos carboxílicos e amínicos livres são observados para conjugação como o polissacarídeo.

A imunogenicidade de uma vacina conjugada está diretamente relacionada à estrutura química final, a qual alguns fatores influenciam, sendo eles: o método de conjugação adotado, natureza da proteína carregadora, tamanho da cadeia polissacarídica, presença de molécula espaçadora, proporção polissacarídeo/proteína. Assim, o controle de parâmetros específicos durante o processo garante a reprodutibilidade de conjugados bem definidos físico-quimicamente.

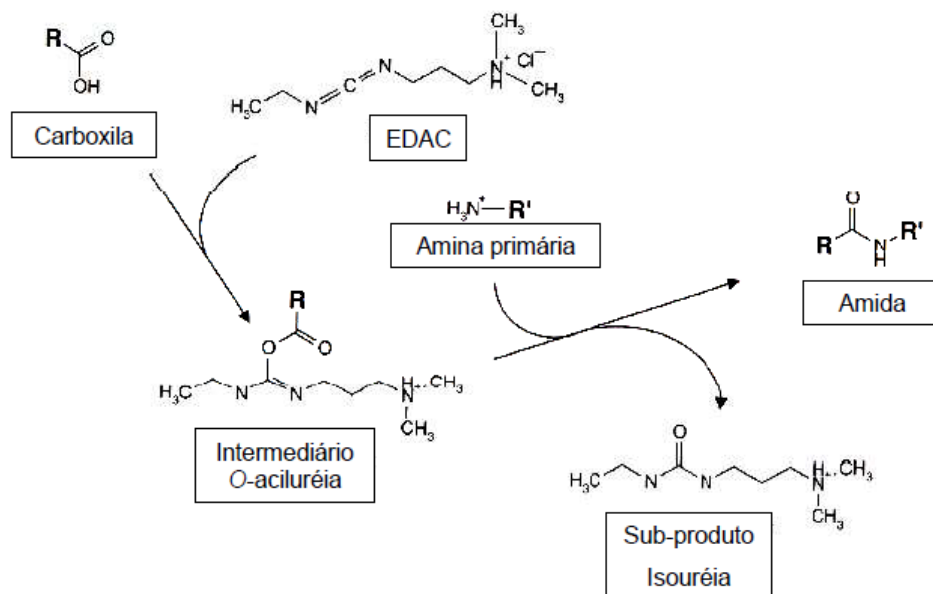
1.6.1– Métodos de conjugação

Os métodos de conjugação mais aplicados à produção de vacinas são aqueles que introduzem espaçadores entre os dois componentes a serem acoplados, neste caso, polissacarídeo e proteína. Dentre os diversos métodos descritos na literatura, as metodologias clássicas são o método da carbodiimida (metodologia utilizada no experimento proposto neste trabalho) e o método da aminação reductiva.

O método da carbodiimida compreende a formação de uma ligação amídica a partir da reatividade entre um grupamento carboxílico e um grupamento amino. Sendo assim, substâncias denominadas carbodiimidas reagem com a carbonila formando o intermediário O-aciluréia, um éster altamente reativo que, ao sofrer ataque de um composto nucleofílico, resulta na formação da ligação amídica (HERMANSON, 1996). As carbodiimidas são substâncias capazes de reagir tanto em meio aquoso como em solventes orgânicos, dependendo de suas características individuais de solubilidade. As solúveis em água são amplamente utilizadas para

obtenção de glicoconjugados para uso biológico, entre elas a 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) (HERMANSON, 1996). A Figura 4 representa o esquema da reação de conjugação via carbodiimida onde, um grupamento carboxílico e uma amina primária, em presença de EDAC, resultam na formação do produto conjugado, contendo ligação amídica e no subproduto isouréia.

Figura 4 –Reação de conjugação pelo método da carbodiimida. Os ácidos carboxílicos reagem com EDAC, gerando O-aciluréia, um intermediário ativo. Em presença de um nucleófilo como, por exemplo, uma amina primária, há a formação do composto com ligação amídica e de isouréia (subproduto).

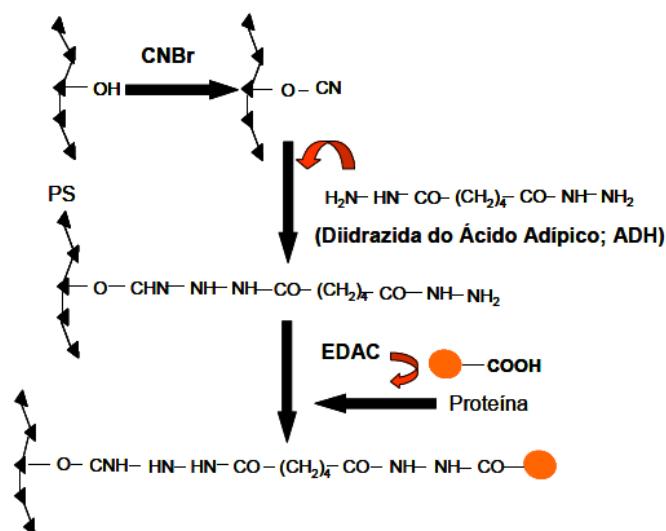


Fonte: Hermanson, 1996.

Na década de 80, a partir da química da carbodiimida, foi desenvolvida a primeira vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (SCHNEERSON *et al.*, 1980). Por não possuir grupamentos reativos, como por exemplo, amino ou ácido carboxílico, que permitam a formação direta da ligação covalente, o polissacarídeo capsular de Hib precisa sofrer modificações químicas, a fim de ser conjugado a proteínas (LINDBERG, 1999). A ativação do polissacarídeo (Hib) é feita através da reação com o brometo de cianogênio (CNBr), com a produção de um isocianato intermediário, que reage com a dihidrazida do ácido adípico (ADH), resultando na introdução de grupamento amino (NH₂) na molécula. A reação de conjugação, mostrada na Figura 5, ocorre após a ativação prévia de grupos carboxílicos da

proteína (ácido aspártico e ácido glutâmico) pela reação com *N*-etil-*N'*- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) seguindo-se o acoplamento com os grupos hidrazidas gerado no polissacarídeo (CHU *et al.*, 1983).

Figura 5 – Conjugação do polissacarídeo de Hib pelo método da carbodiimida. O polissacarídeo é ativado através de reação com o brometo de cianogênio (CNBr), gerando um intermediário ao qual, posteriormente são adicionados grupos amino, a partir da reação com a dihidrazida do ácido adípico (ADH). Os grupos carboxílicos da molécula proteica são ativados com o EDAC e conjugados aos grupos amino introduzidos no polissacarídeo.



Um dos problemas dessa estratégia de conjugação é o grande número de grupos reativos desnecessariamente gerados na proteína e no polissacarídeo. Por sua vez, o uso de substâncias bifuncionais, como ADH, pode causar um entrelaçamento das moléculas do polissacarídeo, criando estruturas de alta massa molecular que não sofrem reação de conjugação, enquanto a carbodiimida pode formar uma série de produtos secundários, contendo ligações éster e anidrido, além do produto de conjugação desejado, que contém a ligação amídica (BEUVERY *et al.*, 1986), em função da reatividade e instabilidade do intermediário formado. Todos estes fatores podem levar à obtenção de estruturas antigênicas novas e indesejáveis (DI FABIO, 1988).

As estratégias de ligação entre polissacarídeos e proteínas para a formação de glicoconjugados normalmente ocorrem numa sequência reacional composta por várias etapas. A necessidade de várias etapas está relacionada com a falta de

grupamentos reativos na cadeia polissacarídica, por exemplo, que devem ser gerados a fim de permitir o acoplamento com outras moléculas, tais como as proteínas (HERMANSON, 1996). Sabe-se que os grupamentos aldeído e cetona são alvos importantes para as reações de conjugação e, uma vez que nem sempre estão presentes em biomoléculas, eles podem ser gerados através de reações específicas.

O método da aminação redutiva (ANEXO A) prevê a ligação dos radicais aldeídos (gerados pela oxidação das hidroxilas) ao aminogrupamento da proteína formando o conjugado (KNISKERN E MARBURG, 1994). Esta metodologia, muitas vezes, implica na adição de agentes bactericidas para prevenção de crescimento de bactérias que possam contaminar a solução, pois o tempo da reação para formação do conjugado costuma ser muito extenso, acima de 5 dias.

1.6.2– Natureza da proteína carregadora

Dentre as diversas proteínas existentes, o grupo dos toxóides bacterianos é um dos mais antigos e amplamente descrito na literatura para utilização como carregador proteico em vacinas conjugadas. Neste grupo, incluem-se o toxóide tetânico e o diftérico (PEETERS *et al.*, 1992; BEUVERY *et al.*, 1983; JENNINGS e LOGOWSKI, 1981). O carregador proteico deve ser seguro o suficiente para utilização, incluindo ausência de toxicidade primária e riscos mínimos de complicações alérgicas, o que pode ser encontrado nos toxóides diftérico (TDif) e tetânico (TT). Estes, quando são bem preparados, não são tóxicos e a incidência de reações alérgicas está bem documentada.

A imunogenicidade do conjugado pode ser afetada pelo tamanho da proteína carregadora. Proteínas de alta massa molecular são mais imunogênicas e usadas como carregadores de peptídeos e haptenos a fim de promover a indução de anticorpos. Proteínas grandes promovem mais epítopos que uma proteína pequena.

1.6.3– Tamanho da cadeia polissacarídica

A fim de não afetar sua imunogenicidade, o conjugado deve apresentar um tamanho de cadeia com um número mínimo de unidades repetitivas não modificadas e em sequência. Durante o processo de conjugação, cada etapa deve ser controlada

para que a estrutura não seja modificada a ponto de descaracterizar os epítomos que induzem os anticorpos contra a cápsula da bactéria.

Os polissacarídeos precisam ser ativados antes do acoplamento com a proteína. Esta ativação resulta na quebra da cadeia ou na inserção de um grupo reativo. Em alguns casos, a proteína também precisa ser ativada.

O polissacarídeo de Hib contém grupos hidroxilas que podem ser susceptíveis de serem modificados e usados para gerar ligações covalentes. Na literatura é comum a ativação de cadeias polissacarídicas através da oxidação de carboidratos contendo hidroxilas em átomos de carbono adjacentes com periodato de sódio, que cliva a ligação C-C e oxida a hidroxila em grupos aldeídicos reativos (HERMANSON, 1996).

É necessário haver uma avaliação dos critérios com relação à escolha do tamanho da cadeia de polissacarídeo para desenvolver uma boa resposta imune. Se por um lado, a cadeia deve ser pequena suficiente para induzir respostas de anticorpos TD, por outro lado, o tamanho do hapteno deve ser suficientemente grande para expressar o epítomo completo no antígeno nativo. Uma análise da atividade funcional dos anticorpos anti-polissacarídeo pode indicar o tamanho ideal.

1.6.4– Presença da molécula espaçadora

A eficiência do processo de conjugação pode ser impactada pela introdução de um espaçador molecular que diminui o impedimento estérico, melhorando a apresentação do antígeno ao sistema imune (PEDERSEN *et al.*, 2006; SEPPALA e MAKELA, 1989; KING *et al.*, 1986). Uma das moléculas espaçadoras mais utilizadas é a ADH, molécula simétrica composta de 6 carbonos e dois grupos hidrazidas (NH₂-NH-) (HERMANSON, 1996).

As carbodiimidas são agentes condensadores também usados para mediar a formação da ligação amida ou fosoramida entre um grupo -COOH e uma amina -NH₂ ou grupo fosfato -PO₄ e grupo -NH₂. São chamados “zero-length” porque a formação da ligação não implica em mudanças na conformação química da estrutura. O EDAC é talvez o reagente carbodiimida mais popular usado para conjugação de moléculas de uso em biomedicina (HERMANSON, 1996).

A ativação da proteína por EDAC tem como base a ativação do grupo carboxila. A carbodiimida liga-se a $-\text{COOH}$ formando um intermediário O-acilisouréia muito reativo (eletrofílico) que pode sofrer ataque de uma espécie nucleofílica contendo grupo amina formando um conjugado.

Apesar de muito eficiente na ativação de carboxilas protéicas, o EDAC apresenta grande labilidade na presença de meio ácido (LEI *et al.*, 2002) e de átomos de oxigênio por longo período, como encontrado na água (HERMANSON, 1996). Estes últimos podem agir como nucleófilo atacante e levar a hidrólise do EDAC antes da ativação da proteína (HERMANSON, 1996).

1.6.5– Proporção polissacarídeo/proteína

A proporção polissacarídeo/proteína tem um papel importante na habilidade da vacina conjugada em induzir resposta imune. A vacina conjugada deve promover indução concomitante dos anticorpos anti-proteína e anti-polissacarídeo.

Uma baixa relação ou alta relação implica diretamente no rendimento da conjugação e na reversão da resposta imune contra polissacarídeo de TI para TD, portanto, um fino balanço da relação polissacarídeo/proteína deve ser determinado através de experimentos e estudos pré-clínicos.

1.7 –Processo de obtenção da vacina conjugada contra Hib

A metodologia de produção que será apresentada neste trabalho para obtenção do concentrado vacinal de Hib (PS-TT) é uma preparação de Schneerson *et al.*(1980). O método de conjugação escolhido é da carbodiimida e basicamente composto por três etapas simples: (1) ativação do polissacarídeo seguido de (2) derivatização e (3) conjugação do PRP com a proteína na presença de carbodiimida.

Nesta metodologia, as hidroxilas do polissacarídeo são aleatoriamente ativadas com CNBr seguidamente de derivatização com ADH. O polissacarídeo ativado exibe um grau de derivatização de 4 moléculas de ADH para 100 subunidades repetitivas.

O TT foi obtido ao final da fermentação da bactéria *Clostridium tetanii* que após tratamento apresenta massa molecular de aproximadamente 150kDa.

A etapa de conjugação acontece na presença de EDAC. A reação de conjugação se dá após a ligação da carboxila ativada com o grupo hidrazida do espaçador molecular ligado ao PRP. A purificação do conjugado e a remoção dos componentes livres e excesso de reagentes é feita em coluna de exclusão molecular contendo resina Sephacryl S 500HR. A Figura 6 apresenta as reações ocorridas durante o processo de conjugação acima descrito.

Figura 6—Método de conjugação para obtenção da vacina PS-TT. (1) PRP poliribosilribitol fosfato. (2) Brometo de cianogênico (CNBr). (4) Diidrazida do ácido adípico (ADH). (5) PRP derivatizado com ADH. (6) Proteína Toxóide Tetânico (TT). (7) Conjugado final PRP-ADH-TT.

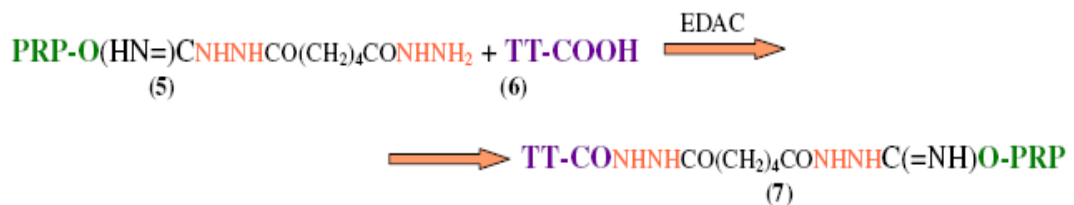
Ativação do polissacarídeo com brometo de cianogênio:



Derivatização do polissacarídeo com ADH:



Conjugação do polissacarídeo ativado e da proteína:



A vacina é obtida através de uma formulação composta por polissacarídeo conjugado PRP-TT purificado, água para injetáveis e solução de lactose 15,75% m/v, sendo comercializada na forma liofilizada, podendo ser reconstituída com a Vacina difteria, tétano e pertussis (DTP) ou com solução salina (NaCl 0,9%), onde

tem-se 10µg de polissacarídeo conjugado a 30µg de proteína, sendo a relação polissacarídeo/proteína de 0,5.

A Tabela 1 apresenta as principais características das vacinas disponíveis comercialmente.

Tabela 1 – Vacinas conjugadas de *Haemophilus influenzae* tipo b

VACINA	Companhia	Componentes	Ativação de PRP	Método de Conjugação	Formulação final	Idade da 1 ^o dose (meses)*
PRP	Sanofi Pasteur, Wyeth	Polissacarídeo de Hib	nenhuma	nenhum	Polissacarídeo de Hib	24 meses (1985)
PRP-D (ProHIBit)	Sanofi Pasteur	PRP e Toxóide Diftérico	BrCN	Aminação Redutiva	25µg PRP e 18µg TD	18 meses (1987)
HbOC (HibTiter)	Wyeth	Oligossacarídeo e CRM ₁₉₇	NaIO ₄	Aminação Redutiva	10µg oligo PRP e 25µg CRM ₁₉₇	18 (1988) 2 (1990)
PRP-OMP (PedvaxHIB)	MerckSharp&Dhome	PRP e OMP	Ácido Oxálico, BrCH ₂ COCl		15µg PRP e 250µg OMP	15 (1989) 2 (1990)
PRP-T (Hiberix)	GlaxoSmith Kline	PRP e Toxóide Tetânico	CNBr e ADH	Carbodiimida	10µg PRP e 30µg TT	2 meses (1993)

Fonte: Kniskern e Marburg, 1994; Frascch, 1994; Plotkin, 1994.

*Idade ideal para imunização em meses. Entre parênteses a data de liberação para uso em humanos.

As vacinas encontradas na Tabela 1 por serem conjugadas, apresentam resposta imunológica similar, com indução de anticorpos TD. A vacina conjugada de polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b com proteína de membrana externa (PRP-OMP) promove uma forte resposta de anticorpo contra Hib após a primeira dose e um efeito de reforço menos pronunciado nas imunizações subsequentes.

1.8 –Aplicabilidade da vacina Hib no Brasil

A vacina contra Hib no Brasil e em muitos países faz parte do calendário de vacinação infantil, com um esquema de imunização previsto por 3 doses (JORDENS e SLACK, 1995), a partir dos 2 meses de idade com intervalo de 2 meses entre cada vacinação. Este esquema não inclui reforço após 12 meses, e crianças de 12 a 23 meses somente recebem 1 dose (Ministério da Saúde).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) disponibiliza no Calendário Nacional de Imunização a vacina contra Hib sendo esta administrada juntamente com a vacina DTP. A vacina DTP é produzida pelo Instituto Butantan e a Vacina contra Hib por Bio-manguinhos/FIOCRUZ. A produção da vacina contra Hib atualmente totalmente nacionalizada por Bio-manguinhos, surgiu de um acordo de transferência de tecnologia firmado em 1999 com uma indústria farmacêutica multinacional.

Segundo dados do Ministério da Saúde, por ano, nascem um pouco mais de 3 milhões de crianças, sendo neste caso necessária a produção de 12 milhões de dose/ano da vacina contra Hib, incluindo as 3 doses obrigatórias para atender à demanda nacional.

1.9 – Qualidade na Indústria Farmacêutica

O termo “controle da qualidade total” foi usado pela primeira vez por Armand Feigenbaum, em 1956, quando ele propôs a ideia de que a qualidade só poderá resultar de um trabalho conjunto de todos os que estão envolvidos no desempenho da organização, não apenas de um grupo de pessoas. Embora Feigenbaum também defendesse a criação de uma estrutura organizativa de suporte à qualidade, a Engenharia de Qualidade, que seria a responsável por resolver questões de qualidade que englobassem mais de uma área da empresa. Assim, a abordagem proposta por Feigenbaum dá ênfase à comunicação entre os departamentos da empresa, principalmente os responsáveis por produção, materiais e design.

Quando falamos de qualidade, estamos nos referindo às características de um produto ou serviço, que visa atender às exigências do cliente ou de outra pessoa envolvida. Para o mundo nos últimos anos, qualidade é, além do primeiro significado, sinônimo de melhoria contínua.

Um dos pontos de enfoque principal das empresas, já que o resultado final delas depende diretamente da satisfação do cliente, é garantir a qualidade. Esta satisfação não está relacionada apenas ao cumprimento de especificações técnicas para determinado produto e serviço, mas também a fatores como prazos, durabilidade, atendimento e formas de pagamento. Na atualidade, garantir a qualidade é necessidade não só de organizações privadas, mas também de organizações públicas, de qualquer porte, em materiais, produtos, processos ou serviços. A conscientização e a busca da qualidade e do reconhecimento da sua importância tornou a certificação dos sistemas de gerenciamento da qualidade indispensável, uma vez que aumenta a satisfação e a confiança dos clientes, aumenta a produtividade, reduz os custos internos, melhora a imagem e os processos de modo contínuo e possibilita acesso mais fácil a novos mercados.

Cada tipo de negócio tem determinados processos operacionais críticos para seus objetivos estratégicos. O aperfeiçoamento da empresa depende da sua

capacidade de perceber suas forças, fraquezas, e oportunidades de melhoria. Tratando-se de uma indústria de produção de vacinas a qual é responsável por atender prioritariamente às demandas da saúde pública nacional essa preocupação com a qualidade torna-se ainda mais evidente. Isto se deve ao fato de que os produtos entram em contato direto com a vida humana, em muitas das vezes crianças, resultando em impacto direto na saúde do paciente. Sendo assim o nível de qualidade exigido é muito alto e a adoção de práticas de qualidade adequadas é primordial para a sobrevivência de determinada instituição.

As indústrias farmacêuticas de forma geral devem seguir os rigorosos requisitos das BPF a fim de manter o padrão de qualidade adequado e necessário para o fornecimento de um produto final para a sociedade, além de garantir a certificação e respaldo regulatório. A ANVISA no Brasil e o FDA nos Estados Unidos são os órgãos responsáveis por fiscalizar, controlar e manter os níveis de qualidade desse tipo de indústria.

De acordo com a norma 21 CFR, seção 820.1 do FDA (2005), os requisitos de boas práticas de fabricação controlam os métodos usados, as plantas e controles usados para o projeto, manufatura, embalagem, etiquetagem, rotulação, armazenamento, instalação e serviço de todos os dispositivos finais elaborados para uso humano. Estes requisitos são propostos para garantir que os produtos finais serão seguros e efetivos.

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 59 da ANVISA (2000), cada fabricante deverá estabelecer e manter um sistema de qualidade para assegurar que os requisitos desta norma sejam atingidos e que os produtos fabricados sejam seguros, eficazes e de maneira geral adequado ao uso pretendido. Como parte de suas atividades no sistema de qualidade, cada fabricante deverá: estabelecer instruções e procedimentos eficazes do sistema de qualidade de acordo com as exigências desta norma e manter as instruções e procedimentos estabelecidos para o sistema de qualidade de maneira eficaz. Ainda segundo a RDC 59 da ANVISA, cada fabricante deverá projetar, conduzir e controlar todos os processos de produção a fim de assegurar que o produto esteja em conformidade com suas especificações. Onde puder ocorrer qualquer desvio nas especificações do produto, como resultado do processo de fabricação, o fabricante deverá estabelecer e manter procedimentos de controle de processo que descrevam todo o controle necessário para assegurar conformidade às especificações. Os controles de processo deverão incluir: instruções

documentadas, procedimentos padrões de operação e métodos que definam e controlem a forma de produção, instalação e assistência técnica, monitoração e controle dos parâmetros de processo e características de componentes e características dos produtos durante a produção, instalação e assistência técnica, conformidade com normas, padrões ou códigos de referência aplicados e procedimentos de controle de processo, a aprovação dos processos e equipamentos dos processos, e critérios de trabalho que deverão ser expressos em normas ou padrões documentados e através de amostras representativas.

No campo das BPF, o guia de harmonização internacional a cerca das legislações sanitárias aplicadas a medicamentos de uso humano (ICH) publicou os documentos Q8, Q9 e Q10 considerados os documentos que mais diretamente influenciaram o processo de harmonização da indústria farmacêutica. O Q8 estabelece os conceitos de Qualidade por projeto (*Quality by Design*) referente às atividades de desenvolvimento tecnológico, o Q9 estabelece a Gestão da Qualidade com base no gerenciamento de risco e o Q10 estabelece o Sistema da Qualidade Farmacêutica.

Segundo Immel (2001), em uma visão de linha do tempo tem-se:

- Em 1996 ocorreu a revisão dos requisitos da BPF americana na qual foram adicionados detalhes relativos à validação, uniformidade das misturas, prevenção de contaminação cruzada e sobre o tratamento de resultados fora do especificado.

- Em 1997 foram estabelecidas as regras para registros eletrônicos (21 CFR parte 11) exigindo controles que garantissem a segurança e integridade de todos os dados eletrônicos, passo inicial para os futuros requerimentos de validação de sistemas computadorizados.

- Em 1998 o FDA disponibilizou inúmeros documentos em processo de aprovação para orientação à indústria farmacêutica. Dentre eles estavam as orientações para fabricação, processamento e guarda de ingredientes farmacêuticos ativos e para o processo de investigação de resultado de testes fora do especificado.

- Em 1999 o FDA disponibilizou novo procedimento para inspecionar as indústrias baseado em quatro subsistemas principais: controle do gerenciamento, controle do projeto, controle de produto e processo e ações corretivas e preventivas.

No Brasil, o desenvolvimento das legislações relacionadas com as BPF foram fortemente direcionadas pelas legislações americanas, europeias e recomendações da OMS. Nos Estados Unidos da América, o código 21 da regulamentação federal

contém, nas partes 210 e 211, os requisitos mínimos de garantia da qualidade para os produtos farmacêuticos. Na Europa, foi publicado pela Comissão Europeia o documento *Good Manufacturing Practices (GMP) for Medical Products in the European Communities*, que deve ser seguido por todos os países da União Européia (UE) (ROSENBERG, 2002).

A ANVISA foi criada em 1999 através da Lei 9.782 e em 16 de julho de 2001 ocorreu a publicação das BPF nacionais no Diário Oficial da União como RDC 134 da ANVISA aprovada em 13 de julho do mesmo ano. Seguindo a evolução dos guias da OMS, a legislação brasileira buscou manter-se adequada aos padrões mundiais, promovendo a revisão da RDC 134. Assim, em 14 de agosto de 2003 foi publicada a RDC 210 substituindo a RDC 134 (FIALHO, 2005).

Ainda no cenário nacional, a ANVISA já revisou e publicou a RDC 17 em 19 de abril de 2010 para substituição da RDC 210/2003. Nesta nova RDC, a ANVISA se tornou totalmente seguidora do que é preconizado nos guias mais recentes da OMS e nos demais documentos de referência disponibilizados pelo ICH, adequando assim a legislação brasileira aos padrões internacionais aplicados ao setor farmacêutico. Novos requisitos como análise de risco, validação de sistemas computadorizados, um sistema de gestão da qualidade específico para o setor farmacêutico, entre outros, estão contemplados nesta nova RDC. Para a ANVISA, a validação é parte integrante do sistema de gestão da qualidade e tem papel fundamental e necessário para processos e produtos, tornando obrigatória a adoção desta prática dentro de uma indústria farmacêutica.

1.9.1– Fundamentos da validação de processos

Para estabelecer um alto padrão de qualidade na produção de medicamentos, a validação na indústria farmacêutica é a ferramenta adequada pelo qual assegura que um sistema encontre-se em um grau capaz de fornecer de forma constante e consistente artigos medicamentosos, atendendo todas as especificações farmacêuticas.

Segundo FDA (1987), validação de processo constitui evidência documentada que provê com alto grau de segurança, que um produto específico produzirá, consistentemente, produto que atenda suas especificações pré-estabelecidas e atributos de qualidade.

A validação faz parte da BPF como sendo um elemento da garantia da qualidade associado a um produto ou processo em particular. Uma operação validada assegura a produção de lotes uniformes que atendem às especificações requeridas, conseqüentemente gerando ao fabricante a confiança do fornecimento de um produto de qualidade.

Segundo a ANVISA através da resolução RDC 17 (2010), validação de processo é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema, realmente conduz aos resultados esperados, e tem como finalidade:

- Atender a exigência regulatória;
- Conformidade as especificações;
- Processo seguro e confiável.

Em um primeiro momento, tais definições, encontradas em diversos guias e normativas, parecem objetivas e claras, contudo algumas dúvidas surgem em uma leitura mais crítica. Não é claramente definido na literatura, como deve ser elaborado o protocolo de validação, e desta forma, fica a cargo do grupo de validação planejar seus experimentos sem uma base sólida que lhe forneça exatamente os pontos necessários e obrigatórios que lhe garanta um protocolo adequado. A necessidade de definições amplas é importante para a universalidade das aplicações, contudo, ao se criar um plano amplo demais se corre o risco de perder o foco e gerar dúvidas no que se refere à aplicação prática de um conceito.

Toda ferramenta tem um objetivo em sua aplicação e não é diferente o caso da validação. Espera-se, em um objetivo mais primordial, assegurar que o processo esteja ocorrendo da maneira como foi planejado e objetivado. Esta visão, contudo, é por demais simplista e perde uma riqueza de informações que podem ser obtidas. Ao aplicar a validação em passos do processo, ou seja, validar individualmente cada etapa relevante de um processo, garante ao produtor obter informações sobre a performance de cada setor envolvido, avaliar pontos críticos de controle e de melhoria, além de, sugerir alterações em etapas do processo.

A validação na indústria farmacêutica gera as seguintes vantagens para empresas do setor: aperfeiçoar os conhecimentos dos processos produtivos e desta forma assegurar que os processos encontram-se sob controle; diminuir os riscos de desvio de qualidade; diminuir os riscos da não conformidade aos requisitos estabelecidos; diminuir a quantidade de testes de controle de qualidade nas etapas

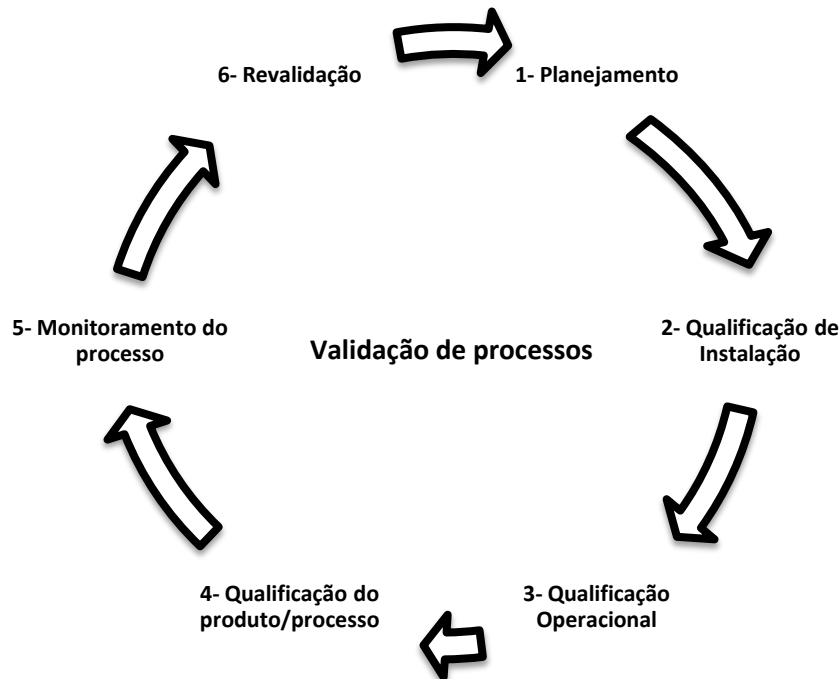
de controle em processo e no produto terminado; redução de perdas no processo; maior racionalização das atividades desenvolvidas; redução dos níveis dos estoques de segurança; criação de bases sólidas para o desenvolvimento de programas de treinamento.

Segundo a norma 21 CFR seção 820.75, do FDA deverá ser documentada as atividades e resultados da validação, incluindo datas e assinaturas das pessoas aprovando a validação e, onde apropriado, o equipamento validado. Esta documentação corresponde ao protocolo de validação, elaborado antes de se iniciar a validação propriamente dita, e que funciona como um plano de validação e também ao relatório de validação, elaborado no término e que tem como objetivo registrar tudo que foi realizado na validação. Um protocolo de validação, de acordo com Hojo (2004), deve incluir os seguintes elementos:

- Identificação do processo a ser validado;
- Identificação do dispositivo a ser produzido por este processo;
- Critérios mensuráveis e objetivos para o sucesso de uma validação;
- Comprimento e duração da validação;
- Turnos, operadores e equipamentos usados no processo;
- Identificação de utilidades para o equipamento do processo e qualidade das utilidades;
- Identificação de treinamentos necessários dos operadores;
- Descrição completa do processo;
- Especificações relevantes que relatam ao produto, componentes, materiais de manufatura, etc.;
- Quaisquer condições ou controles a ser colocados nos processos precedentes durante a validação;
- Parâmetros de processo a ser monitorados e os métodos para controle e monitoramento;
- Características do produto a ser monitoradas e métodos de monitoramento;
- Qualquer critério subjetivo utilizado para avaliar o produto;
- Definição do que constitui não conformidade tanto para critérios subjetivos quanto para critérios mensuráveis;
- Métodos estatísticos para coleta e análise de dados;
- Consideração de manutenção e reparos dos equipamentos de manufatura;
- Critérios para revalidação.

Uma validação é dividida em seis grandes etapas segundo Weber (2001), Figura7: planejamento, qualificação da instalação (QI), qualificação operacional (QO), qualificação do desempenho produto/processo(QD), monitoramento do processo e revalidação.

Figura 7 – Modelo de validação de processos



Fonte: Weber, 2001.

Na qualificação da instalação (QI) se verifica se os equipamentos estão instalados corretamente. As condições de instalação dizem respeito à verificação das agendas de calibração, manutenção preventiva, limpeza, inspeções de segurança, documentações de fornecedor, desenhos, manuais, software, lista de peças de reposição, condições ambientais, como temperatura, umidade, entre outros itens. A qualificação operacional (QO) é conhecida como teste de curto prazo. Segundo Hojo (2004), nesta fase os parâmetros de processo deverão ser desafiados a fim de garantir que resultem em um produto que encontre todos os requisitos definidos sob todas as condições antecipadas de manufatura, ou seja, testando o pior caso. Em outras palavras, nesta etapa os parâmetros de processo são testados nos limites de suas janelas de operação, a fim de verificar a capacidade do processo após estes testes. A qualificação do desempenho (QD) tem como objetivo, segundo Hojo (2004), demonstrar que o processo produzirá produtos aceitáveis sob as condições normais de operação. Esta fase caracteriza-se por uma simulação da produção real, ou seja,

todas as características devem ser testadas. Os desafios devem ser repetidos um número de vezes suficiente para garantir que os resultados são significativos e consistentes. A validação é encerrada após construção de um relatório e aprovação do mesmo pelas áreas envolvidas (qualidade, operações, manutenção). Nesse relatório deve constar tudo o que aconteceu na validação detalhadamente, os dados coletados, as informações geradas a partir dos dados, além das conclusões chegadas a partir do estudo.

Conforme RDC 17, podemos conduzir a validação de acordo com três diferentes abordagens. Uma delas se baseia em dados históricos, enquanto as outras duas se baseiam em dados experimentais. A primeira é conhecida como validação retrospectiva, enquanto as outras duas, como validação prospectiva (realizada antes do sistema entrar em funcionamento ou do produto entrar no mercado) e validação concorrente, realizada concomitantemente ao funcionamento do sistema. A validação retrospectiva não é aplicável à fabricação de produtos estéreis e sua execução não é mais incentivada para os demais produtos.

As modalidades de testes que se podem aplicar tanto na validação prospectiva quanto na concorrente, podem compreender:

- Testes abrangentes relacionados ao produto, os quais envolvem ampliação da amostragem, com aplicação de limite de confiança para resultados individuais e para homogeneidade do lote;
- Simulação de processo produtivo;
- Testes desafio/pior caso para determinação da robustez do processo;
- Parâmetros de controle em processo que são monitorados durante a produção, a fim de obter informações adicionais sobre a confiabilidade do processo.

A Validação deve ser conduzida durante um espaço de tempo, ou seja, no mínimo três lotes consecutivos (escala industrial) devem ser validados para demonstrar a consistência do processo, (ANVISA, 2006).

Na validação prospectiva os fatores/parâmetros críticos que podem afetar a qualidade do produto acabado devem ser determinados durante a fase de desenvolvimento do mesmo. Para isso, o processo produtivo deve ser “quebrado” em fases, a fim de que cada fase seja avaliada individualmente. Após uma validação prospectiva bem sucedida, a documentação de fabricação de lote a ser utilizada pode ser preparada já que no processo de validação foram identificados os parâmetros críticos do processo, bem como determinada a especificação dos

ajustes de máquinas, especificações dos componentes e condições ambientais. O número de lotes produzidos nesse exercício de validação deve ser suficiente para permitir a determinação da extensão normal da validação e as tendências, além de fornecer dados suficientes para avaliação. A validação de processo pode ser considerada apropriada quando os dados acerca dos parâmetros finais selecionados, ao menos três lotes consecutivos, indicarem que o produto final tem a qualidade desejada.

A validação concorrente é uma parte da validação prospectiva e deve ocorrer durante uma produção de rotina e se aplica a diferentes concentrações de um mesmo produto, tendo sido uma delas validada anteriormente, e ainda nos casos de diferentes formas de comprimidos ou processos bem conhecidos. Aplica-se ainda no caso de alteração de uma etapa de produção já bem definida anteriormente ou quando não existem dados suficientes ou disponíveis sobre dados do desenvolvimento de produtos já comercializados (CHAPMAN; KOLBERGER, *apud* CHOW, LIU, 1995). Na validação concorrente, os sistemas e equipamentos a serem utilizados durante a validação devem ter sido corretamente qualificados anteriormente. A documentação necessária é a mesma daquela especificada na validação prospectiva e os controles em processo a serem conduzidos, bem como as especificações e testes a serem realizados no produto final, devem estar especificados nos protocolos aprovados. Os protocolos completos e os relatórios devem ser revisados e aprovados antes do produto ser liberado para a venda. A validação concorrente pode fornecer informações valiosas para modificar ou corrigir um processo de produção rotineiro, quando um problema é encontrado durante a execução desta validação.

A validação retrospectiva é baseada na revisão histórica de dados a fim de fornecer evidências documentadas de que o desempenho do processo objeto do estudo seja aquele esperado. Esse tipo de validação ainda requer a preparação de protocolos, relatórios contemplando resultados dos dados revisados, conclusão e recomendações. A validação retrospectiva não é o método de escolha para estudos de validação de processo e deverá ser utilizada apenas em casos excepcionais. A escolha desse tipo de estudo somente será aceitável para processos bem conhecidos, no entanto, é inadequada quando houverem ocorrido mudanças recentes na composição do produto, nos procedimentos de produção ou em equipamentos utilizados. As fontes de dados para esse tipo de validação podem

incluir, ordens de produção, registros de Controles em Processo, registros de manutenção, registros de mudança de pessoal, estudos de capacidade, dados do produto acabado e resultados de estabilidade. Talvez seja preciso utilizar ensaios adicionais em amostras de referência futura para obter a quantidade ou o tipo de dados necessários. Para efeito desse procedimento, geralmente analisam-se dados de 10 a 30 lotes consecutivos para avaliar a regularidade do processo, não se esquecendo das exigências quanto à obrigatoriedade de ausência de mudanças nos lotes selecionados. Quando os resultados da validação retrospectiva forem satisfatórios, isso servirá somente como uma indicação de que o processo não necessitará ser objeto de uma validação concorrente imediata.

Uma vez o sistema ou processo validado, é esperado que este permanecesse sob controle desde que não sejam feitas modificações críticas, porém a validação não deve ser considerada como exercício único, devendo haver também revalidações periódicas ou monitoramento para acompanhamento e garantia da qualidade (ANVISA, 2010). A revalidação é necessária para assegurar que as mudanças intencionais ou não, no processo de produção, equipamentos e no ambiente, não afetam adversamente as características do processo e qualidade do produto. A revalidação é obrigatória após qualquer mudança que pode alterar a qualidade do produto, em virtude de introdução de qualquer etapa que afete a fabricação e/ou o procedimento padrão, com influência sobre as características de desempenho estabelecidas para o produto. Cada mudança de matéria-prima, material de embalagem, processo de fabricação, equipamento, controles em processo, áreas de fabricação e utilidades, deve ser avaliada criticamente a fim de determinar se a mesma é suficientemente significativa para justificar a revalidação e, sua abrangência. A revalidação após mudanças pode estar baseada no desempenho dos mesmos testes e atividades realizados durante a validação original, incluindo os testes em processo e aqueles referentes aos equipamentos.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1– Equipamentos principais

2.1.1– Reator

Foi utilizado um reator do tipo vaso encamisado de vidro, que garante alta resistência contra ácidos e permite o monitoramento visual e controle do processo. O vaso é construído em vidro borossilicato, com capacidade total de 10 L, volume útil de 8 L, tampa em aço inox AISI 304 (Figura 8). O reator utilizado possui entrada específica para acoplamento do sensor de referência, modelo 780 (Metrohm, Suíça), sendo este o responsável pelo monitoramento da temperatura e pH ao longo dos processos e do agitador mecânico que assegura eficiência na agitação, bem como a excelência na transferência de calor. O equipamento foi utilizado tanto na etapa de ativação quanto na etapa de conjugação.

Figura 8 –Reator de conjugação e ativação



2.1.2–Controlador de pH do reator

O controlador de pH, modelo PH 402G (Yokogawa, Japão), foi utilizado na etapa de ativação (Figura 9). Neste equipamento foram conectados dois eletrodos para medida do pH, um eletrodo de referência, outro de controle (indicador) e duas sondas de temperatura, modelo PT100 (Yokogawa, Japão), calibrados no momento do uso. Durante a reação, o pH do meio reacional é medido, o sinal gerado é

enviado para um controlador que mantém a mistura no reator em um pH desejável, adicionando, quando necessário, uma solução de NaOH 0,25 ou 2,5 mol.L⁻¹ através de uma bomba dosadora. A temperatura da reação também é monitorada para a compensação da medida do pH. Estes sinais são enviados para um sistema supervisorio (PC) que monitora e auxilia o operador. Os dados de controle, obtidos ao longo do processo, são armazenados pelo equipamento que emite registro após o término da operação.

Figura 9–Controlador de pH do reator de ativação



2.1.3– Titulador automático Titrino

O titulador automático, modelo 718 (Metrohm, Suíça), foi utilizado na etapa de conjugação (Figura 10). O titulador foi acoplado a um dispositivo para aquisição de dados de controle (temperatura e pH), usando o software Tinet 2.50 (Metrohm, Suíça). Acoplado ao titulador foi utilizado um eletrodo combinado de pH (Metrohm, Suíça), calibrado no momento do uso em pH 7 e 4, e uma sonda de temperatura modelo PT1000 do mesmo fabricante.

Figura 10–Titulador automático Titrino



2.1.4– Sistema de cromatografia

O sistema de purificação cromatográfica, Bioprocess 1291 (GE Healthcare Life Sciences do Brasil), utilizado no processo de conjugação, baseia-se no princípio da exclusão molecular, a cromatografia de permeação em gel (Figura 11). Esta é uma técnica utilizada em sistema de HPLC, composta de bomba isocrática, amostrador automático, detector de UV (ultravioleta) e RI (índice de refração), com três colunas cromatográficas em série modelo Sephacryl S 500HR, do mesmo fabricante, com zona de fracionamento para moléculas globulares de 40 mil a 20 milhões de daltons. A aquisição dos dados foi realizada pelo software Unicorn 4.11, acoplado ao equipamento.

Figura 11–Bioprocess System



2.1.5– Tanque

Foi utilizado um tanque sanitizado (Boccard do Brasil), construído em aço inox do tipo 316L, com capacidade para 80L de volume total e dimensões de 61 cm de altura e 57 cm de diâmetro (Figura12), para coleta da fração purificada (PRP-ADH-TT). O tanque utilizado é provido de agitador, medidor de pH, controle de temperatura e registrador. O sistema para topo e fundo do tanque foram previamente esterilizados e possui tubos de silicone grau farmacêutico com “y” de aço inox e engates rápido, para transferência de soluções.

Figura 12–Tanque de coleta



2.2 – Procedimento

O PRP utilizado neste trabalho para obtenção do concentrado vacinal de Hib foi anteriormente processado, isto é, obtido a partir de um processo de cultivo (fermentação), purificado e depois recebido para processamento nas operações de ativação e conjugação.

2.2.1–Reação de ativação

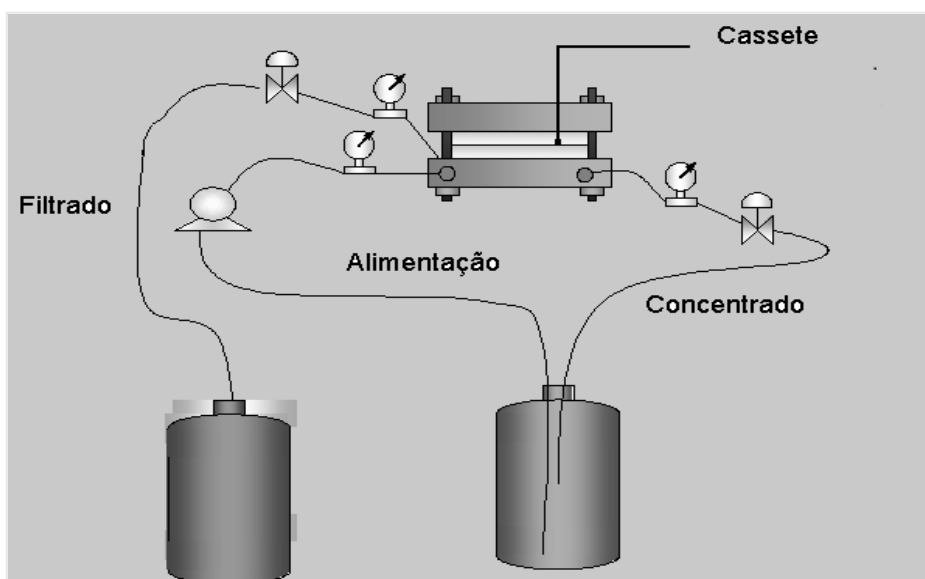
A metodologia adotada para ativação teve como objetivo preparar o polissacarídeo para a reação de conjugação. A primeira etapa da reação de ativação do polissacarídeo foi realizada com a finalidade de forçar a reação do PRP com o brometo de cianogênio (CNBr, Sigma), em meio básico, originando um intermediário reacional isocianato. Desta forma, o PRP recebido foi previamente aclimatado e dissolvido em solução de NaCl 2 mol.L⁻¹ dentro do reator de ativação sob agitação mecânica. Acoplado ao reator existe um “cooler” de refrigeração com recirculação de água deionizada (ADE) e “set point” previamente ajustado para 3,5⁰C, com a finalidade de garantir a temperatura adequada do meio reacional. Após 3 minutos de reação, o reagente CNBr, que previamente foi dissolvido em água para injetáveis (WFI) e homogeneizado por 15 minutos, foi posteriormente adicionado ao meio reacional (PRP dissolvido em solução de NaCl 2 mol.L⁻¹) em aproximadamente 5 segundos.

A segunda etapa da reação de ativação do polissacarídeo ocorreu após 9 minutos da reação entre o PRP e o CNBr, quando o intermediário reacional isocianato formado foi colocado imediatamente para reagir com um grande excesso do nucleófilo bifuncional, dihidrazida do ácido adípico (ADH - Sigma). A ADH antes de ser adicionada ao meio reacional foi previamente aclimatada e dissolvida em solução de NaHCO₃ 0,5 mol.L⁻¹ e homogeneizada por 15 minutos, sendo adicionada ao meio reacional em aproximadamente 20 segundos. Após adição da ADH ao meio reacional, houve a derivatização do PRP, com a formação do derivado de isouréia (PRP-ADH).

O tempo de reação total foi de 99 minutos, sob constante agitação mecânica. Os reagentes em excesso e os subprodutos formados na reação foram eliminados por diafiltração tangencial. A diafiltração tangencial foi realizada três vezes, em três dias

consecutivos, por um sistema de filtração tangencial (CENTRASSETE™ – Pall – Engefiltro), com três membranas do tipo cassete, ômega Screen channel de corte de 10 kDa. Durante as diafiltrações, o meio reacional foi mantido constante, através da adição de solução de NaCl 0,2 mol.L⁻¹ na mesma vazão em que o solvente e moléculas menores do que o corte molecular utilizado passavam para o filtrado, segundo o esquema reacional mostrado na Figura 13.

Figura 13– Sistema de filtração tangencial



As Figuras 14 e 15 representam o esquema da reação de ativação e como estas reações ocorrem, respectivamente.

Figura 14– Esquema da reação de ativação

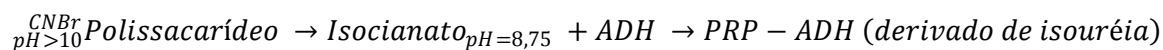
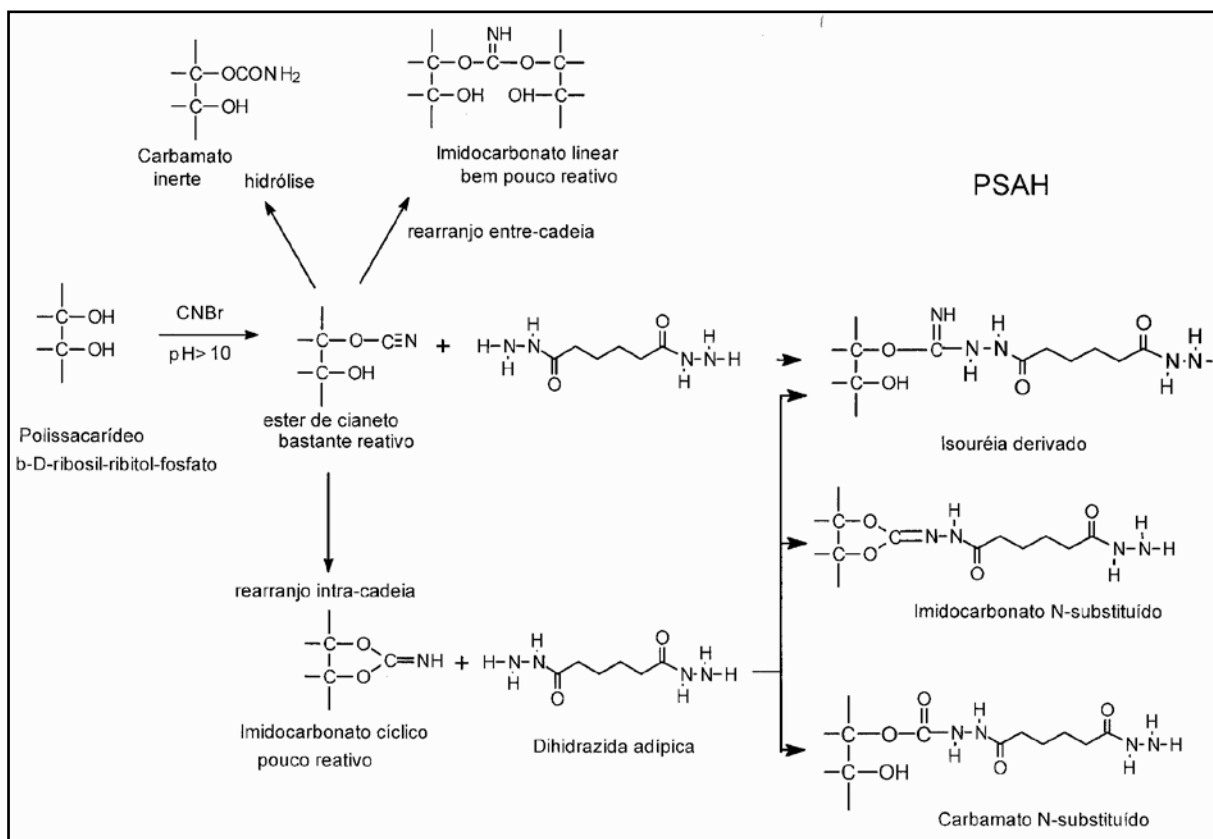


Figura 15 – Reação de ativação. O polissacarídeo é ativado através de reação com o brometo de cianogênio (CNBr), gerando um intermediário ao qual, posteriormente são adicionados grupamentos amino, a partir da reação com a dihidrazida do ácido adípico (ADH). Figura também mostra as reações indesejadas do éster: hidrólise e rearranjos.

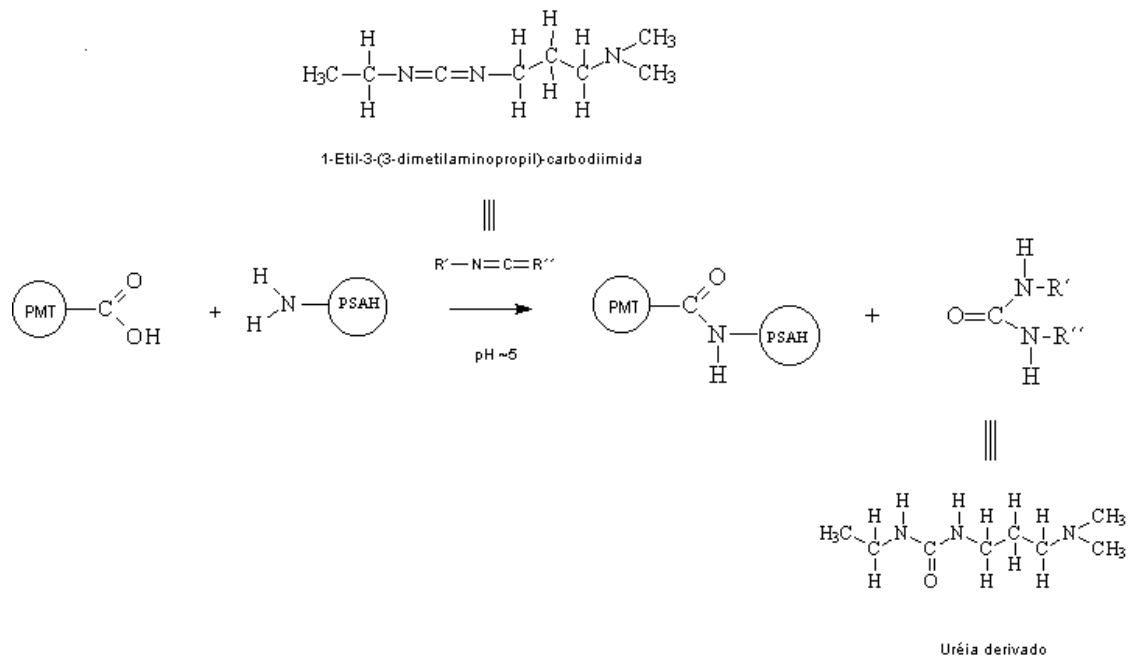


2.2.2–Reação de conjugação

O PRP-ADH, recebido da etapa de ativação, foi transferido para o reator de conjugação e dissolvido em solução de NaCl 0,2 mol.L⁻¹. Acoplado a este reator existe um sistema de refrigeração que recircula, através de mangueiras, água para injetáveis (WFI). O “set point” do sistema de refrigeração foi previamente ajustado para 18 - 22^oC. Ao PRP-ADH, dissolvido em solução de NaCl 0,2 mol.L⁻¹, foi adicionado o reagente 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC, Sigma), sob agitação. O reagente EDAC foi retirado do refrigerador (-20^oC), uma hora antes de ter a massa medida e adicionado ao meio reacional. Em seguida, foi adicionada a proteína monomérica tetânica (PMT, Tecpar) ao meio reacional, com agitação constante. A PMT utilizada foi previamente diluída em solução de NaCl 0,2 mol.L⁻¹ para a concentração de 10 mg.mL⁻¹, para posteriormente ser utilizada na conjugação. Ao término da adição dos reagentes, o conjugado PRP-ADH-TT foi transferido do

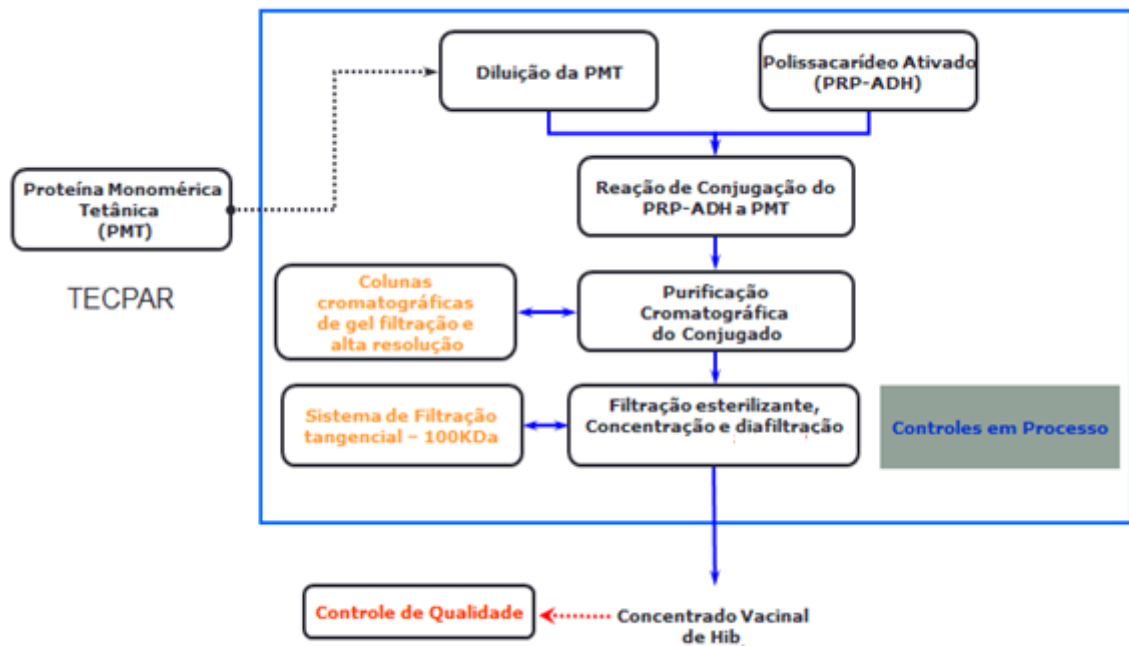
reator para um garrafão pyrex de 10L e a reação foi mantida por mais 72 horas sob agitação lenta a 4-8°C, em câmara fria. A Figura 16 apresenta, de forma esquemática, como ocorrem as reações de conjugação.

Figura 16 –Reação de conjugação. A proteína (PMT) reage com o ácido carboxílico derivatizado em presença do reagente EDAC, gerando um composto com ligação amídica e um derivado isouréia (subproduto).



Após 72 horas de reação em câmara fria, o conjugado PRP-ADH-TT bruto foi purificado por cromatografia de exclusão molecular e a fração eluída de interesse foi recolhida em tanque provido de agitação, com controles de pH e temperatura. Sequencialmente, o conjugado PRP-ADH-TT purificado, foi filtrado em membrana 0,45µm, filtrado em membrana esterilizante 0,22µm, concentrado e diafiltrado estéril obtendo o concentrado vacinal de Hib (PS-TT). A Figura 17 apresenta o fluxograma do método de conjugação.

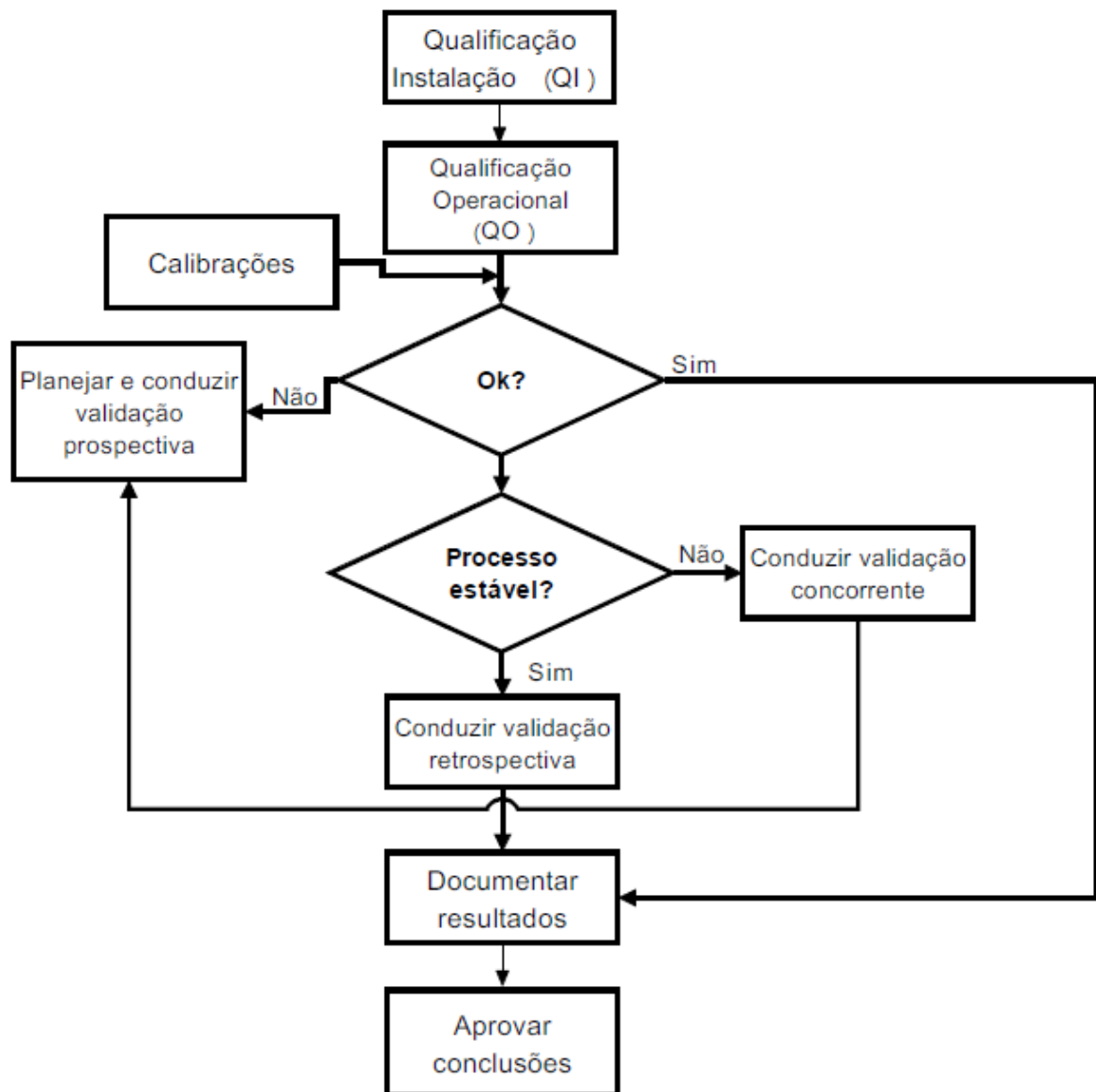
Figura 17 – Fluxograma do método de conjugação



2.2.3– Metodologia de validação adotada

O trabalho propõe a metodologia de validação concorrente para a validação dos processos envolvidos na obtenção do concentrado vacinal de Hib. Para escolha da metodologia ideal de validação que deveria ser submetido o processo em questão, levou-se em consideração a aplicação do fluxograma apresentado na, Figura 18.

Figura 18 – Fluxograma para avaliação do método de validação apropriado.

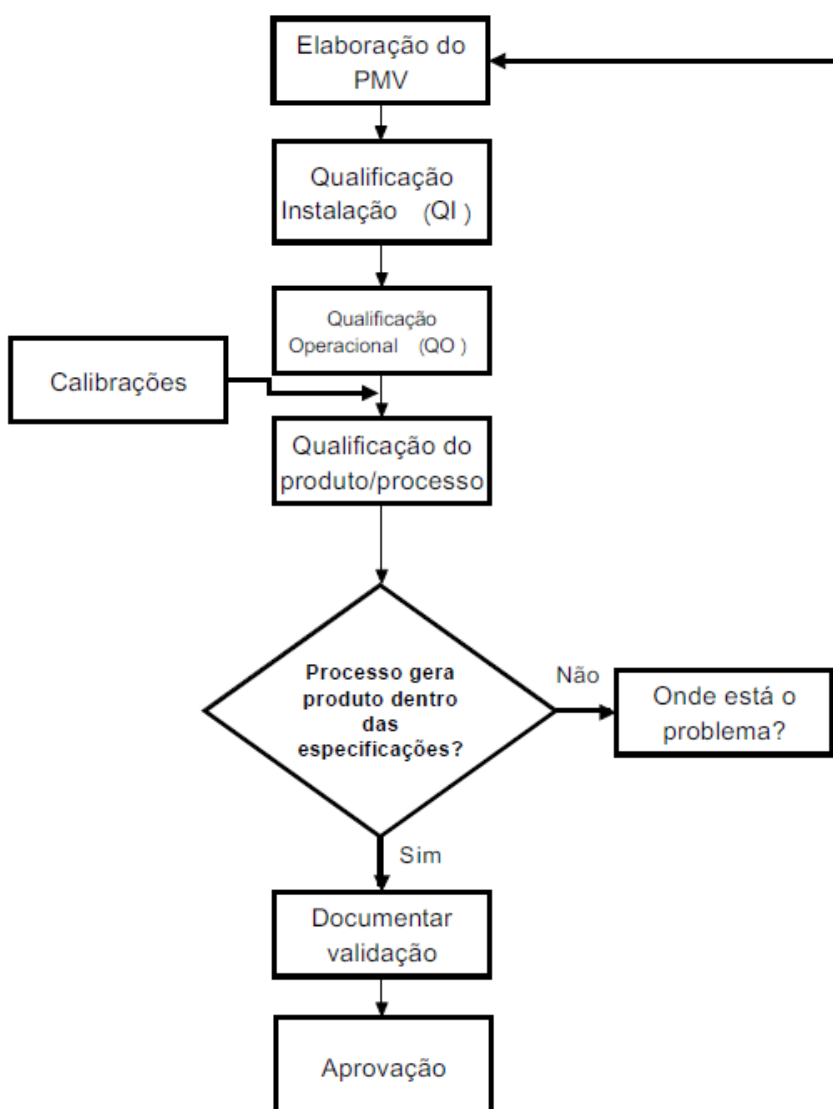


Tal metodologia (validação concorrente) foi considerada a apropriada levando-se em consideração que para o processo proposto a qualificação das instalações (QI), qualificação operacional (QO) e as calibrações de equipamentos críticos já haviam sido realizadas. O segundo passo foi verificar a estabilidade do processo. A palavra estabilidade foi utilizada com sentido de ausência de mudanças no processo e, neste caso em se tratando de um processo recebido em contrato de transferência de tecnologia, levamos em consideração a mudança crítica em se reproduzir um processo em uma nova planta produtiva, com operadores diferentes, podendo ocorrer sim uma diferenciação na aplicação do procedimento. Nesse sentido, se

considerando o processo como não estável, a alternativa sugerida é a de validação concorrente, planejando conforme uma validação prospectiva, documentando os resultados e aprovando as conclusões.

A validação concorrente baseia-se no princípio da metodologia de uma validação prospectiva a qual foi representada no fluxograma, figura 19. Este fluxograma refere-se às etapas básicas desse tipo de validação. Inicia-se uma validação prospectiva com o planejamento e elaboração do plano mestre de validação (PMV), realiza-se a QI, QO e calibrações necessárias, procede-se a qualificação do produto/processo, que seria a qualificação do produto e do processo. E sendo o processo capaz gerando um produto dentro das especificações, elabora-se o relatório de validação e aprovam-se as conclusões. O tamanho da amostra conforme RDC 17 (ANVISA) deve ser de 3 lotes consecutivos.

Figura 19 – Fluxograma de etapas da validação prospectiva.



Para aplicação desta metodologia as etapas de QI (qualificação da instalação) e QO(qualificação operacional) foram verificadas estando de acordo para o prosseguimento do processo. Para a qualificação do produto/processo foram definidos os parâmetros de processo, e os atributos de qualidade para o produto. Os atributos de qualidade para o produto foram obtidos, através de ensaios de controle de qualidade e de controle em processo a serem analisados. Seguidamente foram mapeados os critérios de aceitação utilizados na validação do processo de forma a demonstrar que este produz os resultados esperados com um alto grau de confiabilidade. Todos os parâmetros críticos de processo e atributos de qualidade para o produto que foram controlados durante a execução dos procedimentos de ativação e conjugação estão descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2–Parâmetros críticos de processo

Parâmetro de processo	
Etapa ativação	Etapa conjugação
Tempo máximo armazenamento PRP	Velocidade de agitação do PRP-ADH diluído
Temperatura máxima de armazenamento do PRP	Tempo mínimo para aclimatação da proteína
Tempo mínimo para aclimatação PRP	Tempo mínimo para aclimatação do EDAC
Temperatura de aclimatação PRP	Temperatura do cooler
Temperatura cooler	Velocidade de agitação da proteína antes da transferência para o sistema de adição
Temperatura camisa reator	Tempo mínimo de agitação da proteína antes da transferência para o sistema de adição
Velocidade agitação da solução PRP	Tempo de adição da proteína
Temperatura PRP dissolvido	pH do meio reacional
Tempo agitação da solução PRP	Tempo de permanência do sistema em equilíbrio com controle de pH
Tempo de agitação da solução de ADH	Tempo de reação
Velocidade de agitação da solução de ADH	Velocidade de agitação do PRP-ADH-TT bruto durante o acondicionamento em câmara fria
pH final da solução de ADH	Tempo de reação do PRP-ADH-TT bruto em câmara fria
Temperatura da solução de ADH	Temperatura de acondicionamento do PRP-ADH-TT bruto
Tempo de dissolução de CNBr	Composição do empacotamento das colunas
Velocidade de agitação da solução de CNBr	Kd da fração PRP-ADH-TT eluída
pH do PRP dissolvido no momento da adição do	Velocidade de agitação do tanque de

CNBr	aquecimento de PRP-ADH-TT
pH do PRP dissolvido após adição do ADH	Temperatura da jaqueta do tanque de PRP-ADH-TT
Velocidade de agitação do meio reacional	Temperatura do tanque de PRP-ADH-TT
Tempo de reação	Temperatura final do PRP-ADH-TT
Tempo o entre o início da reação e diafiltração do meio reacional	pH final do PRP-ADH-TT
Área filtrante das diafiltrações	Pressão do tanque de PRP-ADH-TT
<i>Cutt-off</i>	Área filtrante
Integridade dos cassetes	Tamanho do poro
Material das membranas	Material do filtro
Pressão transmembrana durante as diafiltrações	Tempo duração filtração esterilizante PRP-ADH-TT filtrado
Velocidade de agitação do diafiltrado	Volume de PS-TT a ser concentrado
Temperatura de acondicionamento do PRP-ADH diafiltrado	Pressão tanque durante concentração
Holding time do PRP-ADH diafiltrado	Velocidade de agitação do concentrado
	Pressão transmembrana durante concentração
	Vazão do filtrado durante concentração
	Volume do concentrado
	Pressão do tanque durante diafiltração
	Volume de WFI utilizada diafiltração
	Pressão transmembrana durante diafiltração 20L iniciais
	Pressão transmembrana durante diafiltração 21L até 75L
	Vazão do filtrado durante diafiltração

Tabela 3–Atributos de qualidade para o produto

Atributos de qualidade
Etapa ativação
Determinação da concentração de polissacarídeo pelo método colorimétrico – Orcinol
Concentração de ADH – método colorimétrico
Controle da eliminação no concentrado do polissacarídeo ativado após as diafiltrações (%ADH livre)
Determinação da distribuição de peso molecular (%kd <0,3)
Taxa de ativação
Etapa Conjugação - PRP-ADH-TT bruto e purificado
Determinação da concentração de polissacarídeo pelo método colorimétrico – Orcinol
Determinação da concentração de proteínas – Método Lowry
Etapa Conjugação - Concentrado vacinal de Hib
Determinação da concentração de polissacarídeo
Determinação de polissacarídeo livre
Determinação de pH
Determinação da concentração de proteínas
Distribuição de peso molecular (%Kd)
Determinação de proteína livre
Concentração de EDAC
Concentração de cianeto
Taxa de conjugação (razão ps/pt)

Para verificação da consistência do processo foram utilizados critérios de aceitação pré-determinados.

2.2.4– Seleção dos pontos críticos de controle

Os pontos críticos de controle, os quais se encontram listados nas Tabelas 2 e 3, para os processos de ativação e conjugação foram mapeados através de uma equipe multidisciplinar, onde foram utilizados como base toda documentação interna de produção (POP – procedimento operacional padrão e IT – instrução de trabalho), fluxogramas de processo, fórmulas mestras, dossiês de produção de lotes anteriores, especificações de qualidade e documentação da transferência de tecnologia. No entanto, em se tratando de reações químicas atenção especial foi dada aos seguintes parâmetros: temperatura, pH, tempo de reação e de adição dos reagentes. As metodologias de controle destas variáveis foram descritas a seguir.

2.2.4.1–Controle das variáveis de interesse durante processo de ativação

O pH e a temperatura do meio reacional foram controlados através do medidor de pH (Yokogawa, Japão), e pelas sondas de temperatura, modelo PT100 (Yokogawa, Japão), enquanto o tempo foi monitorado por cronômetro. O controle rigoroso das condições do meio reacional foi extremamente importante para garantir que ocorra a reação de interesse, evitando a possível hidrólise do polissacarídeo, já que este não é muito estável no pH ideal para a reação (pH = 10).

❖ Calibração do controlador de pH e temperatura

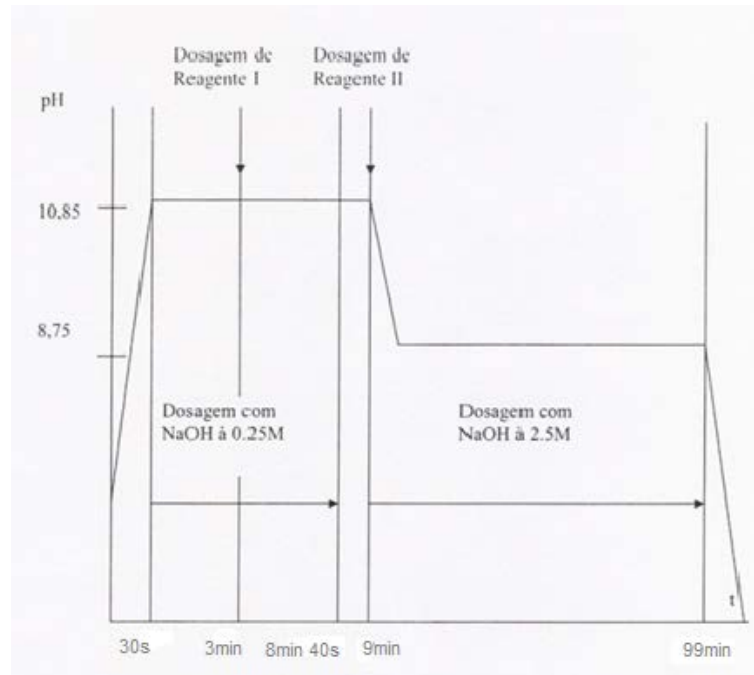
Antes da reação química propriamente dita, os eletrodos indicador e referência do controlador (Yokogawa, Japão), foram calibrados com as soluções padrão pH 4,01 e 7,00 (Merck, Alemanha) e verificados com as soluções padrão pH 4,01, 7,00, 9,21 e 11,00 (Mettler, Suíça).

Na etapa de calibração, os eletrodos de pH e as sondas de temperatura foram conectados ao controlador de pH (Yokogawa, Japão), em seguida eles foram rinsados com água WFI e imersos na solução padrão de pH 7,00. Após estabilização, a temperatura da solução foi verificada devendo estar preferencialmente entre 4 e 6°C. Em seguida, foi iniciada a calibração automática pelo equipamento. Este procedimento foi repetido para solução padrão 4,01, após a rinsagem dos eletrodos de pH e sondas de temperatura com água deionizada. Após a calibração, a verificação da linearidade dos eletrodos foi realizada pelo equipamento. Os eletrodos e as sondas de temperatura foram imersas nas soluções padrão 4,01, 7,00, 9,21 e 11,00, respectivamente, com rinsagem dos eletrodos e sondas de temperatura com WFI na troca de cada solução padrão. Foi emitido o relatório da calibração e verificação pelo equipamento.

❖ Controle de pH do meio reacional durante a reação de ativação

Durante todo o processo de ativação, o pH do meio reacional foi controlado através do controlador de pH, Figura 20. Para manter o pH do meio reacional dentro da faixa especificada na figura 23, durante a dosagem do CNBr, foi utilizado como agente de titulação uma solução de NaOH 0,25 mol.L⁻¹ e durante a dosagem da ADH uma solução de NaOH 2,5 mol.L⁻¹.

Figura 20 – Curva de pH durante a reação de ativação.



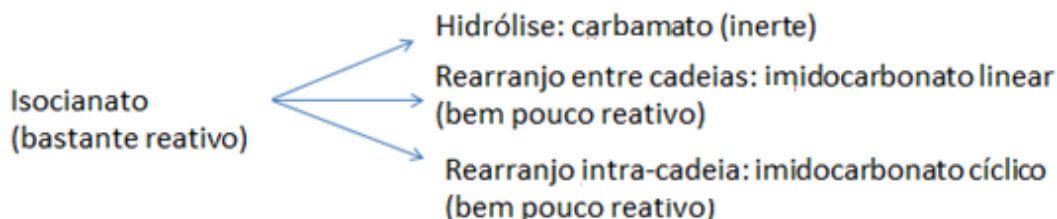
No início do processo, foi realizada a correção do pH da solução do PRP que encontrava-se na faixa de 5,00 – 6,00 para 10,85, através da adição de solução de NaOH 0,25mol.L⁻¹. Após 3 minutos, a reação de ativação foi iniciada através da adição em excesso de uma solução de CNBr ao meio reacional. Esta adição foi realizada, em aproximadamente, 5 segundos mantendo-se o controle contínuo de pH em 10,85, por mais 6 minutos.

Após 9 minutos, a adição de ADH em excesso ao meio reacional foi realizada em 20 segundos, ocorrendo um decréscimo no pH para 8,75, e em seguida a reação foi mantida sob controle por mais 90 minutos. Durante os 90 minutos, a manutenção do pH, no meio reacional, foi conseguida através da adição de solução de NaOH 2,5mol.L⁻¹. A duração total da reação química foi de 99 minutos. Durante os primeiros 15 minutos de reação, o pH e temperatura do meio reacional foram controlados com medição a cada 60 segundos e somente foi realizado um novo controle quando concluída a reação química com 99 minutos.

O excesso de brometo de cianogênio e o controle do meio reacional foram fundamentais nesta etapa, porque esta é uma reação secundária (apenas 5% do brometo foi utilizado para a reação). Além disso, o éster de cianeto ou isocianato, que é bastante reativo, poderia sofrer hidrólise e gerar o carbamato que é inerte ou sofrer um rearranjo entre as cadeias, formando o imidocarbonato linear ou, ainda,

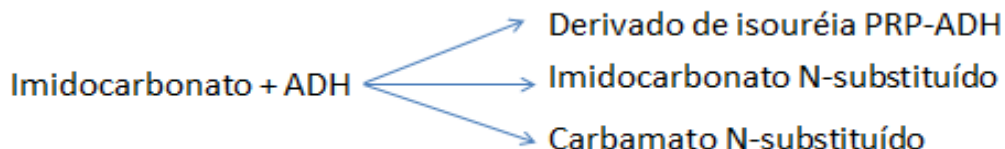
sofrer rearranjo da própria cadeia originando o imidocarbonato cíclico que são bem pouco reativos, conforme o desenho esquemático mostrado na Figura 21.

Figura 21–Reações indesejadas do Isocianato: hidrólise e rearranjos.



Além do Isocianato, o imidocarbonato formado, embora pouco reativo, também reagiu com a ADH produzindo, além do derivado de isouréia, o imidocarbonato N-substituído e o carbamato N-substituído, mostrado na Figura 22.

Figura 22–Reações do imidocarbonato



O excesso de ADH foi importante para forçar que o isocianato reagisse com a ADH em detrimento da reação de hidrólise e dos rearranjos possíveis do éster.

2.2.4.2–Controle das variáveis de interesse durante processo de conjugação

O pH foi monitorado através do equipamento titulador automático Titrino, modelo 718 (Metrohm, Suíça), durante todo o tempo da reação. Foi utilizado um cronômetro para acompanhar o tempo de reação. Na reação de conjugação, o PRP derivatizado foi ligado à proteína tendo como mediador o reagente 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC), o qual teve a função de ativar o grupamento carboxila existente na proteína.

❖ Calibração do titulador automático

Foi realizada calibração do eletrodo combinado de pH (Metrohm, Suíça), com as soluções padrão pH 7 e 4 (Merck, Alemanha), antes da reação de conjugação.

❖ Controle de pH do meio reacional durante a reação de conjugação

O pH do meio reacional foi mantido entre 4,8 – 5,2 e a temperatura entre 18-22°C. Durante a reação química, quando houve necessidade de ajuste no pH do meio reacional, foi utilizado como agente de titulação a solução de HCl 2,5 mol.L⁻¹ estéril. O pH inicial do meio (PRP-ADH diluído em NaCl 0,2mol.L⁻¹) foi medido e o decréscimo de pH até 5,0, para início da adição do reagente EDAC foi aguardado. A adição do EDAC ao meio reacional foi realizada de uma só vez e mantendo-se o controle contínuo de pH, até que o mesmo retornasse a 5,0, para iniciar a adição da proteína monomérica tetânica (PMT). A adição da proteína foi realizada lentamente ao meio reacional, em torno de 60-70 minutos, isso se deve a possibilidade de reações intercadeia de PMT, ocorrendo preferencialmente à reação de conjugação e reduzindo o rendimento na obtenção do conjugado. Após término da adição da proteína, o pH do sistema permaneceu em equilíbrio e foi monitorado por mais 60 minutos, totalizando em torno de 120-130 minutos de reação. Em seguida, o conjugado obtido PRP-ADH-TT bruto foi colocado sob agitação lenta em câmara fria por três dias.

2.2.5– Purificação do conjugado PRP-ADH-TT bruto

A cromatografia por exclusão molecular foi utilizada para separar o conjugado PRP-ADH-TT bruto, dos reagentes não conjugados. Esta etapa compreendeu três operações sucessivas: teste de desempenho, regeneração da coluna e purificação do conjugado.

A primeira etapa foi realizada para certificar que a coluna estava em condições de operação. Na regeneração, a coluna foi sanitizada e acondicionada para purificação. A purificação ocorreu com detecção por UV em 280nm, onde foi coletado o conjugado purificado que eluiu até coeficiente de distribuição (Kd) 0,40. O conjugado purificado eluído foi recolhido em tanque de aço inox, previamente sanitizado, e mantido sob agitação. O “set-point” do tanque, o qual continha a fração eluída de interesse, foi ajustado para 18 °C e do trocador de calor para 25°C. Em seguida, o pH e temperatura do conjugado purificado recolhido foram medidos. Posteriormente, este foi filtrado em membrana 0,45µm, sendo recolhido em

outro tanque e mantido pressurizado. Após a filtração, o conjugado purificado passou por filtração esterilizante em membrana 0,22µm, seguidamente foi concentrado e diafiltrado em sistema de filtração tangencial para obtenção do concentrado vacinal de Hib (PS-TT)

2.2.6– Definição dos pontos de amostragens

Após cada etapa realizada, ativação e conjugação, uma amostra do produto obtido foi recolhida. A amostra retirada foi ampliada em 50% a mais que a amostra de rotina, este é um requisito mandatório em guias utilizados para validação de processos (ANVISA, 2006). As amostras retiradas foram submetidas às metodologias analíticas específicas, conforme descrito a seguir.

Foram retiradas duas amostras de 10,0mL de PRP-ADH, após as diafiltrações tangenciais, para determinação das concentrações de polissacarídeo e ADH, controle da eliminação no concentrado do polissacarídeo ativado após as diafiltrações, determinação da distribuição do peso molecular, assim como taxa de ativação, sendo esta uma amostragem para controle de processo.

Foram retiradas duas amostras de 6,0mL de PRP-ADH-TT bruto, após reação de conjugação, para determinação das concentrações de polissacarídeo e de proteína. Esta sequência de amostragem foi repetida para o PRP-ADH-TT purificado e ajustado, após a etapa cromatográfica. Estas amostras foram encaminhadas para controle de processo.

Foram retiradas três amostras de 10 mL, do concentrado vacinal PS-TT após concentração e diafiltração tangencial, para determinação das seguintes metodologias: proteína livre, pH, concentração de proteína, distribuição de peso molecular, concentração de polissacarídeo, concentração de EDAC, taxa de conjugação e cianeto. Foram retiradas cinco amostras de 1 mL, para determinação de polissacarídeo livre. Estas amostras foram encaminhadas para Controle de Qualidade.

2.2.7–Critérios de aceitação

Para que os processos sejam considerados validados, após realização das três corridas, os parâmetros de processo e os atributos de qualidade para o produto devem obedecer aos critérios de aceitação constantes das Tabelas 4 e 5.

Tabela 4–Critérios de aceitação parâmetros de processo

Parâmetro de processo	Critério de aceitação
Etapa Ativação	
Tempo máximo armazenamento PRP	5 anos
Temperatura máxima de armazenamento do PRP	- 15 °C
Tempo mínimo para aclimação PRP	30 minutos
Temperatura de aclimação PRP	Temperatura ambiente
Temperatura cooler	3,0 ±0,5 °C
Temperatura camisa reator	5,8 a 6,0 °C
Velocidade agitação da solução PRP	500 ±10 rpm
Temperatura PRP dissolvido	5,8 a 6,0 °C
Tempo agitação da solução PRP	1,5 a 8 h
Tempo de agitação da solução de ADH	30 ±15 minutos
Velocidade de agitação da solução de ADH	150 ±50 rpm
pH final da solução de ADH	9,0 ±0,1
Temperatura da solução de ADH	4 a 10 °C
Tempo de dissolução de CNBr	15 a 30 minutos
Velocidade de agitação da solução de CNBr	150 ±50 rpm
pH do PRP dissolvido no momento da adição do CNBr	10,85
pH do PRP dissolvido após adição do ADH	8,75
Velocidade de agitação do meio reacional	250 ±10 rpm
Tempo de reação	99 minutos
Tempo entre o início da reação e diafiltração do meio reacional	3h e 15min (±15 min)
Área filtrante das diafiltrações	1,38 m ²
<i>Cutt-off</i>	10Kd
Integridade dos cassetes	Conforme
Material das membranas	Polietersulfona
Pressão transmembrana durante as diafiltrações	0,5 ±0,1
Velocidade de agitação do diafiltrado	150 ±50 rpm
Temperatura de acondicionamento do PRP-ADH diafiltrado	2 – 8 °C
Holding time do PRP-ADH diafiltrado	No máximo 48h
Etapa Conjugação	
Velocidade de agitação do PRP-ADH diluído	250 ±50 rpm
Tempo mínimo para aclimação da proteína	1 a 2 h
Tempo mínimo para aclimação do EDAC	1 h
Temperatura do cooler	18-22 °C

Velocidade de agitação da proteína antes da transferência para o sistema de adição	200 ±10 rpm
Tempo mínimo de agitação da proteína antes da transferência para o sistema de adição	2 minutos
Tempo de adição da proteína	60 a 70 minutos
pH do meio reacional	5,0 ±0,2
Tempo de permanência do sistema em equilíbrio com controle de pH	Mínimo 60 minutos
Tempo de reação	120 a 130 minutos
Velocidade de agitação do PRP-ADH-TT bruto durante o acondicionamento em câmara fria	70 ±10 rpm
Tempo de reação do PRP-ADH-TT bruto em câmara fria	2 a 3 dias
Temperatura de acondicionamento do PRP-ADH-TT bruto	2 - 8 °C
Composição do empacotamento das colunas	Sephacryl HR500
Kd da fração PRP-ADH-TT eluída	0,40
Velocidade de agitação do tanque de aquecimento de PRP-ADH-TT	100 ±10 rpm
Temperatura da jaqueta do tanque de PRP-ADH-TT	25 °C
Temperatura do tanque de PRP-ADH-TT	18 °C
Temperatura final do PRP-ADH-TT	20 ±2 °C
pH final do PRP-ADH-TT	6,1 ±0,3
Pressão do tanque de PRP-ADH-TT	0,7 ±0,2 bar
Área filtrante	1,2 m ²
Tamanho do poro	0,65 – 0,45 µm
Material do filtro	Acetato de celulose
Tempo duração filtração esterilizante PRP-ADH-TT filtrado	≤90 minutos
Volume de PS-TT a ser concentrado	65 ±5L
Pressão tanque durante concentração	0,2 ±0,1 bar
Velocidade de agitação do concentrado	250 ±50 rpm
Pressão transmembrana durante concentração	0,2 ±0,1 bar
Vazão do filtrado durante concentração	1,5 ±0,5 L/min
Volume do concentrado	7,5 – 8,25L
Pressão do tanque durante diafiltração	0,2 ±0,1 bar
Volume de WFI utilizada na diafiltração	75 ±1L
Pressão transmembrana durante diafiltração 20L iniciais	0,2 ±0,1 bar

Pressão transmembrana durante diafiltração 21L até 75L	0,5 ±0,1 bar
Vazão do filtrado durante diafiltração	2,0 ±1,0L/min

Tabela 5–Critérios de aceitação atributos de qualidade para o produto

Critério de aceitação	
Etapa Ativação	
Determinação da concentração de polissacarídeo pelo método colorimétrico – Orcinol	>2500 µg/mL
Concentração de ADH– método colorimétrico	A quantificar (µg/mL)
Controle da eliminação no concentrado do polissacarídeo ativado após as diafiltrações (%ADH livre)	<10%
Determinação da distribuição de peso molecular (%kd <0,3)	>25%
Taxa de ativação	1,0 – 2,5%
Etapa Conjugação - PRP-ADH-TT bruto e purificado	
Determinação da concentração de polissacarídeo pelo método colorimétrico – Orcinol	A quantificar (µg/mL)
Determinação da concentração de proteínas – Método Lowry	A quantificar (µg/mL)
Etapa Conjugação –PS-TT Concentrado vacinal de Hib	
Determinação da concentração de polissacarídeo	500-1000 µg/mL
Determinação de polissacarídeo livre	No máximo 20%
Determinação de pH	5,0 a 7,0
Determinação da concentração de proteínas	A quantificar (µg/mL)
Distribuição de peso molecular (%Kd)	≥80% com K≤0,2
Determinação de proteína livre	<1,0%
Concentração de EDAC	<1,5 µg/mL
Concentração de cianeto	No máximo 10 ng/mL
Taxa de conjugação (razão ps/pt)	0,3 A 0,6

2.3– Metodologias Analíticas

2.3.1– Determinação do conteúdo de polissacarídeo – Método colorimétrico orcinol

A determinação de polissacarídeo foi feita de acordo com a metodologia descrita por Ashwell (1957), convertendo-se os valores encontrados de ribose em

concentração de PRP. Para se determinar a concentração de ribose, o polímero é hidrolisado pela ação combinada do ácido clorídrico e íon cloreto com aquecimento. O orcinol reage com a ribose, proveniente do polissacarídeo, produzindo um complexo verde (furfural) cuja absorvância é proporcional à concentração de ribose. As operações da metodologia analítica empregada são descritas, de forma resumida, a seguir:

Alíquotas de 400µL de amostras de PRP foram distribuídas em tubos de ensaio, fazendo-se as diluições necessárias. Em seguida, 800 µL do reagente orcinol foram adicionados à amostra. A mistura foi homogeneizada e aquecida em placa de aquecimento a 100°C, por 20 minutos. A concentração de ribose foi obtida medindo-se a absorvância da amostra, em 669nm e interpolando-se na curva analítica feita com ribose. De acordo com a fórmula molecular do PRP, a concentração de ribose, determinada por este método, deve ser multiplicada por um fator de 2,5 para obter a concentração de PRP da amostra.

2.3.2– Determinação da concentração de ADH

A concentração de ADH presente na amostra foi determinada por espectrofotometria através do método do ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS-Pierce) descrita por Qi e colaboradores (1988) com algumas modificações.

Neste ensaio, 500 µL das amostras foram incubadas com 500 µL de uma solução saturada de borato de sódio, em tubos de ensaio, por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 125 µL de uma solução de TNBS 30mg.mL⁻¹, deixando-se incubar por mais 30 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi medida em 490nm e a curva analítica foi determinada empregando-se ADH em concentrações variando de 0 a 10 µg.mL⁻¹. A concentração das amostras foi calculada através da curva analítica, considerando-se o fator de diluição.

Esta metodologia permite dosar somente os grupos hidrazidas (NH₂NH-) livres presentes na amostra. A função amina presente na ADH reage com o reagente TNBS quando colocada em contato com borato de sódio para produzir uma coloração alaranjada, cuja intensidade foi medida espectrofotometricamente.

2.3.3– Determinação do percentual de ADH livre

A determinação do percentual de ADH livre na amostra foi realizada por cromatografia de gel filtração, no equipamento, modelo Alliance 2695, Waters, Estados Unidos.

Nesta determinação, 1,0 mL de amostra foi filtrado em filtro 0,45 μ m para um *vial* de vidro com tampa roscada e septo de silicone. Em seguida o *vial* foi posicionado no carrossel e as condições de análise determinadas no equipamento conforme dados a seguir: volume de injeção de 30 μ L de amostra com tempo de corrida de 20 minutos, vazão de 1 mL.min⁻¹, medida do sinal em 206 nm e o eluente utilizado foi solução de cloreto de sódio 0,2 mol.L⁻¹. A eluição do polissacarídeo ativado foi realizada no volume morto da coluna e a eluição do ADH próximo ao volume máximo de retenção de 10 minutos. A quantidade de ADH foi calculada pelo percentual do pico após tempo de retenção de 10 minutos, em relação à superfície total do cromatograma.

2.3.4– Determinação da concentração de proteínas

A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Folin-Lowry (KUMAR *et al.*, 2005). Esta quantificação é determinada através de um método espectrofotométrico baseado em uma reação química entre as ligações peptídicas das proteínas com o cobre, em meio alcalino, para produzir Cu⁺, que deve reagir com o reagente do Folin, formando um complexo de coloração azul que deve ser detectado em 750 nm. A coloração desenvolvida é mais intensa que a de cada reagente em separado, o que torna o método de Folin-Lowry muito sensível.

Neste ensaio, 200 μ L de cada amostra foram transferidos para um tubo de ensaio e adicionou-se 1,0 mL da solução quelante, constituída de 0,5 mL de solução de tartarato de potássio a 2% m/v, 0,5 mL de solução de sulfato de cobre II (CuSO₄.5H₂O) a 1% m/v e 50 mL de solução de carbonato de sódio a 2% em NaOH 0,1 mol.L⁻¹, preparada no momento do uso. Após 10 minutos de reação à temperatura ambiente, foi adicionado 100 μ L de solução de Folin fenol Ciocauteus 1/2, homogeneizado e colocado a reação por mais 30 minutos a mesma temperatura. Após 30 minutos, o conteúdo dos tubos foi transferido para uma cubeta. O espectrofotômetro teve o sinal zero ajustado com a solução branco e a absorvância da solução foi medida em 750 nm.

2.3.5– Determinação da taxa de conjugação

A taxa de conjugação foi quantificada através da relação concentração de polissacarídeo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)/concentração de proteína ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

2.3.6– Determinação da distribuição da massa molar (% kDa)

A distribuição de peso molecular foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular. Foi utilizada uma coluna analítica Tosohaas TSK G5000 PWXL-CP 10 μm (7,8 mm ID X 30cm L).O sistema foi equilibrado através da passagem da fase móvel, uma solução constituída de NaCl 0,2 mol.L⁻¹/TRIS 0,01mol.L⁻¹, pH 7,0, a uma vazão de 0,3mLmin⁻¹, até obtenção de uma linha de base estável. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 25°C durante a análise e a amostra foi diluída por quatro na fase móvel.

Os polissacarídeos contêm uma fração de alto peso molecular eluindo no volume nulo da coluna. O volume de eluição desse polissacarídeo de alto peso molecular foi utilizado para determinar o valor de V_0 . O volume total V_t foi determinado com solução de azida sódica.A eluição do soluto foi caracterizada por um coeficiente de distribuição (K_d) definido como:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (I)$$

Onde,

V_0 = volume de eluição do primeiro pico do polissacarídeo fração de maior peso molecular

V_t = volume de eluição da solução de azida sódica

V_e = volume de eluição da solução do polissacarídeo

A quantidade do polissacarídeo eluídaa um $K_d \leq 0,20$ foi determinada através da equação (II), abaixo descrita. O valor de V_e foi obtido através da utilização do marcador Dextrana que possui K_d próximo ao valor 0,2. Desta forma, a percentagem eluída para este K_d foi marcada no cromatograma, para cálculo do V_e .

$$V_e = [0,2 \times (V_t - V_o)] + V_o \quad (II)$$

2.3.7– Determinação de polissacarídeo livre

O polissacarídeo livre foi determinado através do ensaio imunoenzimático ELISA. O preparo da amostra foi realizado da seguinte forma:

➤ Incubação com soro anti-TT (cobaia):

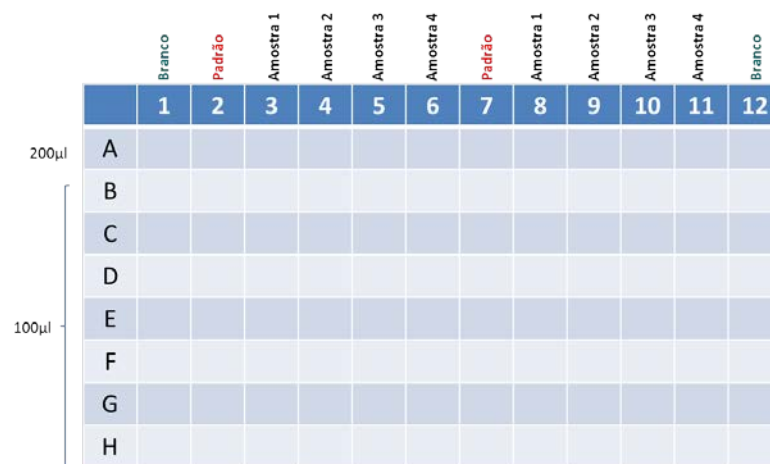
A amostra foi previamente diluída em NaCl 0,9% m/v até a concentração de $1,088\text{ug.mL}^{-1}$ de polissacarídeo total e posteriormente incubada em uma solução contendo soro anti-TT IgG na diluição de 1:50. A amostra foi homogeneizada em vortex e incubada sob agitação a 150rpm por 2hs à 37°C. Após tratamento a amostra com soro anti-TT IgG, foi adicionado gota a gota 360mL de PEG 6000 a 50% e ,em seguida, a amostra foi homogeneizada e mantida em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, a mesma foi centrifugada durante 30 minutos a 12.000rpm para que os polissacarídeos (PRP) conjugados ao TT fiquem precipitados no fundo do tubo eppendorf e a parte solúvel correspondente ao polissacarídeo livre fique no sobrenadante. O sobrenadante foi diluído na proporção de 1:10 em PBS-T(diluição de trabalho) para posterior uso.

➤ Ensaio:

Placas de 96 poços, conforme representada na Figura 23, foram sensibilizadas com anticorpo anti-PRR'P na concentração de 1/6000 (100 μL / poço) e incubadas durante 2 horas à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes com 100 μL da solução NaT (Cloreto de sódio 0,9% m/v e Tween 20 0,05% v/v, pH 7,4) e quatro vezes com 100 μL de água para injetáveis (WFI). Posteriormente foram adicionados, 200 μL de PBS-T nos orifícios A1 e A12, 200 μL da solução diluída do polissacarídeo padrão na concentração de $488\mu\text{g.mL}^{-1}$ nos orifícios A2 e A7 e 200 μL das amostras em duplicatas na diluição de trabalho nos orifícios A3 e A8, A4 e A9, A5 e A10 e A6 e A11. Em seguida, foi adicionado 100 μL de solução de PBS-T em todos os orifícios da microplaca da linha B a H para a realização da diluição seriada das amostras e padrão. A placa foi incubada por 18 horas à 4°C. A seguir, estas foram lavadas, da mesma forma descrita acima, para posterior adição do anticorpo conjugado anti-PRR'P-HRPO diluído em PBS-T na concentração de 1/1500 (100 μL /poço). Esta foi mantida em agitação orbital por 30 minutos à temperatura ambiente. Na etapa final, as placas foram novamente lavadas, da forma descrita

anteriormente e adicionados 100µL por orifício do tampão de revelação, constituído de 10 mL de tampão fosfato, 4 mg de orto-fenilenodiamina e 10 µL de solução de H₂O₂ a 30%v/v, e incubadas a temperatura ambiente até ocorrer a viragem de cor. A atividade enzimática foi bloqueada com a adição de 50 µL de uma solução H₂SO₄ 2 mol.L⁻¹ através do orifício da placa e a absorvância medida, em cada orifício, em 490 nm em um leitor de ELISA.

Figura 23 – Representação da placa de 96 poços e esquema de análise.



2.3.8– Determinação de proteína livre

A determinação da proteína livre na amostra foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, no equipamento, modelo Alliance 2695, Waters, Estados Unidos. Previamente, foi determinada a concentração de proteína e a distribuição de peso molecular do conjugado PRP-ADH-TT purificado.

Nesta determinação, a amostra foi preparada com 1,0 mL de PRP-ADH-TT, o volume determinado de proteína diluída e o volume de fase móvel, constituída de Tris 0,01 mol.L⁻¹/NaCl 0,2mol.L⁻¹, suficiente para completar 4,0 mL. A quantidade de proteína livre a ser adicionada foi calculada de forma a termos 1% da concentração total de proteína do conjugado PRP-ADH-TT. As condições de análise foram as seguintes: volume de injeção de 100 µL de amostra com tempo de corrida de 60 minutos, vazão de 0,3mL.min⁻¹ e medida do sinal em 206nm. O conteúdo de proteína livre foi determinado através da comparação dos cromatogramas de distribuição de peso molecular do conjugado PRP-ADH-TT puro e do PRP-ADH-TT acrescido de PMT, de forma a termos 1% de proteína livre na amostra final.

2.3.9– Determinação da taxa de ativação

A taxa de ativação foi quantificada através da relação concentração de ADH ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) /concentração de proteínas($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

2.3.10– Determinação de EDAC

A quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com uma coluna C18, 5 μm , 300 ângstrons de tamanho de poro, no cromatógrafo líquido, modelo Alliance 2695, Waters, Estados Unidos. Um volume de amostra foi centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para análise.

A corrida cromatográfica foi realizada em tampão ácido (pH 3,25) contendo acetonitrila como modificador orgânico. O padrão de referência de EDAC (clorídrico) foi devidamente diluído em água purificada e acidificada uma hora antes da injeção. O volume de injeção (amostra e padrão) foi de 100 μL , a vazão de 1mL.min^{-1} com a medição do sinal em 214nm. Os picos de EDAC, do padrão e da amostra aluíram em um tempo de retenção em torno de 5 minutos. A área do pico de EDAC residual na amostra foi determinada e comparada com a área obtida com o padrão de EDAC.

2.3.11– Determinação de cianeto

O cianeto residual foi determinado na amostra por cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica pulsada. O equipamento utilizado foi o cromatógrafo de íons DX 500 Dionex, Estados Unidos, com detector eletroquímico ED 40. A fase móvel usada apresentou a seguinte composição NaOH $0,4\text{mol.L}^{-1}$ /Na₂C₂O₄ $7,5\text{mol.L}^{-1}$ sendo preparada anteriormente a determinação. A curva analítica de cianeto foi preparada a partir de uma solução estoque de cianeto a 1mg.mL^{-1} devidamente diluída para 10ng.mL^{-1} . Foi transferida uma amostra de 3,6 mL para o frasco do amostrador Dionex (vial de 8mL), a linha de base foi estabilizada e iniciada a sequência da determinação. Foi utilizada uma coluna analítica Ion Pac AS7 250mm x 4mm, volume de injeção de 1500 μL , vazão de $1,0\text{mL.min}^{-1}$ com um tempo de retenção de aproximadamente 9,0min.

2.3.12– Determinação de pH

A determinação do pH das amostras foi realizado através da potenciometria direta, a qual determina a concentração do íon ativo simplesmente medindo a f.e.m da célula, com auxílio de um eletrodo. O equipamento utilizado na medição possui um eletrodo combinado, contendo um eletrodo de indicador com membrana de vidro e um eletrodo de referência prata/cloreto de prata. O equipamento foi devidamente calibrado antes da medição. No momento da medida, um volume de 10 mL de amostra foi transferido para um bécher de 25 mL, previamente limpo, em seguida foi realizada a imersão do eletrodo na amostra para medida. Foi anotado o valor de pH da amostra após a estabilização.

3– RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Obtenção do concentrado vacinal de Hib

Foram realizadas três corridas consecutivas, de acordo com o protocolo de validação concorrente adotado, obtendo-se três lotes em escala industrial do concentrado vacinal de Hib, a partir das etapas de ativação e conjugação conforme o procedimento descrito nos itens 2.2.1 e 2.2.2. Os tamanhos dos lotes de concentrado vacinal de Hib obtidos neste experimento foram: 7722 mL (lote PS-TT01), 7849 mL (lote PS-TT02) e 7892 mL (lote PS-TT03). Seguindo o preconizado pela ANVISA (2006) é mandatório que os lotes de validação devem ser, do mesmo tamanho dos lotes industriais a serem produzidos na rotina e posteriormente comercializados.

Para os lotes produzidos, neste experimento, foram utilizados como partida três diferentes lotes de PRP anteriormente fermentado e sequencialmente purificado em Bio-Manguinhos. A proteína (PMT) utilizada na etapa de conjugação foi fornecida pelo Instituto Tecpar (Instituto Tecnológico do Paraná), já pronta para utilização, isto é, fermentada e detoxificada, sendo este o fornecedor responsável deste insumo para as produções de rotina.

Foi realizada avaliação dos operadores envolvidos, a verificação da qualificação dos equipamentos críticos aos processos e a calibração dos instrumentos necessários conforme demonstrado na Figura 24. Os resultados destas avaliações encontram-se no texto a seguir.

3.1.1– Avaliação da operação

Os operadores envolvidos nos processos de ativação e conjugação, estavam devidamente treinados nos procedimentos operacionais internos específicos para execução de cada atividade, conforme ANEXO B.

Pode-se verificar no anexo B, em questão, que para a etapa de ativação foram necessários quatro operadores e para etapa de conjugação seis operadores. Todos os operadores foram previamente treinados nos dois procedimentos internos, no caso da etapa ativação e em quatro procedimentos internos, no caso da etapa conjugação. Estes procedimentos são diretamente ligados às etapas práticas que foram desenvolvidas. Foram utilizados os mesmos operadores nas três corridas de validação, para cada etapa específica, ativação e conjugação, a fim de evitar o

acréscimo de variáveis ao experimento. Tais operadores também obtiveram aprovação prática na reprodução dos procedimentos, sem qualquer restrição quanto à operação, comprovando a aptidão para o desenvolvimento da validação.

Segundo a ANVISA (2006), o pessoal envolvido nas atividades de validação deve estar treinado para a participação no estudo, a fim de eliminarmos a variável mão de obra em caso de resultados insatisfatórios nas corridas realizadas. É necessário que se tenha certeza de que o pessoal envolvido está devidamente capacitado para participar do estudo.

3.1.2– Qualificação do Titulador automático Titrino e sistema de cromatografia Bioprocess

Atualmente as indústrias farmacêuticas precisam qualificar seus processos produtivos e isto pressupõe a qualificação de todos os equipamentos críticos envolvidos nestas operações. O titulador automático Titrino e o sistema de cromatografia Bioprocess foram avaliados quanto aos requisitos de instalação e operação conforme ANEXO C.

O anexo em questão demonstra a identificação interna de tais equipamentos a fim de garantir a rastreabilidade dos equipamentos utilizados nos processos, número do relatório de qualificação emitido e validade desta e ainda status da qualificação realizada. Tais verificações reduzem a oscilação destes equipamentos durante as três corridas de validação e garantem a utilização destes através dos resultados de qualificação de instalação e operação, conforme determinado pela ANVISA (2006). A qualificação deve estar finalizada antes da validação. Os principais equipamentos necessitam da QI (Qualificação de Instalação) e QO (Qualificação de Operação), uma vez que seu mau funcionamento pode afetar a qualidade do medicamento.

O relatório de qualificação do titulador automático Titrino e do sistema de cromatografia Bioprocess compreendeu as etapas de Qualificação de Instalação, e Qualificação de Operação. Tais etapas asseguraram a adequação dos equipamentos ao uso pretendido por apresentarem características de operacionalidade e desempenho capazes de garantir todos os requisitos exigidos para utilização em processo.

Os resultados da qualificação da instalação garantiram que os equipamentos foram instalados de acordo com o especificado no manual técnico, garantindo que

as instalações atenderam aos requisitos recomendados pela empresa. Na qualificação de operação foram obtidos resultados satisfatórios quando verificada as condições operacionais dos equipamentos. Foram verificados todos os controles operacionais, comandos de acionamento, funcionalidade de itens acoplados e por fim realizada a calibração dos equipamentos. Foi ainda verificado a exatidão dos resultados (reprodutibilidade e repetibilidade). Todos os resultados foram confrontados com as recomendações e especificações solicitadas pelo usuário.

Ao final da Qualificação com todos os resultados satisfatórios, tanto para o titulador automático Titrino quanto para o sistema de cromatografia Bioprocess, prosseguiu-se com o processo de produção dos lotes para validação.

Todos os relatórios de calibração dos outros equipamentos/instrumentos utilizados nos processos foram verificados e os resultados obtidos estavam em conformidade para utilização destes sem risco de resultados falso positivos. Todos os equipamentos/instrumentos utilizados foram listados a fim de garantir a rastreabilidade dos mesmos quanto a sua identificação interna, e controlada quanto à validade das calibrações. Esta verificação é mandatória para garantia de utilização dos equipamentos. A listagem de tais equipamentos/instrumentos encontra-se no ANEXO D.

3.2 – Monitoramento dos parâmetros críticos de processo

Os parâmetros críticos de processo foram monitorados durante a produção dos três lotes do concentrado vacinal de Hib.

Nas Tabelas 6 e 8 estão apresentados os resultados do monitoramento realizado para cada parâmetro de processo pré-definido, para a reação de ativação e para a reação de conjugação, respectivamente.

Tabela 6 – Resultado do monitoramento dos parâmetros críticos de processo para ativação

Parâmetro de processo	Critério de aceitação	Resultados		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3
Tempo máximo armazenamento PRP	5 anos	27 dias	36 dias	39 dias
Temperatura máxima de armazenamento do PRP(°C)	- 15	-28,3	-32,0	-30,4
Tempo mínimo para aclimação PRP (min)	30	30	30	30
Temperatura de aclimação PRP	Temperatura ambiente	conforme	conforme	conforme
Temperatura cooler (°C)	3,0 ±0,5	3,2	3,0	3,2
Temperatura camisa reator (°C)	5,8 - 6,0	6,0	6,0	6,0
Velocidade agitação da solução PRP (rpm)	500 ±10	510	500	510
Temperatura PRP dissolvido (°C)	5,8 a 6,0°C	6,0	6,0	6,0
Tempo agitação da solução PRP (h)	1,5 – 8,0	1,52	1,50	1,65
Tempo de agitação da solução de ADH (min)	30 ±15	15	15	15
Velocidade de agitação da solução de ADH (rpm)	150 ±50	200	200	200
pH final da solução de ADH	9,0 ±0,1	9,10	9,10	9,12
Temperatura da solução de ADH (°C)	4 - 10	6,0	6,7	4,0
Tempo de dissolução de CNBr (min)	15 a 30	15	15	15
Velocidade de agitação da solução de CNBr (rpm)	150 ±50	150	150	150
pH do PRP dissolvido no momento da adição do CNBr	10,85	10,85	10,85	10,85
pH do PRP dissolvido após adição do ADH	8,75	8,75	8,75	8,75
Velocidade de agitação do meio reacional (rpm)	250 ±10	240	250	260
Tempo de reação (min)	99	99	99	99
Tempo entre o início da reação e diafiltração do meio reacional (h)	3,25 ± 0,25	3,12	3,03	3,20
Temperatura de acondicionamento do PRP-ADH diafiltrado (°C)	2 – 8	Mín.:3,1 Máx.:3,5	Mín.:2,6 Máx.:7,0	Mín.:3,5 Máx.:5,8
Holding time do PRP-ADH diafiltrado (h)	Máx. 48	43,92	44,00	47,53

Na etapa de ativação pode-se observar através da tabela 6 que o PRP utilizado nos três lotes encontrava-se dentro do critério de aceitação preconizado para o tempo máximo de armazenamento, o qual é de 5 anos. Apesar da validade do PRP está determinada para utilização em até 5 anos, foi utilizado nos três lotes PRP armazenados com tempo próximos, para se evitar questionamentos futuros em relação à variabilidade de resultados, caso estes viessem a ocorrer. De qualquer forma, é importante salientar que a estabilidade de 5 anos do PRP já foi garantida através de estudo de estabilidade. Este produto foi testado ao longo dos 5 anos e manteve seus atributos de qualidade dentro dos limites preconizados. A temperatura máxima de armazenamento dos lotes de PRP utilizados foi registrada e obtiveram-se os resultados de acordo com o critério de aceitação preconizado de -15°C no máximo. Tal condição de armazenamento garante a utilização deste produto no processo já que a estabilidade do mesmo é garantida por 5 anos nesta condição de estocagem. O PRP utilizado nas 3 corridas foi retirado do freezer e se fez necessário sua aclimação para posterior dissolução. Conforme a tabela 6, para os três lotes foram necessários 30 minutos para aclimação do PRP à temperatura ambiente, resultado dentro dos critérios de aceitação preconizados nos lotes investigados. Nos lotes 1, 2 e 3 pode-se observar que a temperatura do cooler foi ajustada para o critério de aceitação de $3,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e obtiveram-se resultados dentro deste faixa preconizada. Tal ajuste garantiu a temperatura da camisa do reator, dentro do critério de aceitação de $5,8$ a $6,0^{\circ}\text{C}$, que em cascata mantém a temperatura do meio reacional durante todo o processo.

Durante a dissolução do PRP com solução de $\text{NaCl } 2 \text{ mol.L}^{-1}$, a velocidade de agitação e o tempo desta dissolução foram monitorados e os resultados obtidos nos lotes 1, 2 e 3 estiveram dentro do critério preconizado de $500 \pm 10 \text{ rpm}$ e $1,5$ a 8 h , respectivamente, o que garantiu uma solução homogênea para início da etapa de ativação. A temperatura do PRP dissolvido não variou com resultado de $6,0^{\circ}\text{C}$, nos três lotes, estando dentro do critério preconizado de $5,8$ a $6,0^{\circ}\text{C}$. A homogeneização da solução de ADH em solução de $\text{NaHCO}_3 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ também foi monitorada quanto aos parâmetros tempo de agitação, velocidade de agitação, pH final da solução e temperatura da solução, para os três lotes. Os resultados obtidos estiveram dentro do critério preconizado, 30 ± 15 minutos, $150 \pm 50 \text{ rpm}$, $9,0 \pm 0,1$ e 4 a 10°C , respectivamente. O monitoramento do pH final da solução de ADH é importante já que a adição da solução de ADH ao meio reacional acontece em pH

próximo a 10,85 com a finalidade de reduzi-lo para próximo de 8,75. Apesar de os resultados obtidos para a temperatura da solução estarem dentro do critério de aceitação, o resultado obtido no lote 3, divergiu dos resultados obtidos nos lotes 1 e 2, porém não interferiu no processo já que após adição da solução de ADH ao meio reacional a temperatura deste também foi monitorada imediatamente, com os seguintes resultados obtidos respectivamente, 6,5, 6,6 e 6,5⁰C para os três lotes. A dissolução do reagente CNBr em água para injetáveis também foi monitorada quanto ao tempo de dissolução e velocidade de agitação e foram obtidos resultados dentro dos critérios preconizados para os três lotes, 15 a 30 minutos e 150±50rpm, respectivamente. Os próximos dois parâmetros monitorados, pH do PRP dissolvido no momento da adição do CNBr e pH do PRP dissolvido após adição do ADH, são extremamente importantes para o desenvolvimento da reação, já que uma eficiente reação de ativação deve seguir o desenho demonstrado na figura 20. O pH do PRP dissolvido inicial variou de 6,02 a 6,44, nos lotes 1, 2 e 3, sendo estes ajustados gradualmente para ≈10,85 para adição do CNBr dissolvido e em seguida reduzido para ≈ 8,75 com a adição da solução de ADH. Desta forma, pode-se observar que o pH do PRP dissolvido no momento da adição do CNBr, nos três lotes, foi próximo de 10,85, sendo este o critério pré-determinado de aceitação. Já o pH do PRP dissolvido após adição do ADH dissolvido, nos três lotes, foi de aproximadamente 8,75, sendo este também o critério de aceitação pré-determinado. Os resultados obtidos para a variável pH durante a reação de ativação foram demonstrados na tabela 6 somente nos momentos de adição dos reagentes durante a reação, porém toda a reação foi monitorada e os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7– Controle de pH do meio reacional durante a reação de ativação

tempo/min	pH controle			Temperatura controle			pH referência			Temperatura referência		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
0	6,44	6,28	6,02	6,0	6,0	6,0	6,44	6,29	6,04	6,0	6,0	6,0
1	6,87	8,18	6,68	6,0	6,0	6,0	6,90	8,45	6,77	6,0	6,0	6,0
2	8,45	10,60	10,06	6,0	6,0	6,0	8,86	10,61	10,09	6,0	6,0	6,0
3	10,64	10,86	10,75	6,0	6,0	6,0	10,69	10,89	10,76	6,0	6,0	6,0
4	10,84	10,85	10,91	7,4	7,2	7,5	10,83	10,88	10,93	7,4	7,2	7,5
5	10,85	10,85	10,82	7,4	7,2	7,5	10,83	10,87	10,82	7,4	7,2	7,5
6	10,86	10,86	10,82	7,4	7,2	7,4	10,84	10,89	10,83	7,4	7,2	7,4
7	10,83	10,77	10,89	7,3	7,2	7,4	10,81	10,79	10,90	7,3	7,2	7,4
8	10,86	10,91	10,77	7,3	7,2	7,4	10,85	10,92	10,78	7,3	7,2	7,4
9	10,79	10,91	10,90	7,3	7,1	7,3	10,77	10,93	10,91	7,3	7,1	7,3
10	8,76	8,90	9,00	6,5	6,6	6,5	8,77	8,92	9,02	6,5	6,6	6,5
11	8,91	8,62	8,70	6,7	6,7	6,7	8,88	8,63	8,71	6,7	6,7	6,7
12	8,68	8,89	8,64	6,9	7,0	6,8	8,70	8,91	8,64	6,9	7,0	6,8
..												
15	8,80	8,80	8,68	7,0	7,2	7,1	8,78	8,81	8,70	7,0	7,2	7,1
..												
99	8,76	8,76	8,76	5,9	6,3	6,3	8,75	8,76	8,76	5,9	6,3	6,3

Na Tabela 7 pode-se notar que o pH da reação de ativação foi controlado minuto a minuto durante os primeiros 12 minutos de processo, depois o controle foi realizado com 15 minutos e finalizando aos 99 minutos de reação. Foi utilizado um sensor de pH de referência a fim de comparar os valores com o sensor de pH de controle garantindo a eficácia do monitoramento do processo. O pH inicial do meio reacional (PRP dissolvido) apresentou valores que variaram de 6,02 a 6,44 (controle) e 6,04 a 6,44 (referência), sendo este corrigido gradualmente com NaOH 0,25 mol.L⁻¹ a fim de atingir o valor de 10,85 no início da adição do primeiro reagente. Aos 3 minutos de reação, o pH de controle apresentou valores que variaram de 10,64 a 10,86 e o de referência 10,69 a 10,89, desta forma após 3 minutos de reação foi adicionado ao meio reacional a solução de CNBr. Após essa adição, o pH foi mantido em torno de 10,85 até 9 minutos de reação, variando de 10,77 a 10,91 no sensor de pH de controle e de 10,77 a 10,93 no sensor do pH de referência. Após 9 minutos de reação, foi realizada a adição do reagente ADH onde

era esperado decréscimo brusco de pH para em torno de 8,75, permanecendo neste valor até o término da reação. Com esta adição, houve o decréscimo de pH conforme esperado que permaneceu em torno da faixa de processo esperada, variando de 8,64 a 9,00 no sensor de controle e de 8,63 a 9,02 no sensor de referência. A temperatura do meio reacional foi controlada durante os 99 minutos de reação, onde a sonda de controle apresentou valores que variaram de 5,9 a 7,5. O controle de temperatura do meio reacional foi necessário somente para ajudar a manter o pH dentro dos parâmetros de processo. É possível verificar através da tabela 8 que aos 11 minutos de reação quando o sistema está buscando a estabilização em pH em torno de 8,75, no lote 2, pode ser visualizada uma diferença de pH em relação aos outros lotes com um decaimento diferenciado de pH quando este passa de 8,90 para 8,62 e depois retornando para o valor de processo em torno de 8,75, com valor encontrado de 8,89 e daí em diante seguindo sua estabilização durante o tempo restante de reação. Tal diferença não é significativa nesta etapa da reação, já que o importante é manter o pH acima de 10 quando adicionado o reagente CNBr evitando hidrólise do polissacarídeo e formação de reações indesejáveis e reduzindo para pH 8,75 após adição da ADH. O tempo de reação foi respeitado durante as três corridas com finalização do processo em 99 minutos de reação. Foi importante monitorar o tempo de reação e o pH do meio reacional garantindo o objetivo da etapa de ativação do polissacarídeo, que seria, preparar o complexo PRP-ADH para a fase de acoplamento com a proteína. Durante a reação, a velocidade de agitação do meio reacional variou de 240 a 260rpm, nos três lotes, seguindo o critério preconizado de 250 ± 10 rpm, garantindo a homogeneização do meio reacional. Após a reação total, foi monitorado o parâmetro tempo entre o início da reação e diafiltração do meio reacional, onde se pode observar através da tabela 6 que para os lotes 1, 2 e 3, foram obtidos resultados dentro do tempo pré-determinado pelo critério de aceitação de, no máximo, 3h e 15 min ± 15 minutos. Iniciar a diafiltração acima deste critério de aceitação poderia inviabilizar as corridas de validação, já que estaríamos mantendo o meio reacional em tempo superior ao preconizado com os subprodutos formados durante a reação de ativação. Durante as 3 diafiltrações também foram monitorados alguns parâmetros de processo conforme ANEXO E. Todos os resultados reproduzidos estavam de acordo com os critérios de aceitação nos três lotes. Finalizando, a temperatura de acondicionamento do PRP-ADH diafiltrado foi verificada onde se pode observar

através da Tabela 6 que os resultados variaram de 2,6 a 3,5°C no termômetro de mínima e de 3,5 a 7,0 °C no termômetro de máximo, para os três lotes. Todos os resultados obtidos estiveram dentro do limite de aceitação de 2 – 8°C, garantindo o armazenamento adequado. O PRP-ADH diafiltrado possui pré-determinado o tempo máximo de espera em câmara fria 2 – 8°C para a utilização na etapa de conjugação de 48h, sendo este parâmetro monitorado nos lotes 1, 2 e 3, estando os resultados dentro do preconizado como se pode observar, na Tabela 6. O lote 3 foi propositalmente utilizado mais próximo do tempo máximo de *holding time* a fim de avaliar qualquer possível alteração na caracterização do conjugado ou nos resultados de produto, porém não pôde ser feita qualquer comparação a partir deste desafio. Os resultados, mostrados a posterior, fornecem indícios de que é possível alterar a programação de produção, em caso de necessidade, e garantir que o PRP derivatizado seja mantido durante todo o tempo pré-estabelecido.

Na Tabela 8, pode-se observar que, na etapa de conjugação, para os lotes 1, 2 e 3 a velocidade de agitação da diluição do PRP-ADH em NaCl 0,2 mol.L-1 estava de acordo com o critério de aceitação estabelecido. Antes do início da reação de conjugação, a proteína e o reagente EDAC foram aclimatados para utilização no processo, sendo obtidos resultados de acordo com os critérios de aceitação preconizados. A aclimação dos reagentes é importante já que os mesmos estavam acondicionados em refrigerador e freezer, respectivamente. Estes são retirados, no dia do processo, previamente para então serem aclimatados e estarem aptos para a dissolução na temperatura da sala. Antes da transferência da proteína para o meio reacional, foi feito o monitoramento da velocidade de agitação e do tempo mínimo de agitação para garantir sua homogeneização. Para os três lotes, os resultados obtidos estiveram dentro dos critérios preconizados. Durante a reação de conjugação alguns parâmetros foram monitorados conforme indicados na Tabela 8 (tempo de adição da proteína, tempo de permanência do sistema em equilíbrio com controle de pH e tempo de reação total). Todos apresentaram resultados dentro dos critérios de aceitação pré-definidos, porém, dentre todos os parâmetros monitorados, o controle de pH do meio reacional durante a etapa de conjugação merece destaque no trabalho em questão. Na Tabela 9 pode-se verificar que a reação de conjugação foi monitorada ao longo do tempo com intervalos de 240 s (4 minutos) durante toda a reação.

Tabela 8 – Resultado do monitoramento dos parâmetros críticos de processo para conjugação

Parâmetro de processo	Critério de aceitação	Resultados		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3
Velocidade de agitação do PRP-ADH diluído (rpm)	250 ±50	250	260	270
Tempo mínimo para aclimatação da proteína (h)	1 - 2	1,03	1,00	1,00
Tempo mínimo para aclimatação do EDAC (h)	1	1	1,62	1,17
Temperatura do cooler (°C)	18-22	18,0 – 18,6	18,6-19,0	18,2-18,7
Velocidade de agitação da proteína antes da transferência para o sistema de adição (rpm)	200 ±10	207	200	200
Tempo mínimo de agitação da proteína antes da transferência para o sistema de adição (min)	2	2	2	2
Tempo de adição da proteína (min)	60 - 70	60	67	60
pH do meio reacional	5,0 ± 0,2	5,02 – 5,04	5,00 – 5,07	4,96 – 5,06
Tempo de permanência do sistema em equilíbrio com controle de pH (min)	Mín. 60	67	61	67
Tempo de reação (min)	120 - 130	128	128	128
Velocidade de agitação do PRP-ADH-TT bruto durante o acondicionamento em câmara fria (rpm)	70 ±10	70	70	70
Tempo de reação do PRP-ADH-TT bruto em CF (h)	48 - 72	68,7	67,6	62,8
Temperatura de acondicionamento do PRP-ADH-TT bruto (°C)	2 – 8	3,2 - 9,6	2,8 - 9,1	2,9 - 9,3

Tabela 9 – Controle de pH do meio reacional durante a reação de conjugação

Tempo/s	Lote 1	Lote 2	Lote 3
0	5,81	5,98	5,73
240	5,27	5,24	5,07
480	5,03	5,03	5,01
720	5,03	5,03	5,00
960	5,04	5,03	5,01
1200	5,03	5,04	5,01
1440	5,03	5,04	5,01
1680	5,04	5,04	5,01
1920	5,03	5,03	5,01
2160	5,04	5,04	5,01
2400	5,04	5,04	5,00
2640	5,04	5,04	5,01
2880	5,04	5,04	5,01
3120	5,04	5,03	5,01
3360	5,04	5,03	5,01
3600	5,04	5,04	5,01
3840	5,03	5,04	5,01
4080	5,03	5,03	5,01
4320	5,03	5,05	5,01
4560	5,03	5,06	5,00
4800	5,03	5,02	5,00
5040	5,03	5,01	5,00
5280	5,02	5,00	5,00
5520	5,03	4,99	5,00
5760	5,02	4,97	5,00
6000	5,02	4,97	5,00
6240	5,02	4,96	5,00
6480	5,02	4,96	5,00
6720	5,02	4,96	5,00
6960	5,02	4,96	5,00
7200	5,02	4,96	5,00
7440	5,02	4,96	5,00
7680	5,02	4,96	5,00

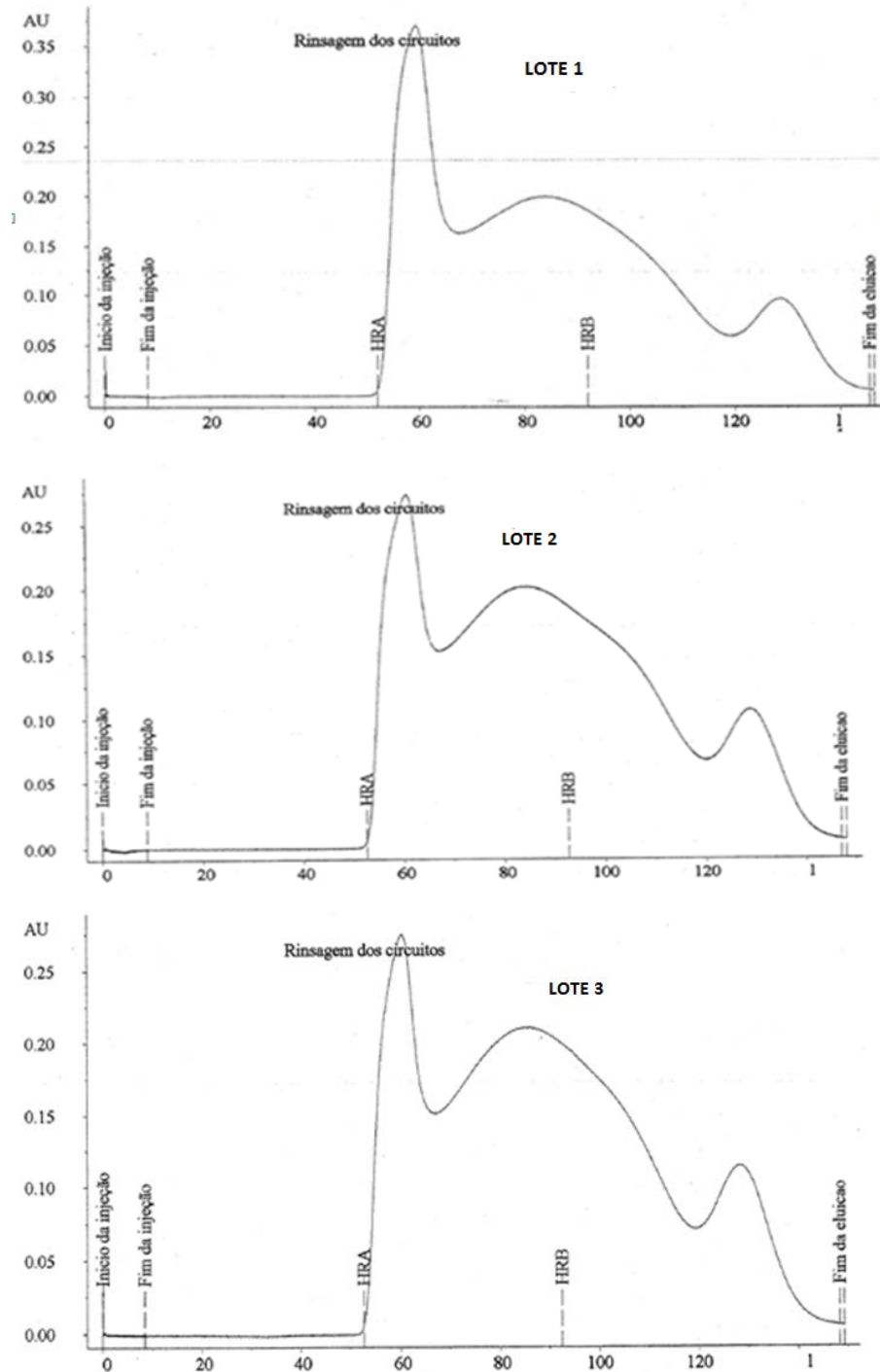
No início o valor de pH do meio reacional PRP-ADH ativado dissolvido em solução de NaCl 0,2 mol.L⁻¹ variou de 5,73 a 5,98 nos três lotes produzidos. Decorrido um tempo de 480 s, foi possível verificar que houve um decréscimo do pH para em torno de 5,0. Este valor foi alcançado através da titulação com solução de HCl 2,5 mol.L⁻¹

estéril. Com 480 s, o valor de pH obtido nas três corridas variou de 5,01 a 5,03, sendo possível a adição do espaçador molecular EDAC. Em seguida, foi possível adicionar a proteína ao meio reacional já que o sistema se manteve com pH estável em torno de 5,0, mantendo-se constante durante todo o tempo de reação desde 480s até o término do processo com 7680 s. Durante todo o tempo de reação, o sistema se manteve em equilíbrio com pH dentro da faixa de aceitação de 4,8 – 5,2, garantindo um eficiente acoplamento entre o PRP derivatizado e a PMT, sendo este o meio propício para tal processo. Realizando uma análise mais detalhada dos resultados da Tabela 9 é possível visualizar que o pH inicial do polissacarídeo ativado PRP-ADH dissolvido em solução de NaCl 0,2 mol.L⁻¹ iniciou próximo de 6,0 mais com a adição do titulante HCl 2,5 mol.L⁻¹ houve um decréscimo para a faixa de trabalho entre 4,8 e 5,2, permanecendo assim até o final da conjugação. Após a estabilização, o pH permaneceu estável ao longo de toda a reação, com exceção do lote 3 que após 4560s apresentou um decréscimo leve no pH que alcançou o valor mínimo de 4,96, ainda dentro da faixa de trabalho, bem longe do limite mínimo de aceitação de 4,8. O decréscimo do pH no lote 3 não comprometeu a eficácia da reação de conjugação, pois foi mantida a faixa de processo estabelecida. Isso foi garantido pelo equipamento de monitoramento adotado e titulante utilizado, conforme resultados acima demonstrados na Tabela 10. Na reação de conjugação, ocorre uma ligação entre a hidrazida livre do composto PRP-ADH ao grupo carboxila ativado da proteína. Esta ligação pode ocorrer entre os pHs 4,5 e 7,5 (HERMANSON, 1996). O controle de pH é necessário porque pode influenciar diretamente no rendimento do conjugado obtido. Existem trabalhos que relatam o meio alcalino como sendo favorável para obtenção de um melhor rendimento da reação. No trabalho de Lorthiois (2007), existe um estudo comparativo que demonstra a influencia do pH no rendimento da reação, sendo relatado que em pH = 8, o rendimento médio da conjugação foi melhor que em pH = 5. No trabalho de Kossaczka e colaboradores (1997), o rendimento da conjugação entre polissacarídeo capsular de *Salmonella typhi* e proteína derivatizada com ADH foi influenciado pelo pH da reação, sendo este mantido entre 5,5 e 6,0, pois levou ao melhor rendimento de conjugação em relação ao pH mais ácido. Desta forma, a faixa estabelecida se mostra de acordo com dados da literatura e os resultados obtidos garantem o processo. Após os 128 minutos de reação, o conjugado PRP-ADH-TT bruto obtido permaneceu por quase 3 dias em câmara fria sob agitação

lenta para completa reação, porém o limite pré-determinado foi de 2 - 3 dias. Segundo Schneerson e colaboradores (1980), 24 horas seria o tempo ideal de conjugação entre PRP com TT para obtenção do melhor rendimento, pois o PRP foi ativado com CNBr e a proteína foi derivatizada com ADH. No trabalho de Lorthiois (2007), o tempo de reação para formação do conjugado foi estudado e, demonstrou que entre outros fatores, depende da massa molecular do polissacarídeo e da proteína, levando-se em conta que o PRP-ADH possui cerca de 14kDa e TT 150kDa, massa molecular considerável. Deve-se ainda ser levado em consideração que o PRP-ADH somente possui quatro sítios locais para se ligar ao TT e os resultados demonstraram, que após 2 dias de reação, não há aumento no rendimento da conjugação e a relação em massa PRP-ADH/TT manteve-se constante. Assim, o tempo fixado, neste experimento, foi de 2 a 3 dias de reação em câmara fria, que garante ao processo um rendimento de conjugação interessante para atendimento à rotina de produção. Os tempos de reação, em câmara fria, estão descritos na tabela 8: 68,7 h para o lote 1, 67,6 h para o lote 2 e 62,8 h para o lote 3. A temperatura da câmara fria onde foi realizado o acondicionamento do PRP-ADH-TT bruto ficou acima do especificado (2 - 8°C) nas três corridas, 9,6, 9,1 e 9,3°C, respectivamente. Tais resultados poderiam possibilitar a formação de reações indesejadas, comprometendo a qualidade do produto e o rendimento do processo, porém foi verificado no relatório de qualificação desta câmara fria que o sensor que registra a condição do produto dentro da mesma permaneceu dentro dos limites especificados (2 - 8 °C) durante todo o estudo de qualificação, mesmo com a temperatura dentro da câmara, em alguns momentos, ultrapassando o limite máximo de 8°C . Desta forma, pode-se garantir que a condição de armazenamento do PRP-ADH-TT bruto manteve-se dentro das especificações durante os experimentos. Após finalizar a reação de conjugação em câmara fria, o conjugado obtido PRP-ADH-TT bruto nas três corridas foi purificado por cromatografia de exclusão molecular. A purificação ocorreu com detecção por UV, no comprimento de onda 280nm, para que seja coletada a fração FEI (fração de interesse – PRP-TT purificado), que elui até 0,40 kDa. FCC é a fração eluída após 0,40 kDa. Esta fração é associada ao meio não conjugado e é indicada pela medida da absorvância, em 280 nm, inferior a 0,005 mAU. Existe uma vasta literatura a respeito da purificação de conjugados, porém é muito indicada a cromatografia por exclusão molecular. Esta etapa compreendeu três operações sucessivas: teste de desempenho, regeneração da

coluna e purificação do PRP-ADH-TT bruto. Todas ocorrem em câmara fria (2-8°C). Inicialmente, realizou-se o teste de desempenho da coluna no sistema de cromatografia (*Bioprocess*) para certificar-se de que a mesma estava em condições de operação. Em seguida, fez-se a regeneração, na qual a coluna foi sanitizada e acondicionada para a purificação. As frações purificadas FEI e FCC foram coletadas em tanques apropriados que foram posicionados conforme instruções do software do sistema de cromatografia e colocados em câmara fria. Foram transferidos 22,5L de solução de NaCl 0,2mol.L⁻¹ estéril para o tanque de coleta de FEI e iniciou-se a agitação para 100 ± 5rpm. Foi verificado o pH da solução de NaCl 0,2 mol.L⁻¹ transferido, devendo estar em 6,1 ± 0,3. O sistema foi rinsado com solução de NaCl 0,2mol.L⁻¹ e transferido a haste do sistema de injeção para o frasco contendo o conjugado PRP-ADH-TT bruto. A cromatografia foi iniciada de acordo com a solicitação do método. Para evitar a entrada de bolha de ar no sistema, quando quase todo o conjugado havia sido aspirado, foi vertido cuidadosamente 250mL de solução de NaCl 0,2 mol.L⁻¹ para o frasco com PRP-ADH-TT bruto. Ao término da coleta da fração FEI, o tanque de FEI foi desconectado do *Bioprocess*, pesado e encaminhado para aquecimento e pré-filtração em membrana 0,45µm. Seguidamente a filtração esterilizante foi realizada com membrana 0,22µm, obtendo-se o concentrado vacinal de Hib, produto de interesse. As etapas de purificação e finalização do conjugado também tiveram alguns parâmetros de processo monitorados. Os resultados encontram-se no ANEXO F. Todos os resultados obtidos estiveram dentro dos critérios preconizados. Na Figura 24 são apresentados os perfis cromatográficos do conjugado PRP-TT purificado das três corridas executadas.

Figura 24 – Cromatogramas de purificação dos lotes 1, 2 e 3 de PRP-TT purificado das três corridas de validação.



Nos perfis cromatográficos obtidos nas três corridas, lotes 1, 2 e 3, Figura 24, é possível observar que estes são compostos por um pico principal na fração eluída de interesse FEI, com tempo de retenção próximo a 51 min, seguido de um “ombro” deste pico que corresponde à proteína livre no conjugado (tempo de retenção do TT

livre próximo a 70 min.). No final da corrida, pode ser verificado a eluição de outro pico considerável no tempo de retenção de 110,6 min, equivalente ao tempo de retenção do PRP-ADH livre. A detecção de PRP no comprimento de onda de 280nm somente foi possível neste procedimento devido à presença do ADH ligado a molécula. Desta forma, é possível verificar com clareza a separação do conjugado de interesse fração FEI da fração FCC, a qual possui PRP-ADH livre. Segundo a literatura, tal separação é imprescindível para prosseguimento do processo já que para utilização deste conjugado como antígeno vacinal, segundo Kniskern e Marburg (1994), o PRP-ADH não conjugado pode induzir tolerância.

O concentrado vacinal de Hib obtido, ao final de todo o processo, indicou o seguinte rendimento para os três lotes produzidos: PS-TT01 84,85% (449.726 doses), PS-TT02 92,30% (489.180 doses) e PS=TT03 87,44% (463.450 doses), respectivamente. Tais rendimentos estão totalmente dentro dos valores esperados para o processo quando a intenção é de se produzir em torno de 450.000 doses por batelada.

3.3 – Monitoramento dos atributos de qualidade para o produto

Os resultados obtidos nesta etapa da proposta de trabalho são os mais importantes de todo o experimento realizado, isto porque o objetivo final de uma proposta de validação é sempre garantir que o seu processo proposto gera um produto dentro das especificações de qualidade pré-definidas. É nesta fase do trabalho que se pode verificar que os pontos de processo monitorados garantiram uma batelada de produção como parâmetros do produto previamente definidos.

Após realização das etapas ativação e conjugação, nas três corridas de processo utilizadas para validação, uma amostragem foi feita com tamanho 50% a mais que a amostragem de rotina, em momentos pré-determinados, como críticos ao processo, para análise do produto obtido naquela determinada fase. O volume amostrado e quantitativo de amostras já foi descrito no item 2.2.6.

Para que o processo proposto à validação possa resultar em produto que corresponda a sua utilização, este deve atender as especificações de qualidade. Desta forma, cada metodologia analítica utilizada nas avaliações do concentrado vacinal de Hib, discriminadas na tabela 5, foram anteriormente validadas pelo detentor da transferência de tecnologia e em fase final de validação por Bio-

manguinhos a fim de assegurar tanto a implantação da metodologia como a confiabilidade dos resultados analíticos.

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados obtidos para os parâmetros de produto nas três corridas de validação, para etapa ativação e conjugação, respectivamente.

Tabela 10 – Resultados obtidos para os atributos de qualidade para o produto

Parâmetro Testado	Critério de Aceitação	Resultados					
		Lote 1		Lote 2		Lote 3	
Etapa Ativação – PRP-ADH							
Determinação da concentração de polissacarídeo - método colorimétrico Orcinol (µg/mL)	>2500	3430	3391	3709	3645	3421	3364
Concentração de ADH – método colorimétrico TNBS (µg/mL)	A quantificar	48,19	49,08	51,24	50,25	47,30	46,01
Determinação da distribuição de massa molar (%kDa<0,3)	>25%	60,42	62,39	61,09	61,12	79,00	80,15
Taxa ativação (%)	1,0 – 2,5	1,40	1,45	1,38	1,38	1,38	1,37
Controle da eliminação no concentrado do polissacarídeo ativado após a 1ª diafiltração (%ADH livre)	A quantificar	40,38	38,36	37,09	38,62	37,68	38,81
Controle da eliminação no concentrado do polissacarídeo ativado após a 2ª diafiltração (%ADH livre)	A quantificar	3,54	3,14	2,2	2,34	3,61	3,42
Controle da eliminação no concentrado do polissacarídeo ativado após a 3ª diafiltração (%ADH livre)	<10%	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Etapa Conjugação – PRP-ADH-TT Bruto							
Determinação da concentração de polissacarídeo - método colorimétrico Orcinol(µg/mL)	A quantificar	1635	1719	1494	1574	1756	1716
Determinação da concentração de proteínas – Método Lowry(µg/mL)	A quantificar	4918	4997	4857	4811	5287	5190
Etapa Conjugação – PRP-ADH-TT Purificado							
Determinação da concentração de polissacarídeo pelo método colorimétrico - Orcinol(µg/mL)	A quantificar	126	130	130	126	122	124
Determinação da concentração de proteínas – Método Lowry(µg/mL)	A quantificar	299	302	283	279	274	287

Continuação da Tabela 10 – Resultados obtidos para os parâmetros críticos de produto

Parâmetro Testado	Critério de Aceitação	Resultados					
		Lote 1		Lote 2		Lote 3	
Etapa Conjugação – Concentrado Vacinal de Hib – PS-TT							
Determinação da concentração de polissacarídeo($\mu\text{g/mL}$)	500-1000	739	747	789	785	745	745
Determinação de polissacarídeo livre	No máximo 20%	1,34	0,83	3,7	3,70	3,13	3,86
Determinação de pH	5,0 a 7,0	6,2	6,2	6,5	6,5	6,8	6,8
Determinação da concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	A quantificar	1222	1238	1603	1585	1492	1504
Distribuição de massa molar (%kDa)	$\geq 80\%$ com $kDa \leq 0,2$	94,47	95,62	91,60	91,20	93,10	93,30
Determinação de proteína livre (%)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Concentração de EDAC ($\mu\text{g/mL}$)	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5
Concentração de Cianeto (ng/mL)	Máximo 10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Taxa de conjugação (razão ps/pt)	0,3 a 0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5

ND – Não detectado

Na etapa ativação da Tabela 10, os testes realizados foram para controle do processo a fim de mapear os parâmetros necessários e acompanhar a efetividade da etapa realizada frente aos resultados encontrados. Avaliando os resultados obtidos, é possível verificar que todas as amostras enviadas para teste apresentaram resultados dentro dos critérios de aceitação. Para o parâmetro concentração de ADH não há critério de aceitação pré-estabelecido, já que de acordo com o parceiro detentor da transferência de tecnologia tal parâmetro é informativo, porém é essencial a análise deste para posterior cálculo da taxa de ativação. A concentração de polissacarídeo foi determinada através do método colorimétrico Orcinol conforme descrito no item 2.3.1 e os resultados obtidos para este parâmetro variaram de $3364\mu\text{g mL}^{-1}$ a $3709\mu\text{g mL}^{-1}$, estando em conformidade com o critério de aceitação, $>2500\mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração de ADH foi determinada pelo método TNBS-Pierce, conforme descrito no item 2.3.2, e variou de $46,0\mu\text{g mL}^{-1}$ a $51,2\mu\text{g mL}^{-1}$. Tais determinações foram necessárias para cálculo da taxa de ativação. O principal parâmetro testado nesta etapa foi a taxa de ativação, sendo esta calculada através da relação concentração de ADH/concentração de polissacarídeo. Os resultados apresentados na Tabela 10 mostram que o parâmetro

taxa de ativação variou de 1,37% a 1,45%, valores dentro do critério de aceitação. A taxa de ativação é um parâmetro de produto impeditivo, estando esta fora do critério de aceitação é necessário interromper o processo, já que não será garantida a reação de ativação com formação de PRP-ADH num grau de substituição de 4 moléculas de ADH para cada 100 subunidades de PRP, necessário na etapa de conjugação, onde ocorrerá o acoplamento com a proteína. Resultados de taxa de ativação, fora do critério determinado, podem ser indicativos de que houve polimerização na molécula. O ADH é uma molécula simétrica que apresenta dois grupos hidrazidas passíveis de se ligarem ao aldeído do PRP. Devido a este fato podem ocorrer múltiplas combinações entre o PRP e o ADH, levando à formação de polímeros. A análise para avaliar a distribuição de massa molar foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular, item 2.3.5. Esta distribuição é um parâmetro para a caracterização do polissacarídeo ativado. Este método cromatográfico separa por tamanho molecular e com isso é possível avaliar se o polissacarídeo após ativação possui tamanho molecular característico, conforme especificado. Através da tabela 10, é possível observar que nas três corridas de validação o %área com $kDa < 0,3$ maior que 25%, variou de 60,42% a 80,15%, estando dentro do critério preconizado. Também foi possível avaliar, nesta dosagem, se houve formação de outros subprodutos de reação com massas molares menores, porém nada foi observado. A determinação do percentual de ADH livre presente no polissacarídeo ativado PRP-ADH foi um parâmetro de extrema importância para o controle do meio reacional. Os resultados obtidos nesta análise, conforme Tabela 10, variaram de 40,38% ao limite de não detecção, demonstrando a eficiência das três diafiltrações realizadas após derivatização do PRP. Nas primeiras duas diafiltrações, a determinação funciona como informativo, sem critério de aceitação pré-determinado, mas de controle necessário, após a terceira diafiltração o percentual de eliminação de ADH deve ser menor que 10%. O objetivo das diafiltrações foi exatamente de eliminar todos os subprodutos formados ou reagentes em excesso que não reagiram. Através da Figura 25, é possível observar que o percentual de ADH livre no meio reacional decresce na medida em que ocorrem as diafiltrações, inclusive atingindo nível de não detecção após terceira diafiltração, garantindo totalmente o PRP-ADH para utilização na próxima etapa do processo (conjugação).

Figura 25 – Resultados obtidos nas 3 diafiltrações. (a) grupo de resultados em duplicata das três corridas somente da 1ª diafiltração. (b) grupo de resultados em duplicata das três corridas somente da 2ª diafiltração. (c) grupo de resultados em duplicata das três corridas somente da 3ª diafiltração

Avaliando os resultados de conjugação, é possível verificar através da tabela 10 que todos os testes realizados antes da purificação cromatográfica (PRP-ADH-TT bruto) e após a purificação cromatográfica (PRP-ADH-TT purificado) foram para controle do processo, objetivando acompanhar a eficiência da reação de conjugação, através da relação PS/PT. Para os dois parâmetros avaliados, nesta etapa, a concentração de polissacarídeo e a concentração de proteínas, não há critério de aceitação pré-estabelecido, já que de acordo com o parceiro detentor da transferência de tecnologia tal parâmetro é informativo, porém necessário para acompanhamento da eficiência da conjugação. A concentração de polissacarídeo foi determinada através do método colorimétrico Orcinol, conforme descrito no item 2.3.1, e os resultados obtidos para este parâmetro variaram de $1494\mu\text{g mL}^{-1}$ a $1756\mu\text{g mL}^{-1}$, para o PRP-ADH-TT bruto e de $122\mu\text{g mL}^{-1}$ a $130\mu\text{g mL}^{-1}$, para o PRP-ADH-TT purificado. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Folin-Lowry, conforme descrito no item 2.3.3, e variou de $4811\mu\text{g mL}^{-1}$ a $5287\mu\text{g mL}^{-1}$, para o PRP-ADH-TT bruto e de $274\mu\text{g mL}^{-1}$ a $302\mu\text{g mL}^{-1}$, para o PRP-ADH-TT purificado. Tais determinações foram necessárias para cálculo da razão entre as concentrações de polissacarídeo e proteína (PS/PT).

Desta forma, foi possível determinar a razão entre as concentrações de polissacarídeo e proteína (PS/PT) na molécula. Os requisitos para a produção da vacina conjugada contra Hib (WHO, 1998) sugerem a determinação deste parâmetro, que fornece uma medida indireta da extensão da reação de conjugação (JÓDAR, GRIFFITHS & FEAVERS, 2004). Na Tabela 11, estão apresentados os valores obtidos para a concentração de proteína, polissacarídeo e a razão entre eles.

Tabela 11 – Resultado da razão PS/PT na molécula

Parâmetro Testado	Critério de Aceitação	Real					
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6
Etapa Conjugação – PRP-ADH-TT Bruto							
Determinação da concentração de polissacarídeo - método colorimétrico Orcinol(µg/mL)	A quantificar	1635	1719	1494	1574	1756	1716
Determinação da concentração de proteínas – Método Lowry(µg/mL)	A quantificar	4918	4997	4857	4811	5287	5190
Razão PS/PT	0,3 a 0,6	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Etapa Conjugação – PRP-ADH-TT Purificado							
Determinação da concentração de polissacarídeo pelo método colorimétrico - Orcinol(µg/mL)	A quantificar	126	130	130	126	122	124
Determinação da concentração de proteínas – Método Lowry(µg/mL)	A quantificar	299	302	283	279	274	287
Razão PS/PT	0,3 a 0,6	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4

Pode ser visualizado na Tabela 11 que a razão PS/PT para todos os lotes analisados nas três corridas de validação tanto no PRP-ADH-TT bruto quanto no PRP-ADH-TT purificado apresentou resultados dentro do critério de aceitação proposto para o concentrado vacinal de Hib, entre 0,3 e 0,6. Conforme descrito no capítulo 1, item 1.6, os parâmetros devem ser controlados para garantir a reprodutibilidade do processo a fim de obter conjugados com características físico-químicas bem definidas. Dentre estes fatores a relação polissacarídeo/proteína é relacionada como um dos fatores que poderiam influenciar na imunogenicidade de uma vacina conjugada. Desta forma, os resultados dentro da especificação para o concentrado vacinal nesta etapa do processo garantem a eficiência da conjugação.

A caracterização do conjugado concentrado vacinal de Hib (PS-TT) obtido nas três corridas de validação foi evidenciada através de análise do produto final realizada pelo controle de qualidade interno, usando as metodologias analíticas validadas pelo produtor detentor da transferência de tecnologia. A grande maioria destas metodologias já foi validada também internamente, conforme ANEXO G. Os resultados estiveram dentro dos critérios de aceitação preconizados, conforme resultados disponíveis na Tabela 10. O parâmetro concentração de polissacarídeo

foi determinado através do método colorimétrico Orcinol, item 2.3.1 descrito anteriormente. Este parâmetro é necessário para cálculo da taxa de conjugação, razão PS/PT. Para este parâmetro, foram obtidos resultados que variaram de $739\mu\text{gmL}^{-1}$ a $789\mu\text{gmL}^{-1}$, estando em conformidade com o requerimento que possui faixa de variação de 500 a $1000\mu\text{gmL}^{-1}$. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Folin-Lowry, conforme descrito no item 2.3.3, e variou de $1222\mu\text{gmL}^{-1}$ a $1603\mu\text{gmL}^{-1}$, e para esta metodologia não existe critério de aceitação preconizado. A taxa de conjugação foi determinada através da relação PS/PT, sendo esta determinação de suma importância para a caracterização do conjugado obtido. Nesta determinação foram obtidos resultados que variaram de 0,5 a 0,6. A estabilidade dos resultados obtidos para taxa de conjugação garante a eficácia da utilização deste conjugado para a produção da vacina. Uma baixa relação polissacarídeo/proteína implica em uma imunização com quantidades mais do que necessária de proteína, podendo ocasionar uma hiperestimulação do sistema imune (ADA e ISAACS, 2003). Um alto valor da razão polissacarídeo/proteína pode indicar que uma grande quantidade de sacarídeos esteja ligada às proteínas, escondendo epítopos essenciais do carreador do sistema imune e, dificultando, assim, o reconhecimento do conjugado como um antígeno TD (PEETERS et al., 1996). A proteína livre no concentrado vacinal de Hib foi determinada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, conforme item 2.3.7. Para todos os lotes analisados nas três corridas de validação o resultado obtido foi $<1,0\%$, estando em conformidade com o requerimento que propõe resultado aceitável para valores menores que $1,0\%$. Os cromatogramas mostram (Figura 27) que junto à fração FEI (PRP-ADH-TT purificado), elui também um “ombro” que segundo literatura corresponde à proteína livre. Tais resultados obtidos garantem a eficiência da filtração $0,45\mu\text{m}$ seguida da filtração esterilizante $0,22\mu\text{m}$ no conjugado PRP-ADH-TT purificado. Estas contribuíram para a retenção da proteína livre no conjugado obtido. A concentração de EDAC no concentrado vacinal de Hib foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, conforme item 2.3.9. Para todos os lotes analisados nas três corridas de validação o resultado obtido foi inferior a $1,5\mu\text{gmL}^{-1}$, estando em conformidade com o requerimento que propõe resultado aceitável para valores menores que $1,5\mu\text{gmL}^{-1}$. Tal metodologia é aplicada a fim de verificar os níveis residuais de EDAC no produto final obtido, que devem ser reduzidos após a filtração $0,45\mu\text{m}$, seguida da filtração esterilizante $0,22\mu\text{m}$ no

conjugado PRP-ADH-TT purificado. O EDAC foi utilizado na etapa de conjugação com o único objetivo de ativar o grupo carboxila da proteína. A carbodiimida liga-se a $-COOH$ para formar um intermediário *o*-acilisouréia muito reativo que se liga ao PRP-ADH, formando o conjugado. A concentração de EDAC utilizada na reação se mostrou adequada já que não foram encontrados níveis residuais altos após as filtrações. A concentração de cianeto no concentrado vacinal de Hib foi quantificada por cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica pulsada, conforme item 2.3.10. Para todos os lotes analisados nas três corridas de validação, o resultado obtido foi $<10\text{ngmL}^{-1}$, estando em conformidade com o requerimento que propõe resultado aceitável para valores menores que 10ngmL^{-1} . Tal metodologia é aplicada a fim de verificar os níveis residuais de cianeto no produto final obtido, que devem ser reduzidos após as três diafiltrações realizadas no complexo PRP-ADH. O CNBr foi utilizado na etapa de ativação com o único objetivo de ativar as hidroxilas do polissacarídeo para seguidamente ser derivatizada com ADH. Os resultados obtidos demonstram a eficiência das três diafiltrações. Conforme mostrado na tabela 10, nas três corridas avaliadas obteve-se o maior valor de pH de 6,8 e o menor valor de 6,2. O processo de formulação da vacina contra Hib tem como insumos, o concentrado vacinal de Hib (PS-TT), Solução de lactose à 15,75% e água para injetáveis (WFI), e por este motivo a última etapa de produção do concentrado vacinal de Hib, diafiltração, se faz necessário para a troca da solução $\text{NaCl } 0,2 \text{ mL.L}^{-1}$ por WFI. Após diafiltração, o pH do concentrado vacinal, se mantém entre 5,0 e 7,0 conforme preconizado na especificação. A WFI que entrou no processo de diafiltração foi testada previamente e encontrava-se dentro dos parâmetros USP, com faixa de pH de 5,0 a 7,0. A distribuição da massa molar do concentrado vacinal de Hib foi realizada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular, item 2.3.5. A caracterização do polissacarídeo conjugado foi realizada também através desta técnica. Conforme a tabela 10 foi possível observar que nas três corridas de validação os resultados para esta determinação variaram de 91,2% a 95,6%, quando o critério determinado era de que pelo menos 80% do polissacarídeo conjugado deveria eluir antes de $kDa = 0,2$, estando desta forma todos os resultados dentro desta especificação. A quantificação de polissacarídeo livre no concentrado vacinal de Hib foi determinada através do ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme descrito no item 2.3.6. Tal quantificação tem como objetivo verificar o quantitativo de polissacarídeo livre não conjugado e que

não foi eliminado, no concentrado vacinal obtido. Conforme a Tabela 12, para este ensaio os resultados obtidos variaram de 0,83% a 3,86%, estando dentro do critério de aceitação determinado. Apesar dos resultados obtidos estarem bem abaixo da especificação, é possível verificar através da Tabela 12, que há uma grande variação entre os resultados obtidos na primeira corrida de validação com relação ao obtido nas outras duas corridas. Ainda na Tabela 12 foi realizada uma comparação entre os resultados de polissacarídeo livre obtidos para os três lotes de concentrado vacinal de Hib da validação com o resultado obtido para estes lotes quando utilizados na formulação da vacina final contra Hib.

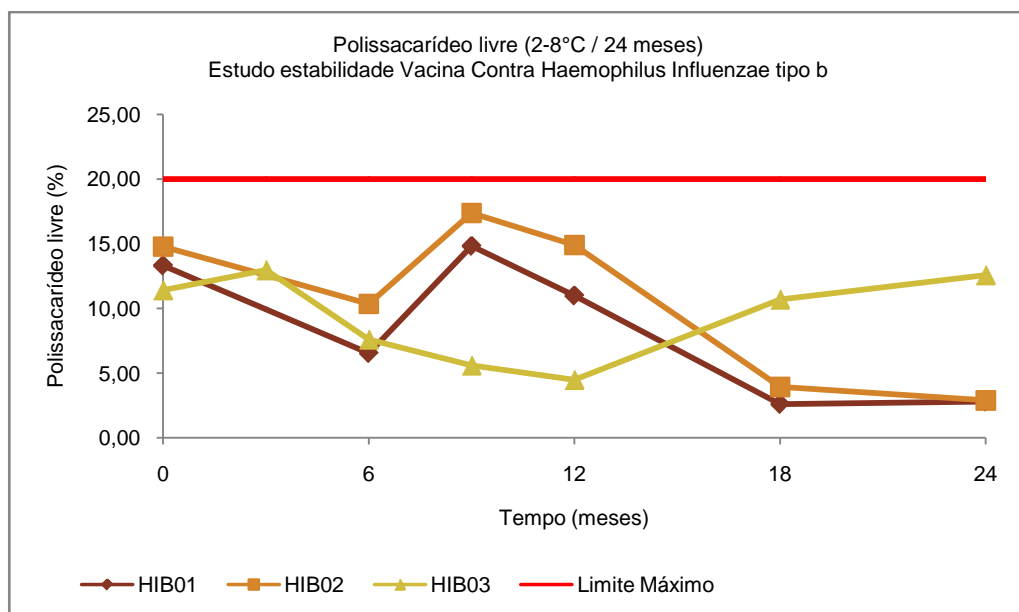
Tabela 12 – Resultado de polissacarídeo livre no concentrado vacinal e na vacina final

	Poli Livre PS-TT (Especificação: <20%)	Poli Livre Vacina Hib (Especificação: <20%)
Lote 1	1,34	9,99
	0,83	
Lote 2	3,7	9,46
	3,70	
Lote 3	3,13	11,19
	3,86	

Através da Tabela 12 é possível verificar de imediato que os resultados do concentrado vacinal de Hib que chamaram atenção na primeira corrida de validação, lote 1, não impactaram no resultado deste mesmo parâmetro na vacina final contra *Haemophilus Influenzae* tipo b. No concentrado vacinal pode-se observar que foram obtidos teores de 1,34 e 0,83% de polissacarídeo livre, porém quando este lote de concentrado vacinal entrou na formulação da vacinal final o resultado obtido foi de 9,99%. Este resultado foi próximo daquele encontrado para o lote 2 de vacina final de 9,46%, onde nesta formulação o resultado para o concentrado final encontrado foi de 3,7%. A especificação para o concentrado vacinal de Hib e para a vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b para esta metodologia é igual ou menor que 20%. Desta forma, a expectativa que se teria era de resultados menores no concentrado vacinal podendo fazer com que a vacina, ao longo do período de estabilidade, tivesse uma margem para incremento no resultado em virtude de uma

possível desconjugação do polissacarídeo em função do tempo de estocagem no período de validade de 24 meses. Isto poderia deixá-la fora de especificação, porém tal observação não pode ser comprovada quando se avalia os resultados de estabilidade. Observa-se uma pequena variação nos resultados de estabilidade tanto do concentrado vacinal quanto da vacina, indicada nos gráficos das Figuras 26 e 27.

Figura 26 – Resultados de polissacarídeo livre obtidos no estudo de estabilidade de longa duração para a Vacina contra *Haemophilus Influenzae* tipo b (conjugada).



Avaliando os resultados da Figura 26 pode ser facilmente observado o perfil instável de três lotes de vacina que foram colocados em estabilidade de longa duração. É possível iniciar uma análise através do tempo 0, análise inicial para liberação dos lotes para venda. É importante citar que os lotes HIB01 e HIB02 foram produzidos sequencialmente enquanto que o lote HIB03 foi produzido no ano posterior. No tempo 0, os resultados obtidos estavam acima de 10% e abaixo dos 15%, para os três lotes, mantendo uma proximidade nos resultados inicialmente. Após 6 meses de estabilidade no tempo 6, para os três lotes os resultados de poli livre sofreram um decréscimo ficando entre 5 e 10%, redução esta não justificável, já que o produto manteve-se durante os seis meses armazenado em câmara fria 2-8°C (temperatura de estocagem deste produto). Fato bastante intrigante ocorreu depois de passado mais 6 meses, no tempo 12, quando tanto o lote HIB01 quanto o lote de HIB02 (produzidos em campanha) tiveram um acréscimo nos resultados

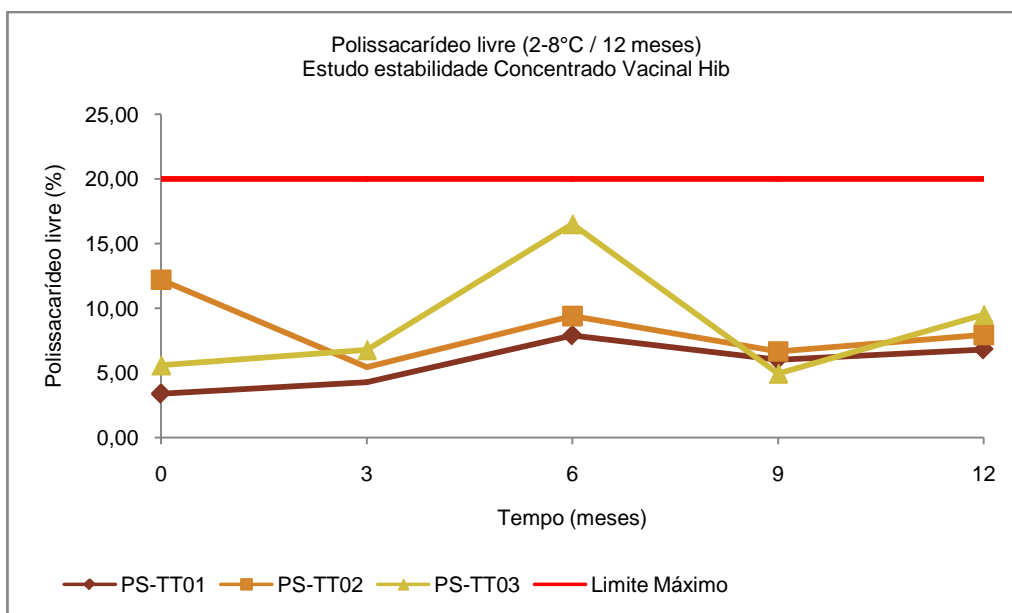
comparando com o período anterior, ficando entre 10 e 15%, resultado similar com o obtido no tempo 0, o que poderia ser justificado por uma possível desconjugação do polissacarídeo. Já o lote HIB03 produzido no ano posterior, manteve o perfil do tempo 6, decrescendo com o tempo. Passados mais seis meses, no tempo 18, houve novamente um decréscimo brusco dos resultados dos lotes HIB01 e HIB02, passando para em torno de 5%, enquanto que o HIB03 obteve um acréscimo no resultado com relação ao obtido no período anterior, perdendo o perfil de decaimento obtido até o momento. No período final da validade, após mais seis meses, no tempo 24, os lotes HIB01 e HIB02 mantiveram-se em torno dos 5% obtidos no período anterior e o HIB03 teve seu resultado acrescido em relação aos últimos 6 meses finalizando em torno de 12%. Verifica-se, portanto a variabilidade nos resultados e a instabilidade desta metodologia.

Avaliando os resultados da Figura 27 pode ser facilmente observado que o perfil obtido durante o estudo de estabilidade do concentrado vacinal também é instável, porém não tanto quanto o observado na vacina, para os três lotes de concentrado vacinal colocados em estabilidade de longa duração. É possível iniciar uma análise através do tempo 0, análise inicial para liberação dos lotes para serem utilizados na formulação da vacina. É importante citar que os lotes PS-TT01 e PS-TT02 foram produzidos sequencialmente enquanto que o lote PS-TT03 foi produzido no mesmo ano, mas após a produção de 19 lotes a contar do PS-TT02. Para o tempo 0, os resultados obtidos foram os seguintes: PS-TT01, 3,39%, PS-TT02, 12,21%, PS-TT03, 5,61%. É possível verificar uma diferença de 8,82% entre os dois primeiros lotes produzidos sequencialmente em campanha. Fato ocorrido nos lotes de validação quando foi obtida uma diferença de 2,87%, entre os resultados da primeira corrida (0,83%) e da segunda corrida (3,7%). Após três meses de estabilidade no tempo 3, ocorreu um decréscimo no resultado do lote PS-TT02 em relação ao resultado obtido no tempo 0, passando a 5,46%, resultado mais próximo do lote PS-TT01 que ocorreu um acréscimo no resultado passando a 4,29%, também ocorreu um acréscimo de resultado no lote PS-TT03 passando o resultado para 6,78%. Passados mais 9 meses da estabilidade, nos tempos 6, 9 e 12, os lotes PS-TT01 e PS-TT02 produzidos na rotina sequencialmente passaram a variar juntos e discretamente, chegando ao final da validade, com os seguintes resultados, lote PS-TT01, 6,81%, e PS-TT02, 7,94%. Para o lote PS-TT03, após três meses a contar do tempo 3, no tempo 6, houve um acréscimo brusco em relação ao tempo 3, com

resultado obtido de 16,52%. Nos tempos 9 e 12 subsequentes o lote PS-TT03 seguiu a variação dos lotes PS-TT01 e PS-TT02, atingindo ao final da validade resultado de 9,51%.

Finalizando a discussão relacionada ao parâmetro de produto polissacarídeo livre, não foi observado ao longo das corridas de validação qualquer desvio de processo que justifique a diferença nos resultados entre a corrida um de validação das corridas dois e três. Todos os parâmetros de processo mapeados foram controlados e mantiveram os resultados dentro dos critérios pré-estabelecidos pela validação. As massas de partida padrão tanto do produto intermediário PRRP quanto dos insumos de produção, ADH, CNBr, PMT e EDAC, diretamente responsáveis pelo desenvolvimento das reações também mantiveram-se dentro dos critérios pré-determinados pela fórmula padrão de produção, não sendo os resultados aqui divulgados na tabela de parâmetros de processo, apenas pela necessidade de confidencialidade e sigilo industrial desta informação do processo produtivo.

Figura 27 – Resultados de polissacarídeo livre obtidos no estudo de estabilidade de longa duração para o Concentrado Vacinal de Hib.



CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Após análise de todos os resultados e discussão destes com relação ao desempenho em determinada etapa do processo, é possível concluir que o protocolo de validação proposto cumpriu as diretrizes estabelecidas para validação concorrente de um processo conforme guias regulatórios, normas do órgão regulador nacional ANVISA e inclusive órgãos regulatórios internacionais FDA e OMS preconizam, já que todos os resultados obtidos estiveram dentro dos limites pré-determinados.

É possível confirmar que a metodologia de validação adotada, validação concorrente, atendeu ao processo em questão sendo totalmente aceitáveis pelos órgãos reguladores e com a vantagem de se poder comercializar os lotes utilizados no experimento, após finalização do estudo com resultados satisfatórios, evitando o desperdício de lotes para o laboratório produtor.

Os parâmetros críticos de processo mapeados para as duas etapas foram adequados ao protocolo proposto, sendo atendidos em sua totalidade diante dos critérios de aceitação pré-determinados com exceção apenas do parâmetro, temperatura de acondicionamento do PRP-ADH-TT bruto. Porém, tal desvio foi justificado e aceito com base no relatório de Qualificação, número 164653, onde se pode concluir que a condição de armazenamento do PSTT bruto foi mantida dentro das especificações.

É necessário se manter em estado de operação ótimo os controladores de pH utilizados durante as duas etapas de produção. Tais equipamentos são extremamente importantes para o acompanhamento do desempenho das reações através do controle da variável pH, ajustando o meio reacional quando necessário, e mantendo as faixas de aceitação pré-determinadas, garantindo o sucesso da batelada de produção.

Conforme demonstrado nos resultados não há necessidade de se manter a reação de conjugação em câmara fria por até 3 dias, conforme dados históricos de produção. Através dos resultados obtidos e discussões realizadas com base em resultados encontrados na literatura é possível a redução deste parâmetro de processo. Não houve correlação entre o rendimento obtido com o tempo de reação em câmara fria. O maior tempo de reação em câmara fria foi de 68h 42min para o

lote 1, sendo o rendimento obtido no concentrado final de 84,85%. Já para o menor tempo de reação em câmara fria de 62h 50min, para o lote 3, obtivemos rendimento de 87,44% no concentrado final. Porém, para o lote de tempo intermediário com relação aos lotes 1 e 3, de 67h 38min, o rendimento final obtido foi de 92,30%.

De acordo com os resultados obtidos dentro dos limites especificados para todos os parâmetros críticos de produto mapeados, considera-se aprovada a validação de processo para obtenção do concentrado vacinal de Hib utilizado para produção de vacina, através da metodologia de conjugação química via carbodiimida. Vale ressaltar que a metodologia desenvolvida foi específica para esta validação, necessitando assim de adaptações para utilização em outros equipamentos e outras metodologias de conjugação.

É importante citar que apesar de os resultados de polissacarídeo livre (parâmetro de produto) estarem dentro do limite de aceitação pré-determinado tal ensaio demonstrou alta variabilidade através dos resultados obtidos, sem uma correlação claramente definida ou justificada tecnicamente.

É possível concluir que os resultados obtidos para os atributos de qualidade para o produto são confiáveis, e que as metodologias utilizadas foram adequadas e precisas uma vez que, estas estavam validadas pelo detentor da transferência de tecnologia, e os resultados satisfatórios foram obtidos não só nos lotes de concentrado vacinal, como também nos lotes de vacina produzidas com estes concentrados produzidos na validação.

A validação deste processo de produção gera confiabilidade na produção deste concentrado vacinal, garantindo que toda batelada padrão realizada, seguindo os parâmetros de processo pré-determinados, produzirá consistentemente lotes de concentrado vacinal de Hib dentro dos critérios estabelecidos para o produto, evitando perdas de lotes inteiros de produção conforme há um total de 15 registros por desvios ocorridos durante o processo de produção.

Esta validação renderá impactos positivos a este processo de produção, já que devem ser estabelecidos em procedimentos de rotina os parâmetros de processo e os atributos de qualidade de produto utilizados na validação, sendo estes obrigatoriamente seguidos nas bateladas realizadas, garantindo a qualidade dos lotes produzidos e certamente o atendimento às demandas do Ministério da Saúde, evitando o desabastecimento da Vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b nos postos de vacinação. Além de atendimento a um item mandatário e cobrado pelos

órgãos reguladores tanto internacionais quanto nacionais, garantindo a imagem da instituição frente às auditorias de rotina.

Sugestões

Deve ser estabelecida uma rotina de monitoramento de todos os parâmetros e atributos de qualidade mapeados neste estudo. Tal monitoramento deve ser realizado através de ferramentas estatísticas usuais a fim de avaliar a consistência desta validação e verificar a possibilidade de pontos fora de controle mesmo que não fora dos limites de aceitação, a fim de se observar com antecedência uma possível necessidade de alteração nos processos de produção e uma posterior revalidação do processo.

Faz-se necessário avaliar com cautela a estabilidade do parâmetro polissacarídeo livre em mais lotes do que o de rotina (3 lotes). Deve ser inserido neste estudo de estabilidade lotes com resultados extremos obtidos no concentrado vacinal, isto é, resultados muito baixos e resultados muito altos, a fim de se verificar a performance destes na vacina final pelo período de validade de 24 meses.

O ensaio utilizado para determinação de polissacarídeo livre deve ser validado internamente com certa prioridade a fim de garantir que a variabilidade obtida não vem do ensaio realizado.

Reduzir o critério de aceitação de 2 a 3 dias para 2 dias no máximo para o parâmetro de processo, tempo de reação em câmara fria na etapa de conjugação, já que os resultados demonstraram que dois dias são suficientes para uma conjugação completa e eficiente.

REFERÊNCIAS

- ADA, G.; ISAACS, D. Carbohydrate-protein conjugate vaccines. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.9, p.79-85, 2003.
- ADAMS, W. G., et al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. **J. Amer. Med. Assoc.**, 1993, p. 221-226.
- ANDERSON, P., et al. Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of *Haemophilus influenzae* type b. **J. of Clin. Invest.**, 1972, n. 10, p. 115-124.
- ANVISA. Guias relacionados à garantia de qualidade. Brasília: ANVISA, 2006.
- ANVISA. RDC nº 17: Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, 2010.
- ASHWELL, G. Colorimetric analysis of sugar. *Methods Enzymol.* V.3, p. 87-90, 1957.
- ATHAIDE, A. Validação comprova e documenta qualidade dos produtos e equipamentos. São Paulo: Controle de Contaminação, maio/jun 2000.
- AVERY O. T.; GOEBEL W. F. Chemo-immunological on conjugated carbohydrateproteins. II. Immunological specificity synthetic of sugar-protein antigens. **J. Exp. Med.**, v. 50, p. 533, 1929.
- BEUVERY, E. C., et al. Immunological evaluation of meningococcal group C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate in mice. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 609-617, 1983.
- BEUVERY, E. C.; ROY, R.; KANHAI, V.; JENNINGS, H. J. Characteristics of two types of meningococcal group C polysaccharide conjugates using tetanus toxoid as carrier protein. **Dev. Biol. Stand.**, v. 65, p. 197-204, 1986.
- BIJLMER, H. A. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* invasive disease in development countries and intervention strategies. In: Ellis, R. W.; Granoff, D. M. (eds) **Development and use of *Haemophilus b* conjugate vaccines**. New York: Marcel Decker, p. 247-264, 1994.
- BIJLMER, H. A.; EVANS, N. L.; CAMPBELL, H. Carriage of *Haemophilus influenzae* type b in health Gambian children. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, p. 83, 831-835, 1989.
- BOUSKELA, M. A. L. Revisão sobre aspectos epidemiológicos do *Haemophilus influenzae* type b. São Paulo, 1995.
- CHOU, S. C.; LIU, J. P. Statistical design and analysis in pharmaceutical science: validation, process controls, and stability. **Marcel Decker**, v. 143, 1995.

CHU, C.; SCHNEERSON, R.; ROBBINS, J. B.; RASTOGI, S. C. Further studies on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcal type 6A polysaccharide-protein conjugates. **Infect. Immun.**, v.40, p. 245-256, 1983.

COCHI, S. L.; BROOME, C. V.; HIGHTOWER, A. W. Immunization of U. S. children with *H. influenzae* type b polysaccharide vaccine: A cost-effectiveness model of strategy assessment. **JAMA.**, v. 253, p. 521-529, 1985.

CRISEL, R. M. O.; BACKER, R. S.; DORMAN, D. E. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae* type b. I-Structural characterization of the capsular polymer of strain Egan. **J. Biol. Chem.**, v.250, p. 4926-4930, 1975.

DIFABIO, J. L.; Polisacáridos capsulares como vacunas antibacterianas. **Adel. Microbiol. Enf. Infec.**, v. 7, p. 1-18, 1988.

EMANUELLI, T.; SCANDIUZZI, M. Validação de processos na indústria farmacêutica. In: **Congresso de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos**, 2000. Rio Grande do Sul, Apostila do curso.

FDA. Guideline on General Principles of Process Validation. 1987.

FEIGENBAUM, A. V. **Controle da qualidade total**. São Paulo: Makróns Books, v. 1, p. 205, 1994.

GORDON, L. K. Polysaccharide endotoxoid conjugate vaccines, U. S. Patent n. 4619828, 1986.

GRANOFF, D. M.; CATES, K. L. *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccines. **J. Ped.**, 1985, p. 330-336.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. Califórnia: Academic Press, 1996.

HOJO, T.

Quality Management Systems: process validation guidance, v. 2, 2004.

JENNINGS, H. J.; LUGOWSKI, C. Immunochemistry of groups A, B and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. **J. Immun.**, v. 127, p. 1011-1018, 1981.

JONES, C. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.77, p.293-324, 2005.

JORDENS, J. Z.; SLACK, M.P.E. *Haemophilus influenzae*: Then and Now. **Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.**, v.14, n.11, p.935-948, 1995.

KELLY, D. F.; MOXON, E. R.; POLLARD, A. J. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **Immunology**, v.113, p. 163-174, 2004.

KAYHTY, H.; MAKELA, P. H.; PELTOLA, H. Immunological Basis for PRP Vaccines. In: Ellis, R. W.; GRANOFF, D. M. **Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1994, p. 1-19, 1994.

KILIAN, M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species. **J. Gen. Microbiol.**, v.3, p. 9-62, 1976.

KING, T. P.; ZHAO, S. W.; LAM, T. Preparation of protein conjugate via intermolecular Hydrazone Linkage. **Biochemistry**, v. 25, p. 5774-5779, 1986.

KNISKERN, P. J.; MARBURG, S. Conjugation, design, chemistry and analysis. In: ELLIS, R. W.; GRANOFF, D. M. **Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines**. New York: Marcel Dekker, p. 37-69, 1994.

KOSSACZKA, Z.; et al. Synthesis and Immunology properties of Vi and Di-O-Acetyl Pectin Protein Conjugates with Adipic Acid Dihydrazide. **Infec Immun.**, v. 65, n. 6, p. 2088-2093, 1997.

KUMMAR, R., et al. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide interference with lowry method. **Anal. Biochem.**, v. 336, p. 132-134, 2005.

LEI, Q. P.; et al. Kinetics studies on the rate of hydrolysis of N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimide in aqueous solutions using mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Anal. Biochem.**, v. 310, p. 122-124, 2002.

LINDBERG, A. A. Glycoprotein conjugate vaccines. *Vaccine*, v.7, p.28-29, 1999.

LORTHIOIS, A. P. A. A. Development of process for capsular polysaccharide *Haemophilus influenzae* type b with tetanus toxoid conjugation method. São Paulo, 2007. [Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo].

MICHAELS, R. H.; POZIVIAK, C.S.; STONEBRAKER, F.E.; NORDEN, C.W. Factors affecting pharyngeal *H. influenzae* type b colonization rates in children. 1976, n.4, p.413-417.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SI-PNI - Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunização. Disponível em: <http://pni.datasus.gov.br/calendario_vacina_infantil.asp>. Acesso em: 28 de janeiro, 2013.

MMWR, Morbidity and mortality Weekly report. *Haemophilus b* conjugate vaccines for prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease among infants and children two months of age and older. Recommendations of Health and Human Services, Centers for disease control, Atlanta, 1991, p.1-7.

MORETTO, L. D. Supervisão da Produção. 3ª ed. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1998.

MORETTO, L. D.; SHIB M. A era da validação. Pharm. Tech., 2000 Supervisão da Produção. 3a ed. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2000, n. 4, p. 44-48.

NIEMINEN T. **Circulating antibody-secreting cells and salivary antibodies induced by the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* after parenteral immunization and in acute otitis media.** Helsinki; 1999. Academic Dissertation –University of Helsinki.

PEDERSEN, M. K., et al. Effect of different hapten-carrier conjugation ratios and molecular orientations antibody affinity against a peptide antigen. **J. Immunol. Methods.**, v. 311, p. 198-206, 2006.

PEETERS, C. C. A. M.; TENBERGENS-MEEKES, A. M.; POOLMAN, J. T. Immunogenicity of a *Streptococcus pneumoniae* type 4 polysaccharide-protein conjugate vaccine is decreased by admixture of high doses of free saccharide. **Vaccine**, v. 10, p. 833-840, 1992.

PEETERS, C. C. A. M.; et al. Polysaccharide-protein conjugate vaccines. In: ROBINSON, G.; FARRAR, C. **Methods in molecular medicine: vaccine protocols.** Ottawa, Humana Press, p. 111-127, 1996.

PELTOLA, H. *Haemophilus influenzae* type b Disease and vaccination in Latin America and the Caribbean. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.16, p. 750-57, 1997.

PELTOLA, H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b Disease at the Beginning of the 21st Century: Global Analysis of the Disease Burden 25 Years after the Use of the polysaccharide Vaccine and the decade after the Advent of Conjugate. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.13, n. 2, p. 302-317, 2000.

PITTMAN, M. Variation and type specificity in the bacterial species *H. influenzae*. **J. Exp. Med.**, v.53, p. 471-495, 1931.

QI, X. Y.; KEYHANI, N. O.; LEE, Y. C. Spectrophotometric determination of hydrazine, hidrazides, and their mixtures with trinitrobenzenesulfonic acid. **Anal. Biochem.**, v. 175, p. 139-144, 1988.

ROBBINS, J. M.; SCHNEERSON, R.; PITTMAN, M. *Haemophilus influenzae* type b infections. **Bacterial vaccines**, New York: Academic Press, 1984.

RODRIGUES, L. P.; SCHNEERSON, R.; ROBBINS, J. B. Immunity to *Haemophilus influenzae* type b. **The J. of Immun.**, 1971, p. 1071-1080.

SCHNEERSON, R.; RODRIGUES, L.P.; PARKE, J.C.Jr.; ROBBINS, J.B. Immunity to disease caused by *H. influenzae* type b. II. Specificity and some biological characteristics of “natural”, infection acquired and immunizations induced antibody to the capsular, polysaccharide. **J Immunol.** v.107, p.1081-1089, 1971.

SCHNEERSON, R.; BARRERA, O.; SUTTON, A.; ROBBINS, J. Preparation, characterization, and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates. **J. Exp. Med.** V.152, p.361-375, 1980.

SCHWARTZ, B.; MOORE, P. S.; BROOME, C. V. Global epidemiology of meningococcal disease. **Clin Microbiol. Rev.**, v. 2, p. 118, 1989.

SELL, S. H. *Haemophilus influenzae* type b meningitides: manifestation and long term sequelae. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 6, p. 775-778, 1987.

SEPPALA, I.; MAKELA, O. Antigenicity of dextran-protein conjugates in mice. Effect of molecular weight of the carbohydrate and comparison of two modes of coupling. **J. Immunol.**, v. 6, p. 1259-1264, 1989.

WEBER, R. **Process validation.** Disponível em: <<http://www.fda.gov/cdrh/present/05001-weber.ppt>>. Acesso em: 17 Março, 2013.

WENGER, J. D.; HIGHTOWER, A.W.; FACKLAN, R.R. Bacterial meningitides in the United States, 1986: Report of a multistate surveillance study. **J. Infect. Dis.**, v.162, p.1316-1323, 1990.

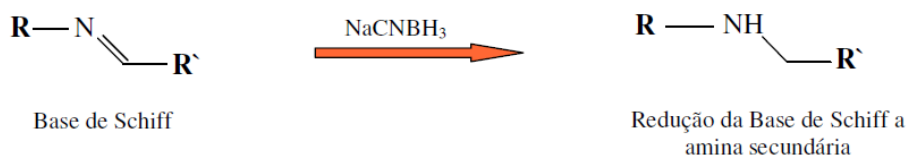
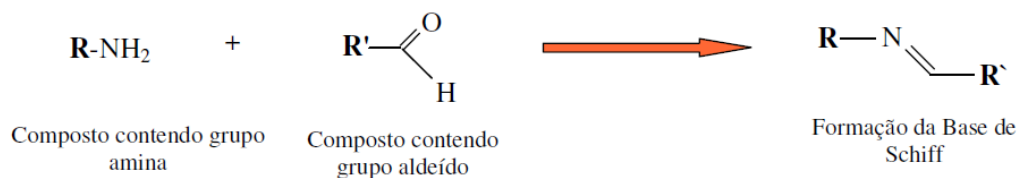
WENGER, J. D.; et al Epidemiological Impact of Conjugate Vaccines on Invasive Disease Caused by **Haemophilus influenzae** type b. In: LEVINE, MM.; WOODROW, G.C.; KAPER, J.B.; COBON, G.S. New generation vaccines. New York: Marcel Dekker. 1997.p. 489-502.

Who Position Paper on Haemophilus influenza type b conjugate vaccines, WHO, v. 73, p. 64-71, 1998.

World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/wer>>. Acesso em: 17 Fevereiro, 2013.

VAN ALPHEN, L.; Molecular Epidemiology of Hib Strains. In: ELLIS, R. W.; GRANOFF, D. M. Development and clinical uses of *Haemophilus* b conjugate vaccines. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 129-144.

ANEXO A – Método aminação redutiva com formação da base de Schiff



Aldeídos ou cetonas podem reagir com aminas primárias ou secundárias para formar Bases de Schiff, uma reação de desidratação que leva a geração de iminas. No entanto, a formação da Base de Schiff é relativamente lábil, uma interação reversível que é rapidamente clivada por hidrólise em solução aquosa. O rendimento da reação é consideravelmente mais elevado quando efetuado em solução com pH alcalino, mas ainda não é o suficiente para ser aplicado em condições de conjugação de macromoléculas a menos que a ligação seja reduzida a uma amina terciária ou quaternária.

ANEXO B – Avaliação da operação

Etapa ativação

Operador	Atividade	Registro de treinamento?		Operação apropriada?		
		Sim	Não	Sim	Sim com restrições?	Não
Operador 1	Atividades referentes aos DI's 1740 e 1894	X		X		
Operador 2	Atividades referentes aos DI's 1740 e 1894	X		X		
Operador 3	Atividades referentes aos DI's 1740 e 1894	X		X		
Operador 4	Atividades referentes aos DI's 1740 e 1894	X		X		

Etapa conjugação

Operador	Atividade	Registro de treinamento?		Operação apropriada?		
		Sim	Não	Sim	Sim com restrições?	Não
Operador 5	Atividades referentes aos DI's 1312, 1315, 1316 e 0089	X		X		
Operador 6	Atividades referentes aos DI's 1312, 1315, 1316 e 0089	X		X		
Operador 7	Atividades referentes aos DI's 1312, 1315, 1316 e 0089	X		X		
Operador 8	Atividades referentes aos DI's 1312, 1315, 1316 e 0089	X		X		
Operador 9	Atividades referentes aos DI's 1312, 1315, 1316 e 0089	X		X		
Operador 10	Atividades referentes aos DI's 1312, 1315, 1316 e 0089	X		X		

ANEXO C – Avaliação da qualificação dos equipamentos principais

Equipamento	TAG	Nº Relatório Qualificação	Validade	Status
Titulador automático Titrino	TIT005	161788	06/2012	APROVADO
Sistema Cromatografia Bioprocess	BIO003	200108-1291	Indeterminada	APROVADO

ANEXO D – Avaliação qualificação/calibração demais instrumentos utilizados

Etapa ativação

Descrição	Marca	Modelo	Série	Validade da Calibração/Qualificação	Nº Certificado/Relatório
Medidor de pH	HA405-60S-S7	400	AO5745	01/2012	168935
Indicador de temperatura	HA405-60S-S7	400	AO5743	01/2012	168935
Indicador de pH	PH402G	NA	S32100006	01/2012	168934
Indicador de pH	PH402G	NA	S32200006	01/2012	168935
Indicador de pH	HA405-60S-S7	400	AO5747	01/2012	168934
Termoresistência	CONSISTEC	PT-100 3 fios simples Classe 1/5	N/C	03/2012	144372
Termoresistência	CONSISTEC	PT-100 3 fios simples Classe 1/5	N/C	03/2012	144371
Termoresistência	YOKOGAWA	PT-100/UM330	T1D2147724 08	03/2012	144372
Potenciômetro	826	NA	1826001004 145	11/2011	132133
Condutivímetro	325	NA	02240391	01/2012	140769

Equipamento	TAG	Nº Relatório de Qualificação	Validade	Status
Freezer	FRZ054	160776	08/2013	APROVADO
Freezer	FRZ117	160778	07/2013	APROVADO
Banho termostático	BMA066	161345	08/2013	APROVADO
Banho termostático	BMA064	161344	08/2013	APROVADO
Balança Sartorius 4,2Kg	WI055	163968	01/2012	APROVADO
Balança Sartorius 34Kg	WI054	163972	01/2012	APROVADO
Balança Sartorius 4,2Kg	WI053	163969	01/2012	APROVADO
Câmara Fria	CFR038	154522	04/2012	APROVADO
Agitador magnético	AGT099	163687	06/2012	APROVADO
Agitador magnético	AGT100	163688	06/2012	APROVADO
Agitador mecânico	SIC1TAQ001	166145	08/2012	APROVADO
Paltronic	TIF007	140472	06/2012	APROVADO

ANEXO D – Avaliação qualificação/calibração demais instrumentos utilizados
(continuação)

Etapa conjugação

Descrição	Marca	Modelo	Série	Validade da Calibração/Qualificação	Nº Certificado / Relatório
Medidor de pH	METROHM	780	1780001005209	09/2012	172347
Eletrodo	METROHM	LL SYNTRODE	10552317	09/2012	172347
Condutivímetro	WTW	330I	02310007	07/2012	165864
Célula de condutividade	WTW	325	02240391	07/2012	165864
Potenciômetro	METROHM	826	1826001004145	10/2012	174765
Eletrodo	METROHM	POROTRODE	10954996	06/2012	174765
Medidor de pH	METROHM	704	1704001024208	08/2012	169824
Eletrodo	METROHM	POROTRODE	10954996	08/2012	169824

Equipamento	TAG	Nº Relatório de Qualificação	Validade	Status
Módulo de fluxo unidirecional	MFU025	139288	12/2011	APROVADO
Freezer	FRZ054	160776	06/2013	APROVADO
Balança	WI048	175274	04/2012	
Balança Sartorius 34Kg	WI059	163970	01/2012	APROVADO
Balança piso	WI060	155203	05/2012	APROVADO
Agitador magnético	AGT158	194488	11/2012	APROVADO

ANEXO E – Resultado do monitoramento dos parâmetros críticos de processo para as diafiltrações tangenciais

Parâmetro de processo	Critério de aceitação	Resultados		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3
Etapa Ativação				
Área filtrante das diafiltrações (m ²)	1,38	1,38	1,38	1,38
Cutt-off (kD)	10	10	10	10
Integridade dos cassetes	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Material das membranas	Polietersulfona	Polietersulfona	Polietersulfona	Polietersulfona
Pressão transmembrana durante a 1 ^a diafiltração (bar)	0,5 ±0,1	0,55	0,55	0,55
Pressão transmembrana durante a 2 ^a diafiltração (bar)	0,5 ±0,1	0,51	0,55	0,55
Pressão transmembrana durante a 3 ^a diafiltração (bar)	0,5 ±0,1	0,5	0,55	0,55
Velocidade de agitação do diafiltrado - 1 ^a diafiltração (rpm)	150 ±50	150	175	165
Velocidade de agitação do diafiltrado - 2 ^a diafiltração (rpm)	150 ±50	150	150	150
Velocidade de agitação do diafiltrado - 3 ^a diafiltração (rpm)	150 ±50	150	153	150

ANEXO F – Resultado do monitoramento dos parâmetros críticos de processo para purificação e finalização do conjugado

Parâmetro de processo	Critério de aceitação	Resultados		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3
Composição do empacotamento das colunas	Sephacryl HR500	Sephacryl HR500	Sephacryl HR500	Sephacryl HR500
Velocidade de agitação do tanque de aquecimento de PRP-ADH-TT (rpm)	100 ±10	105	104	106
Temperatura da jaqueta do tanque de PRP-ADH-TT(°C)	25	25	25	25
Temperatura do tanque de PRP-ADH-TT(°C)	18	18	18	18
Temperatura final do PRP-ADH-TT(°C)	20 ±2	20	18,5	18,3
Pressão do tanque de PRP-ADH-TT (bar)	0,7 ± 0,2	0,7	0,5	0,5
Área filtrante (m ²)	1,2	1,2	1,2	1,2
Tamanho do poro (µm)	0,65 – 0,45	0,65 – 0,45	0,65 – 0,45	0,65 – 0,45
Material do filtro	Acetato de celulose	Acetato de celulose	Acetato de celulose	Acetato de celulose
Tempo duração filtração esterilizante PRP-ADH-TT filtrado (min)	≤90	45	36	34
Volume de PS-TT a ser concentrado (L)	65 ± 5	65,6	65,6	65,2
Pressão tanque durante concentração (bar)	0,2 ±0,1	0,2	0,2	0,1
Velocidade de agitação do concentrado (rpm)	250 ± 50	300	300	300
Pressão transmembrana durante concentração (bar)	0,2 ±0,1	0,3	0,3	0,3
Vazão do filtrado durante concentração (L/min)	1,5 ± 0,5	1,2 -1,7	1,2 – 2,0	1,2 – 1,7
Volume do concentrado (L)	7,5 – 8,25	7,722	7,917	7,966
Pressão do tanque durante diafiltração (bar)	0,2 ± 0,1	0,3	0,1	0,1
Volume de WFI utilizada na diafiltração (L)	75 ± 1	74,4	75,6	75,1
Pressão transmembrana durante diafiltração 20L iniciais (bar)	0,2 ±0,1	0,275	0,3	0,3
Pressão transmembrana durante diafiltração 21L até 75L (bar)	0,5 ±0,1	0,57	0,5	0,45
Vazão do filtrado durante diafiltração (L/min)	2,0 ± 1,0	1,1 – 2,5	1,4 – 3,3	1,2 – 3,3

ANEXO G – Avaliação da validação das metodologias analíticas utilizadas

Método	POP/IT de Referência do Método	Equipamentos Envolvidos / Tipo	Nº Protocolo validação	Status	Data 1ª validação
Distribuição de peso molecular	1487	HPLC Waters	035/2008	Validado	03/2009
Determinação de EDAC	1184	HPLC Waters	008/2006	Validado	01/2007
Determinação de cianeto	1587	HPLC Dionex	002/2006	Validado	03/2007
Determinação da concentração de polissacarídeo	0223	HPLC Dionex	085/2011	Validado	03/2011
Dosagem de Proteínas Método de Lowry	1012	Espectrofotômetro	970/2003	Validado	06/2004
Conteúdo de Polissacarídeo - Método colorimétrico (Orcinol)	1015	Espectrofotômetro	86717	Revalidado	02/2012
Conteúdo de Polissacarídeo - Método colorimétrico (Orcinol)	1015	Espectrofotômetro	971/2003	Validado	11/2005
Determinação da concentração de ADH	0956	Espectrofotômetro	2894/2004	Validado	12/2005
Eliminação de ADH	1000	Cromatógrafo	150/2005	Validado	10/2006
Proteína livre	^(*) Em validação	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável
Polissacarídeo livre	^(*) Em validação	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável	Não aplicável

(*) Em validação internamente mais já validada pelo detentor da tecnologia.