



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA



RENATA CHAGAS BASTOS

**ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO DE UMA NOVA
VACINA MENINGOCÓCICA C CONJUGADA**

**Rio de Janeiro
2016**

RENATA CHAGAS BASTOS

**ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO DE UMA NOVA
VACINA MENINGOCÓCICA C CONJUGADA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Ricardo de Andrade Medronho
José Godinho da Silva Junior
Ivna Alana Freitas Brasileiro
da Silveira

**Rio de Janeiro
2016**

Ficha Catalográfica

BB327e Bastos, Renata Chagas
Escalonamento da produção de uma nova vacina
meningocócica C conjugada / Renata Chagas Bastos. --
Rio de Janeiro, 2016.
222 f.

Orientador: Ricardo de Andrade Medronho.
Coorientadora: Ivna Alana Freitas Brasileiro da
Silveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós
Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e
Bioquímicos, 2016.

1. Vacina meningocócica C conjugada. 2. Aumento
da escala produtiva. 3. Estabilidade térmica. 4.
Análise de custos. I. Medronho, Ricardo de Andrade
, orient. II. Silveira, Ivna Alana Freitas
Brasileiro da, coorient. III. Título.

RENATA CHAGAS BASTOS
ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO DE UMA NOVA VACINA
MENINGOCÓCICA C CONJUGADA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientada por:

Ricardo de Andrade Medronho, *PhD*. Prof. EQ, UFRJ

José Godinho da Silva Jr., *DSc*. Bio-Manguinhos, Fiocruz

Ivna Alana F. B. da Silveira, *DSc*. Bio-Manguinhos, Fiocruz

Aprovada por:

Andrea Medeiros Salgado, *DSc*. Prof. EQ, UFRJ

Amaro Gomes Barreto Jr., *DSc*. Prof. EQ, UFRJ

Antônio de Pádua Risolia Barbosa, *DSc*. Bio-Manguinhos, Fiocruz

Maria Antonieta Ferrara, *DSc*. Far-Manguinhos, Fiocruz

José Mauro Peralta, *PhD*. Prof. Instituto de Microbiologia, UFRJ

Aos meus pais Odari da Cruz Bastos (vivo no coração) e Jussara Chagas Bastos, por terem proporcionado a base de tudo: a família;

Aos meus amados Jorge Luiz e Júlia, pelo amor, compreensão, incentivo e também por estarem ao meu lado nos momentos de ansiedade e estresse durante o tempo em que me dediquei ao doutorado;

À minha família, que soube entender minha ausência nos muitos momentos desde que ingressei no doutorado até a conclusão desta tese.

Agradecimentos

Agradeço a Deus que tornou tudo possível, colocando pessoas em minha vida que foram especiais em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

A execução deste trabalho passou por muitos caminhos. Muitas foram as pessoas que contribuíram nesta caminhada, direta ou indiretamente. Desta forma, antes de agradecer aos mais envolvidos, deixo o meu agradecimento a todos, mesmo que não citados nominalmente.

Ao amigo orientador Prof. Ricardo Medronho agradeço pela orientação, confiança e autonomia que sempre me concedeu na realização dos experimentos e também, pela experiência profissional e disponibilidade de tempo que foram fundamentais para que eu pudesse concluir esta tese.

Ao meu chefe, amigo e orientador Prof. José Godinho por sua valiosa experiência, pelo incentivo e sugestões que muito têm influenciado na minha formação profissional e pessoal, e também pelo exemplo de amor à ciência.

À amiga e orientadora Dra. Ivna Alana pela oportunidade, confiança, orientação, dedicação e o apoio incansável durante a elaboração deste trabalho e também pelas críticas que têm contribuído para o meu crescimento pessoal e amadurecimento profissional.

À equipe da conjugação: Milton Neto; Iaralice Medeiros; Marilza Batista; Flavia Silva; Rafael Ficha e Felipe Betoni. O mérito também é de vocês!

Aos companheiros do Laboratório de Macromoléculas (LAMAM) Hilton, Ana Paula Ano Bom, Ana Paula Araújo, Priscila, Izabella, Patricia, Luãna e Rayane, pelo companheirismo e boa convivência.

Às minhas queridas amigas de longa data Solange Fernandes, Adenilza Bello, Solange Pereira, Aline Zanatta, Andrea Larangeira, Maria do Carmo Gonçalves, Carla Wolanski e Luciana Madeira que sempre estiveram ao meu lado, pelas palavras de carinho e incentivo.

Ao querido amigo Deyves Paraguassu pela ajuda e dicas inestimáveis.

A toda equipe do Laboratório de Tecnologias Bacterianas (LATEB) por me fazerem sentir como se nunca tivesse deixado de ser um membro do grupo.

Resumo

BASTOS, Renata Chagas. **Escalonamento da Produção de uma Nova Vacina Meningocócica C Conjugada**. Orientadores: Ricardo de Andrade Medronho, *PhD*, José Godinho da Silva Júnior, *DSc* e Ivna Alana Freitas B. da Silveira, *DSc*. Rio de Janeiro, 2016. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Neisseria meningitidis é um dos agentes patogênicos associados a casos de meningite e outras manifestações clínicas em todo o mundo. Atualmente, no quadro epidemiológico brasileiro, 60% dos casos notificados de doença meningocócica são associados ao grupo C. As etapas de produção, purificação e controle foram desenvolvidas para obtenção de uma nova vacina meningocócica C conjugada (MPCT). A produção da vacina envolve a conjugação entre o polissacarídeo meningocócico C oxidado (MPCO) e a anatoxina tetânica ativada (MATT) pelo método de aminação redutiva modificada. Para a realização da última avaliação clínica antes da comercialização da vacina, o processo de produção foi escalonado visando obter lotes industriais. Além do aumento do volume reacional e da área disponível para a ultrafiltração, foram estabelecidos os parâmetros referentes à purificação por filtração tangencial. A utilização do reator para obtenção do MPCO proporcionou o monitoramento constante da temperatura e agitação da reação e maior rastreabilidade do processo. O emprego da cápsula filtrante com maior área disponível para a clarificação do produto solucionou o problema de entupimento da membrana clarificante observado anteriormente. Além disso, o aumento da pressão transmembrana de trabalho para 25 psi (1,7 bar) foi adequado e resultou na obtenção do produto com características similares em volume suficiente para a obtenção de dois lotes de conjugado. O aumento global da escala produtiva foi conduzido sem diferenças significativas no tempo de processo e na recuperação das moléculas, em comparação com a escala piloto. Os métodos analíticos (eletroforese capilar de zona - CZE, ressonância magnética nuclear de hidrogênio - ¹H RMN, cromatografia de exclusão e filtração molecular) demonstraram, não só a consistência de produção como também a equivalência das características das moléculas nas duas escalas produtivas. Os testes para avaliação da estabilidade térmica de três lotes de MPCT obtidos em escala industrial, incubados nas temperaturas de 4° C, 37° C e 55° C por cinco semanas, indicaram a desnaturação parcial da proteína carreadora e uma tendência de diminuição do conteúdo da estrutura secundária (55° C), empregando espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular. A cromatografia de exclusão e filtração molecular e ¹H RMN mostraram, além do alargamento na base do pico, a manutenção do tamanho hidrodinâmico da molécula conjugada e o aumento da intensidade dos picos com deslocamentos químicos relacionados aos prótons de grupamentos aromáticos e alifáticos da proteína carreadora, nos lotes estocados a 55° C. Os conjugados mantidos a 37° C e 55° C apresentaram teor de glicídio livre superior ao limite especificado (20 %), utilizando-se a técnica de CZE. Todos os lotes de conjugado induziram altos títulos de IgG com elevada atividade bactericida, em camundongos, sugerindo que o modelo murino não é capaz de discriminar as alterações estruturais observadas. A avaliação dos custos do escalonamento da vacina mostrou que houve economia de escala, com a redução dos custos considerando os gastos médios com insumos e pessoal. O processo desenvolvido neste estudo será empregado para a obtenção de lotes industriais da nova vacina meningocócica C conjugada, que serão submetidos aos estudos clínicos de Fase II/III.

Palavras chave: Vacina meningocócica C conjugada; Aumento da escala produtiva; Estabilidade térmica; Análise de custos

Abstract

BASTOS, Renata Chagas. **Scale Up Production of a New Meningococcal C Conjugate Vaccine**. Ricardo de Andrade Medronho, *PhD*, José Godinho da Silva Júnior, *DSc* e Ivna Alana Freitas B. da Silveira, *DSc*. Rio de Janeiro, 2016. Thesis (Doctor's degree in Technology of Chemical and Biochemical Processes).

Neisseria meningitidis is the most common cause of meningitis and other clinical manifestations around the world. Nowadays 60% of meningococcal disease reported cases in Brazil are associated with group C. The production, purification and control steps were developed to obtain a new meningococcal C conjugate vaccine (MPCT). Vaccine production uses a modified reductive amination conjugation method between periodate-oxidized meningococcal C polysaccharide (MPCO) and hydrazide-activated monomeric tetanus toxoid (MATT). For the last clinical evaluation before vaccine commercialization, production process was scaled up to obtain industrial batches. Some parameters related to purification by tangential flow filtration were established in addition to the increase of reaction volume and area available for ultrafiltration. By using the reaction vessel for MPCO production, it was possible to operate under constant temperature and monitor reaction agitation which ensured better process traceability. The use of a membrane filter capsule with larger available area for product clarification eliminated the membrane clogging previously observed. In addition, the increase of transmembrane pressure to 25 psi (1.7 bar) was adequate and resulted in a product with the same characteristics producing volume enough for two conjugate batches. Scaling up was conducted without significant differences in process time and molecules recovery, comparing with pilot scale. Analytical methods (capillary zone electrophoresis - CZE, proton nuclear magnetic resonance - ^1H NMR, size exclusion chromatography) demonstrated not only production consistency but also equivalence of the molecules characteristics obtained in both scales. Thermal stability evaluation of three industrial scale MPCT batches incubated at 4° C, 37° C and 55° C for five weeks indicated carrier protein partial denaturation and a trend to loose structural conformation (55° C) by using fluorescence spectroscopy and circular dichroism. Size exclusion chromatography and ^1H NMR showed peak base broadening, hydrodynamic size maintenance of the conjugated molecule and increase of peaks intensity whose chemical shifts are related to protons of aromatic and aliphatic groups from carrier protein in conjugate batches stored at 55°C. Conjugates maintained at 37° C and 55° C showed free saccharide content above the specified limit (20 %) by using CZE technique. All conjugate batches induced IgG titers with high bactericidal activity in mice, suggesting that the murine model is not able to discriminate structural changes observed. Scaling up vaccine production led to a decrease in production costs considering the average cost of inputs and labor costs. The methodology described in this study will be used to obtain industrial batches of the new meningococcal C conjugate vaccine, which will be submitted to Phase II / III clinical studies.

Key words: Meningococcal C conjugate vaccine; Scale up production; Thermostability; Cost Analysis.

Lista de Figuras

- Figura 1:** *N. meningitidis*. http://www.novartisvaccines.com/images/products-diseases/meningococcal-disease/bexsero/Meningitis_bacteria.jpg acesso em 29 de novembro de 2014). 11
- Figura 2:** Distribuição global dos grupos de *N. meningitidis*. Adaptado de Oviedo-Orta *et al.* (2015) 18
- Figura 3:** Cinturão da meningite na região da África subsaariana, que se estende desde a Etiópia até o Senegal (<http://www.menafricar.org/> - acesso em 28 de julho de 2013). 19
- Figura 4:** Distribuição dos grupos causadores de doença meningocócica nas diferentes regiões do Brasil (2015). Valores percentuais calculados a partir de dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificações – SINAN/Net - acesso em 31 de Julho de 2016. 24
- Figura 5:** Resposta imunológica ao polissacarídeo. Os polissacarídeos estimulam as células B através da ligação ao receptor de célula B (RCB), induzindo a produção de imunoglobulinas. Este processo não induz a produção de células B de memória. Adaptado de: Pollard *et al.* (2009). 25
- Figura 6:** Resposta imunológica ao conjugado. A proteína carreadora presente na molécula conjugada é processada por células B específicas e os peptídeos são apresentados às células T, via receptor de célula T (RCT), através do MHC-II, o que resulta tanto na produção de plasmócitos secretores de anticorpos, como de células B de memória. Adaptado de: Pollard *et al.* (2009). 27
- Figura 7:** Representação de diferentes tipos estruturais de vacinas conjugadas. (a) Vacina neoglicoconjugada obtida através da ativação do glicídio com periodato de sódio e conjugação com a proteína carreadora via aminação redutiva, (b) Vacina conjugada obtida através de uma rede de ligações cruzadas, com alto peso molecular (conjugação via carbodiimida). Adaptado de: JONES (2005). 46
- Figura 8:** Etapas de obtenção de conjugados a partir de um polissacarídeo e uma proteína carreadora com a ativação do polissacarídeo e/ou da proteína carreadora antes da conjugação. Adaptado de: JOSEFSBERG e BUCKLAND (2012). 48
- Figura 9:** Esquemas de obtenção de vacinas polissacarídicas conjugadas através de síntese química (A) e utilizando a tecnologia PGTC (B). A tecnologia é versátil e permite a conjugação biológica de glicídeos bacterianos a qualquer proteína carreadora, através do acoplamento enzimático “in vivo” utilizando a via de glicosilação presente na bactéria *Campylobacter jejuni* (via N-glicosilação em resíduos de asparagina), em *Escherichia coli* recombinante. Adaptado de: IHSEN *et al.* (2010). 49
- Figura 10:** Estrutura tridimensional da cadeia leve da toxina tetânica. Fonte: RAO *et al.*, 2005. 52

- Figura 11:** Processo de desenvolvimento de vacinas: O processo de desenvolvimento de uma vacina pode ser demorado e envolve muitos passos que incluem controles e regulamentações. De maneira geral é dividido em quatro etapas: pesquisa básica, pré-clínica, clínica e de pós-licenciamento (farmacovigilância), necessárias para garantir a segurança e imunogenicidade / eficácia do produto final licenciado. Adaptado de: BARBOSA (2009). 56
- Figura 12:** Principais características dos processos que utilizam diferença de pressão como força motriz. Adaptado de: HABERT *et al.* (2006)..... 64
- Figura 13:** Modelo esquemático de representação dos tipos de filtração: (A) Filtração com fluxo normal (NFF) e (B) Filtração com fluxo tangencial (TFF). Adaptado de: Technical Brief, Millipore Publication, 2003, Disponível em: <http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/MILLIPORE_TFF.pdf> (Acesso em 26/07/2016)..... 65
- Figura 14:** Tipos de pressão em um sistema de filtração tangencial. Adaptado de: GHOSH (2006). 66
- Figura 15:** Principais geometrias dos módulos comerciais de UF e seus respectivos fluxos de alimentação, filtrado e retido. Adaptado de: LUTZ e RAGHUNATH (2007)..... 68
- Figura 16:** Comparação esquemática entre filtração com fluxo normal e filtração com fluxo tangencial. Adaptado de: HABERT *et al.* (2006)..... 70
- Figura 17:** O fenômeno de polarização da concentração. A figura ilustra, de maneira esquemática, o fenômeno de polarização da concentração durante o processo de filtração. O soluto é impulsionado através da membrana de espessura δ com queda de pressão de operação ΔP . Observa-se o aumento da concentração de soluto próximo à membrana (C_{sm}), seja em função da transferência de massa deste soluto, ou pela permeação do solvente através da membrana. Adaptado de: BLAKE *et al.* (2011)..... 71
- Figura 18:** Classificação dos gastos industriais. Adaptado de: DIAS e PADOVEZE (2007)..... 79
- Figura 19:** Fluxo de obtenção dos produtos intermediários (MPCO e MATT) e do MPCT final com a indicação das etapas consideradas na análise comparativa de custos: 1 – o custo médio com pessoal necessário para o escalonamento das reações químicas envolvidas no processo e 2 - o custo médio com insumos necessários para a otimização do processo de purificação por TFF. Legenda: MenPSC – polissacarídeo meningocócico C; MPCO – polissacarídeo meningocócico C oxidado; TT – anatoxina tetânica; MATT – proteína tetânica ativada; MPCT – Glicoconjugado. 85
- Figura 20:** Reação de clivagem oxidativa da ligação entre carbonos com hidroxilas vicinais, presentes na molécula do polissacarídeo C através de uma reação de oxidação branda com o reagente m-periodato de sódio (NaIO_4). Como resultado, são gerados grupos aldeído na molécula do glicídio. Adaptado de SILVEIRA *et al.* (2007)..... 87
- Figura 21:** Reator de vidro utilizado na reação de obtenção do MPCO na escala industrial. Painel A: Reator vazio conectado ao sistema de refrigeração (indicado pela seta). Painel B: Reator contendo a mistura reacional ao abrigo da luz. 88
- Figura 22:** Reação de derivatização seletiva dos aminoácidos ácidos presentes na anatoxina tetânica (Aspártico e Glutâmico) com Cloridrato de hidrazina ($\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$) em presença de EDAC para a obtenção da MATT. Adaptado de HERMANSON (2008)..... 89

- Figura 23:** Reação de ativação da anatoxina tetânica na escala industrial. O frasco contendo a mistura reacional é mantido à temperatura ambiente sob agitação constante em agitador magnético. 90
- Figura 24:** Reação de conjugação entre MPCO e MATT, através do método de aminação redutiva. Adaptado de SILVEIRA *et al.* (2007). 91
- Figura 25:** Reação de conjugação entre MPCO e MATT na escala industrial. Painel A: Banho-Maria contendo o frasco onde ocorre a reação, mantido sob agitação constante em agitador magnético. Painel B: Frasco contendo o conjugado (MPCT) ao término da reação. 92
- Figura 26:** Etapa de clarificação do MPCO na escala industrial. O produto é bombeado do reator através da cápsula filtrante com o auxílio da bomba peristáltica e o material clarificado é coletado diretamente em um frasco. 95
- Figura 27:** Etapa de diafiltração do MPCO na escala industrial realizada em sistema de filtração tangencial Centrassette com três membranas de polietersulfona com 0,5 m² de área filtrante (indicado pela seta). 96
- Figura 28:** Etapas de obtenção do MPCO envolvendo a escala piloto e a escala industrial. Ressaltam-se as diferenças operacionais entre ambas as escalas e os objetivos pretendidos em cada etapa do processo: A – Parar a areação; B - Remoção de partículas suspensas visando diminuir a possibilidade de entupimento das membranas de filtração tangencial; C - Redução do volume para o processamento por filtração tangencial (etapa de diafiltração); D - Remoção do glicerol excedente e de subprodutos da reação; D - Atingir a concentração mínima necessária para a reação de conjugação. 97
- Figura 29:** Processo de purificação da MATT em escala industrial. Painel A: Etapa de concentração inicial da MATT. Painel B: Etapa de diafiltração da MATT. Com a otimização do processo de purificação por filtração tangencial em escala industrial, utilizou-se o sistema Centramate (indicado pela seta) com três membranas de 0,09 m² de área filtrante. 100
- Figura 30:** Etapas de obtenção da MATT envolvendo a escala piloto e a escala industrial. Ressaltam-se as diferenças operacionais entre ambas as escalas e os objetivos pretendidos em cada etapa do processo: A - Redução do volume para o processamento (etapa de diafiltração); B - Remoção da hidrazina excedente e de subprodutos da reação; C - atingir a concentração mínima necessária para a reação de conjugação. 101
- Figura 31:** Purificação do conjugado na escala industrial. Primeira diafiltração com solução Na₂HPO₄ 10 mM, pH 10,5 realizada em sistema Centrassette com três membranas com 0,5 m² de área (indicado pela seta). 103
- Figura 32:** Purificação do conjugado na escala industrial. Segunda diafiltração com solução PBS 1,0 mM, pH 7,0 realizada em sistema Centrassette com três membranas de 0,5 m² de área (indicado pela seta). 104
- Figura 33:** Etapas de obtenção do MPCT envolvendo a escala piloto e a escala industrial. Ressaltam-se as diferenças operacionais entre ambas as escalas e os objetivos pretendidos em cada etapa do processo: A - Parar a reação; B - Minimizar o teor de cianeto e eliminar os subprodutos de reação; C - Ajustar o pH do produto; D - Atingir o volume e a concentração adequada do produto final; E – Garantir a esterilidade do produto final. 105

- Figura 34:** Fluxo do filtrado em função da TMP. A seta mostra a TMP utilizada no processo de filtração tangencial. 117
- Figura 35:** Parâmetros observados no processo de obtenção do MPCO nas escalas piloto (azul) e industrial (vermelho). 121
- Figura 36:** Parâmetros observados no processo de obtenção da MATT nas escalas piloto (azul), industrial (vermelho) e industrial após o melhoramento (azul claro)..... 125
- Figura 37:** Parâmetros observados no processo de obtenção do MPCT nas escalas piloto (azul) e industrial (vermelho). 128
- Figura 38:** Perfis cromatográficos de um lote representativo do MPCO (linha com traço e ponto), MATT (linha tracejada) e MPCT (linha sólida) obtido nas escalas piloto (A) e industrial (B). A eluição isocrática da coluna cromatográfica TSK G[®] 4000 PWxl foi feita com uma solução 0,2 M de NaCl (0,5 mL min⁻¹) e o monitoramento da absorvância no comprimento de onda de 206 nm. 130
- Figura 39:** Comparação entre os espectros de ¹H-RMN de um lote representativo do MPCO obtido na escala industrial (A) e na escala piloto (B). A análise foi realizada em espectrômetro Bruker Avance, 400 MHz (Bruker BioSpin, Germany)..... 132
- Figura 40:** Comparação entre os espectros de ¹H-RMN de um lote representativo do MPCT obtido na escala industrial (A) e na escala piloto (B). A análise foi realizada em espectrômetro Bruker Avance, 400 MHz (Bruker BioSpin, Germany)..... 133
- Figura 41:** Eletroferograma (CZE) do MPCT. A figura mostra o perfil de migração do MPCT e do MPCO livre (não conjugado). 135
- Figura 42:** Área espectral de um lote representativo de MPCT estocado nas temperaturas de 4 °C, 37 °C e 55 °C. Observa-se a menor área espectral para a maior temperatura de incubação. No quadro menor observa-se o espectro de emissão de fluorescência do MPCT estocado na temperatura de 4°C (linha sólida) e 55°C (linha tracejada). São mostrados o deslocamento de Fmax (324 nm para 328 nm) e a redução da intensidade de fluorescência para o conjugado incubado a 55°C. As amostras foram excitadas a 280 nm e a emissão de fluorescência foi adquirida entre 295 e 415 nm a 25 °C. 140
- Figura 43:** Elipticidade a 220 nm de um lote representativo de MPCT estocado nas temperaturas de 4 °C, 37 °C e 55 °C. No quadro menor observa-se o espectro de dicroísmo circular na região de UV distante referente à temperatura de 4 °C (linha sólida) e 55 °C (linha tracejada). A diminuição do conteúdo de estrutura secundária na temperatura mais elevada é indicada pela diminuição da elipticidade negativa. Os espectros foram obtidos na temperatura de 20 ± 1 °C. 141
- Figura 44:** Espectros de ¹H RNM (400 MHz) de um lote representativo de MPCT estocado nas temperaturas de 4 °C, 37 °C e 55 °C. Observa-se o aumento da intensidade dos sinais nas regiões dos prótons de grupamentos alifáticos (entre 0,3 e 1,6 ppm) e aromáticos (entre 6,5 e 7,5 ppm) da proteína com o aumento da temperatura de incubação..... 144
- Figura 45:** Perfis de eluição na coluna cromatográfica TSK G[®] 4000 PWxl de um lote representativo do MPCT incubado nas temperaturas de 4 °C (linha sólida), 37 °C (linha com traço e ponto) e 55 °C (linha tracejada). A absorvância foi monitorada nos comprimentos de onda de 254 nm (A) e 206 nm (B). 146

- Figura 46:** Análise comparativa de custos de obtenção dos produtos intermediários (MPCO e MATT) e do conjugado final (MPCT) nas escalas piloto (azul) e industrial (vermelho) apresentada em unidades percentuais considerando os dados da escala piloto como 100%. As análises foram realizadas levando em conta os custos com pessoal (custo homem-hora) para a avaliação do escalonamento dos volumes reacionais e os custos com os insumos para a avaliação da otimização dos processos de purificação. A avaliação do custo total considerou o somatório dos valores obtidos nas análises anteriores..... 154
- Figura 47:** Redução percentual dos custos de produção de MPCO, MATT e MPCT na escala industrial, em relação à escala piloto, considerando gastos com pessoal para o aumento dos volumes reacionais. 155
- Figura 48:** Redução percentual dos custos de produção de MPCO, MATT e MPCT na escala industrial, em relação à escala piloto, considerando gastos com insumos para a otimização do processo de TFF. 156
- Figura 49:** Redução percentual dos custos de produção de MPCO, MATT e MPCT na escala industrial, em relação à escala piloto, considerando gastos com pessoal e com insumos..... 157
- Figura 50:** Análise comparativa da redução percentual dos custos de obtenção de MATT nas escalas piloto e industrial após a otimização do processo de purificação por filtração tangencial. Os dados são apresentados em unidades percentuais fixando os dados da escala piloto como 100%. As análises foram realizadas considerando os gastos com pessoal (custo homem-hora) para a avaliação do escalonamento dos volumes reacionais. Os custos com os insumos foram utilizados na avaliação da otimização dos processos de purificação. Para a análise do custo total o processo, considerou-se o somatório dos valores anteriores. 158

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estrutura química dos polissacarídeos encontrados nos grupos mais frequentemente relacionados com a doença meningocócica. Adaptado de LEMERCINIER e JONES (1996).....	12
Tabela 2: Vacinas meningocócicas polissacarídicas licenciadas. Adaptado de GRANOFF <i>et al.</i> (2012).	33
Tabela 3: Vacinas meningocócicas conjugadas licenciadas. Adaptado de GRANOFF <i>et al.</i> (2012).	39
Tabela 4: Taxas de incidência da doença meningocócica no Brasil, antes e após a introdução da vacina conjugada contra o meningococo C. Adaptado de SÁFADI <i>et al.</i> (2014).....	43
Tabela 5: Valores obtidos para o fluxo de filtrado em função do aumento da TMP durante o experimento de otimização do processo de purificação do MPCO no sistema de filtração tangencial Centramate (Pall Corporation).	117
Tabela 6: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo de produção do MPCO na escala piloto.	118
Tabela 7: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo de produção do MPCO na escala industrial.	119
Tabela 8: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo de produção da MATT na escala piloto.	122
Tabela 9: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo de produção da MATT na escala industrial.	122
Tabela 10: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo produção da MATT na escala industrial utilizando o sistema de filtração tangencial Centramate (Pall Corporation).	124
Tabela 11: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo de produção do MPCT na escala piloto.	126
Tabela 12: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo de produção do MPCT na escala industrial.	127
Tabela 13: Valores de Kav calculados para os lotes de MPCO, MATT e MPCT mostrados na Figura 38.	131
Tabela 14: Teor de MPCO livre determinado pela análise por CZE de alguns lotes de MPCT obtidos na escala piloto e na escala industrial	134
Tabela 15: Valores médios de pH, concentração de PS e Ptn obtidos para todos os lotes de conjugado mantidos nas diferentes temperaturas de incubação.	138
Tabela 16: Títulos de IgG total e anticorpos bactericidas (SBA) em soro de animais imunizados com os lotes de MPCT. Os níveis de anticorpos séricos obtidos após a imunização dos camundongos com os lotes de conjugados estocados na temperatura controle foram comparados com os títulos obtidos após a imunização com os lotes mantidos nas temperaturas elevadas (37 °C e 55 °C).	149

Lista de Siglas

¹H RMN 1D: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

BPC: Boas Práticas Clínicas

BPF: Boas Práticas de Fabricação

BSA: Albumina Sérica Bovina

CRM₁₉₇: Variante Atóxica da Toxina Diftérica

CZE: Eletroforese Capilar de Zona Livre

DF: Diafiltração

DP: Diferença de Pressão

EDAC: *N*-etil-*N*'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

F_{max}: Fluorescência máxima

IFA: Ingrediente Farmacêutico Ativo

IgG: Imunoglobulina Classe G

IgM: Imunoglobulina Classe M

MATT: Proteína Tetânica Ativada

MenC: *Neisseria meningitidis* grupo C

MenPSC: Polissacarídeo C Nativo

MF: Microfiltração

MHC II: Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II

MPCO: Polissacarídeo C Oxidado

MPCT: Polissacarídeo C conjugado à Proteína Tetânica Ativada

NANA: Ácido *N*-acetil Neuramínico

NFF: Filtração com Fluxo Normal

OMP: Proteínas de Membrana Externa

OMS: Organização Mundial da Saúde

PS/Ptn: Razão entre a concentração de polissacarídeo e proteína

PSA: Polissacarídeo Meningocócico A

PSC: Polissacarídeo Meningocócico C

PSM: Processos de Separação com Membranas

SEC: Cromatografia de Exclusão e Filtração Molecular

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TA: Temperatura Ambiente

TFF: Filtração com Fluxo Tangencial

TMP: Pressão Transmembrana

TT: Anatoxina Tetânica

UF: Ultrafiltração

WFI: Água para injetáveis

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo Geral	8
2.2 Objetivos Específicos	8
3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	9
3.1 A DOENÇA MENINGOCÓCICA	9
3.1.1 Um breve histórico	14
3.1.2 Distribuição pelo mundo	18
3.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA ANTÍGENOS POLISSACARÍDICOS	24
3.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA ANTÍGENOS POLISSACARÍDICOS CONJUGADOS	26
3.4 VACINAS CONTRA OS MENINGOCOCOS	30
3.4.1 Vacinas polissacarídicas	31
3.4.2 Vacinas conjugadas	35
3.5 MÉTODOS DE CONJUGAÇÃO	44
3.6 VACINAS MENINGOCÓCICAS LICENCIADAS	50
3.7 PROTEÍNAS CARREADORAS	51
3.8 CONJUGAÇÃO UTILIZANDO HIDRAZINA	52
3.9 CARACTERÍSTICAS DO PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DE VACINAS	54
3.10 ESCALONAMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE VACINAS CONJUGADAS UTILIZANDO PERMEAÇÃO EM MEMBRANAS	60
3.11 CONTROLE DA PRODUÇÃO DE VACINAS CONJUGADAS	73
3.12 – ESTUDO DE TERMOESTABILIDADE DE VACINAS	74
3.13 – ECONOMIA DE ESCALA E ANÁLISE DE CUSTOS	77
4 METODOLOGIA	84
4.1 OBTENÇÃO DOS COMPONENTES	86
4.1.1 Polissacarídeo meningocócico C nativo	86
4.1.2 Anatoxina Tetânica	86
4.2 REAÇÕES QUÍMICAS	86
4.2.1 Reação de oxidação do MenPSC	86
4.2.2 Reação de ativação da anatoxina tetânica	88
4.2.3 Reação de conjugação entre MPCO e MATT	90
4.3 PROCESSO DE PURIFICAÇÃO	92
4.3.1 Purificação do MPCO	92
4.3.1.1. Concentração e Purificação na escala piloto	92
4.3.1.2. Concentração e Purificação na escala industrial.	95

4.3.2 Purificação da MATT.....	97
4.3.2.1. Concentração e purificação na escala piloto.....	97
4.3.2.2. Concentração e purificação em escala industrial.....	98
4.3.2.3. Otimização da etapa de concentração e purificação em escala industrial.....	99
4.3.3 Purificação do MPCT.....	101
4.3.3.1. Purificação e concentração na escala piloto.....	101
4.3.3.2. Purificação e concentração em escala industrial.....	103
4.4 ANÁLISES QUÍMICAS.....	106
4.4.1 Determinação da concentração de ácido <i>N</i> -acetilneuramínico (NANA).....	106
4.4.2 Determinação da concentração de proteína.....	106
4.4.3 Cálculo da razão PS/Ptn.....	106
4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	106
4.5.1 Cromatografia de exclusão e filtração molecular - SEC.....	106
4.5.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio - ¹ H-RMN 1-D.....	107
4.5.3 Eletroforese capilar de zona - CZE.....	107
4.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS LOTES PRODUZIDOS NA ESCALA PILOTO E NA ESCALA INDUSTRIAL.....	108
4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE TÉRMICA DOS LOTES DE MPCT OBTIDOS NA ESCALA INDUSTRIAL.....	109
4.7.1 Obtenção do Ingrediente Farmacêutico Ativo - IFA.....	109
4.7.2 Desenho do estudo.....	109
4.7.3 Determinação da concentração de polissacarídeo e proteína.....	109
4.7.4 Determinação do pH.....	109
4.7.5 Espectroscopia de fluorescência e Dicroísmo circular.....	110
4.7.6 Análises físico-químicas: SEC; ¹ H-RMN 1-D e CZE.....	110
4.7.7 Ensaios imunológicos.....	111
4.7.7.1. Imunização dos animais.....	111
4.7.7.2. Ensaio de ELISA.....	111
4.7.7.3. Ensaio bactericida.....	112
4.7.8 Análise estatística.....	113
4.8 ANÁLISE COMPARATIVA DE CUSTOS DE PRODUÇÃO DE LOTES NAS ESCALAS PILOTO E INDUSTRIAL.....	114
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
5.1 Obtenção do MPCO.....	116
5.2 Obtenção da MATT.....	121
5.3 Obtenção do MPCT.....	125
5.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	129

5.4.1 Cromatografia de exclusão e filtração molecular – SEC.....	129
5.4.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio - ¹ H-RMN 1-D.....	131
5.4.3 Eletroforese capilar de zona - CZE.....	133
5.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE TÉRMICA DOS LOTES DE MPCT OBTIDOS NA ESCALA INDUSTRIAL.....	137
5.5.1 Avaliação do pH, teor de PS e Ptn.....	137
5.5.2 Espectroscopia de fluorescência e de dicroísmo circular.....	138
5.5.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio - ¹ H-RMN 1-D.....	142
5.5.4 Cromatografia de exclusão e filtração molecular - SEC.....	144
5.5.5 Eletroforese capilar de zona - CZE.....	146
5.5.6 Ensaio imunológicos.....	147
5.6 ANÁLISE COMPARATIVA DE CUSTOS DE PRODUÇÃO.....	153
6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	162
Conclusões.....	162
Sugestões para trabalhos futuros.....	164
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	165
ANEXOS.....	185
ANEXO 1 – ARTIGO.....	186
ANEXO 2 – PATENTE.....	194

1 INTRODUÇÃO

A infecção invasiva causada pela *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), um diplococo gram-negativo, aeróbio, imóvel, pertencente à família *Neisseriaceae*, resulta em amplo espectro clínico de doença meningocócica que inclui a meningite, a meningococemia ou ambas, sendo a meningite a forma clínica mais frequentemente observada. A bactéria apresenta uma membrana externa cercada pela cápsula polissacarídica, cuja característica química e antigênica serve de base para sua classificação em 13 diferentes grupos (A, B, C, E-29, H, I, K, L, M, W135, X, Y, Z), dentre os quais os grupos A, B, C, Y, W135 e X são responsáveis por mais de 90% dos casos de meningite e septicemia graves (SCHAFFNER *et al.*, 2004; POLLARD *et al.*, 2009; HARRISON *et al.*, 2009; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência, uma vez que apenas as bactérias que expressam a cápsula podem invadir o trato respiratório do hospedeiro e potencialmente provocar doença. A bactéria infecta somente os humanos, ou seja, não existem animais como reservatórios (TAN *et al.*, 2010; MAIDEN, 2013).

A colonização assintomática da nasofaringe pela *N. meningitidis* caracteriza o estado de portador, constituindo-se no foco a partir do qual a bactéria pode ser transmitida. Estima-se que cerca de 10% a 35 % da população mundial é constituída de portadores (GIRARD *et al.*, 2006; HARRISON, 2010; HILL *et al.*, 2010). Comparado com o estado de portador, um número muito menor de indivíduos desenvolve a doença meningocócica, sendo que ainda não estão totalmente esclarecidos os fatores que levam um indivíduo portador a desenvolver a doença. Acredita-se que a combinação entre os fatores de virulência da bactéria e a susceptibilidade do hospedeiro pode levar à doença meningocócica. Dentre os fatores relativos ao hospedeiro, citam-se: idade, presença de infecção viral prévia, tabagismo, além do polimorfismo genético relativo aos componentes das três principais vias que atuam conjuntamente para eliminar a bactéria, a saber: o sistema complemento, a resposta inflamatória e a cascata de coagulação juntamente com o sistema de fibrinólise (SCHAFFNER *et al.*, 2004; HILL *et al.*, 2010; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015).

O grupo A é o principal causador de grandes epidemias, particularmente na região da África subsaariana, conhecida como “cinturão da meningite” que compreende regiões situadas entre o

Senegal, a oeste, até a Etiópia, a leste, onde os surtos ocorrem em intervalos de 7 a 14 anos com elevadas taxas de morbidade e mortalidade entre crianças e adultos jovens. Surtos relacionados com o grupo X também têm sido relatados nesta região (BRÖKER e VEITCH, 2010; BORROW, 2012; AGUADO *et al.*, 2015; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). Ultimamente, o grupo W135 também tem causado surtos na região do cinturão da meningite, bem como na Arábia Saudita, enquanto os grupos B e C são responsáveis pela maioria dos casos da doença na Europa, Austrália e Nova Zelândia (IBARZ-PAVÓN *et al.*, 2012), com mais de 50% dos casos sendo causados pelo grupo B (SÁFADI e CINTRA, 2010). Nos Estados Unidos, a maioria dos casos é causada pelos grupos B, C e Y (IBARZ-PAVÓN *et al.*, 2012). Desde 2009 tem sido observado o aumento das taxas da doença meningocócica causada pelo grupo Y em alguns países europeus (BORROW, 2012).

No Brasil, a doença meningocócica é endêmica, com casos esporádicos durante todo o ano. A maior epidemia da doença no país foi registrada na década de 70 do século passado, o que permitiu a primeira experiência com a produção em grande escala das vacinas polissacarídicas A e C (SAFADI *et al.*, 2013; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). Atualmente, os grupos B e C são responsáveis por mais de 80% dos casos de doença meningocócica no país (SÁFADI e CINTRA, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE / SVS, 2015), o que justifica o desenvolvimento brasileiro de vacinas contra estes grupos. Durante os surtos recentes no Brasil, a maioria deles associados com o grupo C, observou-se uma mudança na distribuição etária da doença meningocócica, com aumento do número de casos diagnosticados entre adolescentes e adultos jovens (HARRISON *et al.*, 2011; DE MORAES *et al.*, 2015; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). Atualmente, a incidência da doença é de 1 a 2 casos por 100.000 habitantes e a letalidade de 10 a 20% (SINAN/CVE 2011), onde o grupo B é responsável por 25,2% dos casos de doença meningocócica e o grupo C por 60,2% dos casos que são notificados. Os grupos W135 e Y representam 10,6 e 2,2% dos casos isolados, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE / SVS, 2015).

Motivado pelo quadro epidemiológico brasileiro e pela grande experiência na área de vacinas polissacarídicas contra os meningococos, Bio-Manguinhos / Fiocruz vem desenvolvendo uma nova vacina meningocócica C conjugada (SILVEIRA *et al.*, 2007). Tal vacina é obtida a partir de um método modificado de aminação redutiva, no qual, em uma etapa prévia à reação de

conjugação com o polissacarídeo meningocócico C ativado, ocorre a reação da anatoxina tetânica com o cloridrato de hidrazina resultando na introdução de grupamentos hidrazida no carreador proteico (SILVEIRA *et al.*, 2007; GUDLAVALLETI *et al.*, 2007; LEE, C.H, 2009; LEE, C.H e FRASCH, C.E., 2011; JESSOUROUN *et al.*, 2015). Em 2009 e em 2011 foram realizados estudos clínicos de Fase I em adultos e de Fase II em crianças de 1 a 9 anos, respectivamente (MARTINS *et al.*, 2010; ENGSTRON *et al.*, 2012). Os resultados destes estudos demonstraram que a nova vacina conjugada é segura e apresenta boa imunogenicidade, indicando que deveria ser submetida a estudos clínicos de Fase II/III com um número maior de voluntários na faixa etária entre lactentes e 19 anos. Tais resultados justificariam a necessidade iminente da produção de lotes de consistência em escala industrial, objetivando o seu licenciamento. Entretanto, em função das alterações introduzidas no processo de produção da vacina, foi necessário realizar em 2014, um novo estudo clínico de Fase I com o objetivo de avaliar se tais alterações seriam capazes de provocar aumento da reatogenicidade e os resultados demonstraram ausência de eventos adversos importantes. Vale ressaltar que todos os estudos clínicos foram realizados utilizando-se, concomitantemente, a vacina comercial (Neisvac-C[®]) produzida pela empresa Baxter (atual Pfizer).

Os principais desafios para a produção de vacinas em escala industrial são garantir que o processo seja escalonável e que a vacina induza resposta clínica idêntica àquela obtida na escala piloto. O escalonamento pode ser definido como a consolidação de um processo em grande escala com base nos resultados obtidos a partir dos experimentos em equipamentos de pequena escala, sendo um passo importante no desenvolvimento de processos industriais e que pode apresentar muitas dificuldades. É importante reconhecer que as técnicas que funcionam bem em escala de laboratório podem não ser uma escolha apropriada para a produção em grande escala, assim, o processo produtivo deve ser concebido para satisfazer todas as exigências para a industrialização e comercialização da vacina (BUCKLAND, 2005; BAART *et al.*, 2007).

Durante o processo de produção das vacinas conjugadas utiliza-se um grande número de reagentes químicos. Após a reação de conjugação, os reagentes residuais, bem como os componentes não conjugados devem ser removidos, de forma a garantir a ausência de compostos capazes de causar reações indesejáveis “in vivo” (WHO, 2004). Os processos de separação com membranas (PSM) representam uma classe de operações de separação com aplicações nas

indústrias química, farmacêutica e de alimentos e também no tratamento e purificação de águas. Dentre as principais vantagens inerentes a esta tecnologia podem ser destacadas: a alta seletividade; a simplicidade de aplicação, operação e escalonamento; a possibilidade de separação de componentes sem a necessidade de utilização de altas temperaturas, além de menor gasto energético (HABERT *et al.*, 2006). Neste sentido, a ultrafiltração (UF) tornou-se o método de escolha para a concentração de proteínas bem como para a troca de solventes, substituindo com vantagens a cromatografia de exclusão e filtração molecular nestas aplicações. Os sistemas de UF são capazes de realizar a diafiltração (DF), para a “limpeza” e concentração do produto de interesse, no mesmo sistema, o que significa redução nos custos e economia de tempo de processo além de minimizar as perdas e os riscos com a manipulação do produto. Os recentes avanços no desenho das membranas de UF puderam proporcionar um aumento nos fatores de concentração e, conseqüentemente, um aumento no rendimento final do produto. Soma-se a isso, a capacidade de escalonamento linear apresentado pelos sistemas de UF, desde que se proceda a algumas adaptações e se mantenha constantes as pressões de operação (VAN REIS e ZYDNEY, 2001).

A produção de vacinas em grande escala normalmente envolve métodos de produção complexos e requer rígido controle de qualidade. Este deve ser realizado em todas as fases do processo e estar baseado em três pontos principais: a) o controle dos insumos; b) o controle do processo produtivo e c) o controle do produto final. Com o desenvolvimento das vacinas conjugadas, houve um aumento da complexidade dos mecanismos necessários para assegurar a inocuidade e eficácia do produto final, o que resultou no rápido desenvolvimento e aprimoramento dos métodos físico-químicos para a purificação e a caracterização dos antígenos tais como proteínas e polissacarídeos (SMITH *et al.*, 2001; DELLEPIANE *et al.*, 2000).

Todos os métodos de conjugação utilizados atualmente envolvem processos com múltiplos estágios, iniciando com a modificação química do polissacarídeo previamente à conjugação com a proteína carreadora. O grau de modificação empregado na molécula de polissacarídeo antes da conjugação deve ser rigidamente monitorado, como parte do controle em processo, a fim de garantir a reprodutibilidade do produto final (WHO, 2004). Da mesma forma, o processo de conjugação deve ser acompanhado pela análise do principal produto de reação, ou seja, o glicoconjugado. Assim, após a devida purificação, deve ser realizada uma série de testes cuja

finalidade é garantir a consistência dos lotes obtidos. A técnica de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) pode ser utilizada para confirmar a identidade e integridade do polissacarídeo na molécula conjugada. Além disso, a quantidade do polissacarídeo bem como da proteína presentes no glicoconjugado deve ser determinada através de métodos validados, que podem ser métodos de dosagem química, ou físico-química. A partir dessas quantificações é possível determinar a razão entre as concentrações de polissacarídeo e proteína (PS/Ptn) da molécula conjugada que fornece uma medida indireta da extensão da conjugação (JOSHI *et al.*, 2009).

A estabilidade química de produtos farmacêuticos é um assunto de grande preocupação, uma vez que afeta a segurança e a eficácia do produto final. No caso de produtos biológicos / biotecnológicos cujos componentes ativos são principalmente proteínas e / ou polipeptídeos, a manutenção da conformação molecular e, conseqüentemente, da atividade biológica é dependente da estabilidade de ligações covalentes e também de forças não covalentes. Tais produtos são particularmente sensíveis aos fatores do meio ambiente, como mudanças na temperatura, reações de oxidação, incidência da luz e força iônica do meio (KUMRU *et al.*, 2014). Assim, para evitar a degradação e garantir a manutenção da atividade biológica, devem ser armazenados sob condições rigorosamente controladas (ICH, 1995).

Os testes de estabilidade de vacinas têm como objetivo principal a verificação da mudança de alguma propriedade capaz de afetar direta ou indiretamente a sua imunogenicidade ou eficácia. Eles devem ser realizados continuamente ao longo do ciclo de vida da vacina. Esses estudos podem incluir tanto a exposição da vacina na faixa de temperatura recomendada de armazenamento - estudos de estabilidade em tempo real ou em temperaturas mais elevadas do que as recomendadas para o armazenamento - estudos de estabilidade acelerada.

Os testes de degradação forçada, nos quais o produto é submetido a condições ambientais, como luz ou temperaturas extremas ajudam a determinar de forma mais rápida a estabilidade intrínseca da vacina, possibilitando a identificação dos prováveis produtos e vias de degradação e, conseqüentemente, a determinação dos procedimentos analíticos capazes de sinalizar a manutenção ou não da estabilidade e, possivelmente serem relacionados com os testes de potência do produto (WHO, 2006).

De modo geral, não existe um único ensaio ou parâmetro capaz de caracterizar a estabilidade de um produto biotecnológico / biológico. Portanto, deve ser proposto um perfil de estabilidade para assegurar a detecção de eventuais alterações estruturais do produto, bem como em sua homogeneidade e potência (ICH, 1995). Os métodos de análises físico-químicas têm sido amplamente utilizados para determinar a integridade estrutural, a consistência e para controlar a qualidade das vacinas conjugadas. Estes métodos proporcionam um meio sensível de detecção de alterações induzidas na vacina por exposição a condições ambientais adversas que podem influenciar as propriedades imunológicas dos conjugados. Além disso, também podem ser utilizados para identificar a necessidade da realização dos testes biológicos (HO *et al.*, 2002; GAO *et al.*, 2014).

O fato das vacinas possuírem atividade biológica específica que não pode ser totalmente caracterizada somente através da utilização de métodos físico-químicos é a principal dificuldade para a determinação da sua estabilidade. Neste sentido, os ensaios biológicos, como por exemplo, os ensaios de potência baseados em testes de desafio “in vivo”, são essenciais para o estabelecimento dos parâmetros de controle de qualidade. Entretanto, a variabilidade inerente aos testes biológicos torna difícil estabelecer de maneira contundente o perfil de degradação de vacinas, a menos que as mudanças observadas sejam substanciais (GALAZKA *et al.*, 1998). Neste sentido, a utilização de métodos físico-químicos, bioquímicos ou imunoquímicos apropriados possibilita a caracterização do produto, bem como a detecção precisa das alterações causadas pela degradação durante a estocagem (ICH, 1995). Neste trabalho estudou-se o perfil de estabilidade térmica da molécula conjugada obtida na escala industrial quando submetida a diferentes temperaturas de estocagem, incluindo a temperatura recomendada. Buscou-se correlacionar as eventuais alterações observadas através da utilização de métodos físico-químicos com a resposta imunológica induzida pela molécula em camundongos, utilizando-se ensaios biológicos “in vitro”.

Há alguns anos pouca atenção era dada aos custos associados ao processo de produção de produtos farmacêuticos. No entanto, esta dinâmica mudou drasticamente na medida em que o aumento da concorrência e as políticas de controle de preços forçaram a redução do valor dos produtos ofertados ao mercado, ao mesmo tempo em que os custos de produção aumentaram (CURLING *et al.*, 2004). Neste sentido, como o custo médio para a produção e comercialização

de produtos biotecnológicos é alto, as empresas têm utilizado a análise econômica como uma ferramenta, durante o desenvolvimento do processo, capaz de auxiliar na tomada de decisões que privilegiem a execução de processos otimizados, robustos e com custos reduzidos (RATHORE *et al.*, 2006; ERICKSON *et al.*, 2012).

As quantidades de bens e/ou serviços produzidos por uma empresa geralmente diferem de acordo com o setor em que está inserida, desse modo, torna-se essencial considerar economias de escala na análise de custos para formular uma estratégia competitiva. Por definição, economias de escala são reduções no custo médio geradas pelo aumento da escala de produção, ou seja, diz-se que há economia de escala quando o aumento do volume da produção de um bem por dado período de tempo reduz os seus custos. O principal desafio da produção é combinar recursos produtivos para atender à demanda com custo mínimo (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Do ponto de vista econômico, custo é tudo o que se gasta para se obter um bem ou um serviço (BIASIO, 2012). A utilização da análise de custos dentro das empresas está no escopo gerencial, portanto, é necessário que haja entendimento a respeito da formação do custo de todos os recursos, sua relação com as atividades e/ou produtos e serviços finais, o fluxo contábil dos valores obtidos, bem como os próprios conceitos de valores possíveis para custeamento (MARTINS, 2003; PADOVEZE, 2006). Neste sentido, os métodos de custeio são ferramentas importantes para a geração de informações relevantes para a tomada de decisões. Em linhas gerais, permitem definir os gastos que devem fazer parte da apuração do custo unitário dos produtos e serviços finais, ou seja, a metodologia a ser utilizada (DIAS, 2007; ABBAS *et al.*, 2012) que deve ser compatível com os objetivos e as características da organização, já que são os gestores, de posse das informações geradas pelo método aplicado, que decidem sobre as ações a serem tomadas no sentido de privilegiar os processos mais robustos e economicamente viáveis (ABBAS *et al.*, 2012).

Levando em consideração o que foi comentado no parágrafo anterior, nesta tese de doutorado foi realizada a análise comparativa entre os custos do processo de obtenção da nova vacina meningocócica C conjugada, nas escalas piloto e industrial. A avaliação foi feita com base nos conceitos teóricos de contabilidade de custos, como forma de identificar a existência de economia de escala e, conseqüentemente, a viabilidade econômica da transposição da escala produtiva.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver uma metodologia para a obtenção do antígeno vacinal da vacina meningocócica C conjugada em escala industrial, a partir de dados da escala piloto, incluindo as etapas de reação e purificação por filtração tangencial dos processos de oxidação do polissacarídeo C; ativação da anatoxina tetânica e conjugação entre o polissacarídeo C oxidado e a proteína tetânica ativada.

2.2 Objetivos Específicos

- Reavaliar os parâmetros de purificação dos componentes intermediários e do conjugado, visando o aumento da escala produtiva;
- Empregar métodos de controle físico-químicos para a análise dos produtos intermediários e dos conjugados obtidos em ambas as escalas de produção;
- Comparar as características físico-químicas das moléculas obtidas tanto na escala piloto como na escala industrial;
- Avaliar o perfil de estabilidade térmica da molécula conjugada obtida na escala industrial através do emprego de métodos físico-químicos, buscando correlacionar as eventuais alterações estruturais observadas com a resposta obtida em testes biológicos;
- Avaliar a viabilidade econômica do aumento da escala produtiva.

3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3.1 A DOENÇA MENINGOCÓCICA

A meningite, de uma maneira geral, é uma infecção que acomete o sistema nervoso central (SNC), mais especificamente o espaço subaracnóideo e as membranas leptomeníngeas (aracnóide e pia-máter), levando a manifestações neurológicas e alterações sistêmicas. A meningite está relacionada a uma série de complicações tanto imediatas quanto tardias, que podem culminar com danos irreversíveis ao SNC ou, até mesmo, levar a óbito. Essa doença pode apresentar etiologias infecciosas (viral, bacteriana, fúngica) ou não infecciosas (traumática, por exemplo). As meningites virais e bacterianas são as mais importantes do ponto de vista da saúde pública, pela sua magnitude e capacidade de ocasionar surtos, sendo que a meningite bacteriana é responsável por elevada morbidade e mortalidade em crianças, a despeito dos recentes avanços nos métodos diagnósticos, no tratamento antimicrobiano e de suporte, na monitorização e nos métodos profiláticos. Por sua importância, gravidade e alto potencial de causar epidemias, a meningite bacteriana é uma doença de notificação compulsória e investigação obrigatória (GONÇALVES *et al.*, 2014).

As bactérias encapsuladas *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) e *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) são constantemente associadas a casos de meningite, pneumonia, otite, bronquite e conjuntivite. A meningite é a forma mais grave de infecção causada por estas espécies bacterianas, acometendo, principalmente, crianças de até dois anos de idade (VAN DE BEEK *et al.*, 2005; REQUEJO, 2005). Apesar de não serem geneticamente relacionadas entre si, essas bactérias compartilham outras características além da capacidade de causarem doenças semelhantes. Todas são membros, normalmente, inofensivos da microbiota da nasofaringe e da orofaringe humana, transmitidos de pessoa para pessoa e sem reservatório animal conhecido. Em sua maioria, apresentam cápsula polissacarídica com uma variedade de formas antígenicamente distintas, podendo, inclusive, assemelhar-se a polissacarídeos encontrados em células de humanos, o que faz com que não sejam reconhecidos pelo sistema imunológico. A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência, uma vez que apenas as bactérias que expressam este antígeno têm o potencial de provocar doença. A principal razão para isso é que algumas cápsulas polissacarídicas têm ação anti-opsonizante,

permitindo que as bactérias escapem da ação do sistema imunológico (AVCI e KASPER, 2010; GASPARINI *et al.*, 2015). Uma vez que invadem os tecidos do hospedeiro, estes organismos podem multiplicar-se rapidamente e de forma sistêmica, o que caracteriza a bacteremia, infectando outros locais como as meninges e o líquido cérebro-espinhal (MAIDEN, 2013).

Apesar do desenvolvimento contínuo de novos agentes antibacterianos, as taxas de mortalidade por meningite bacteriana permanecem elevadas. Em muitos países a introdução da vacina conjugada contra o Hib na imunização de rotina praticamente eliminou os casos de doença invasiva causada por essa bactéria, assim como a introdução da vacinação com a vacina pneumocócica conjugada heptavalente, que promoveu a redução da incidência dos casos da doença relacionados com os sorotipos presentes na vacina, muito embora estima-se que entre 800.000 a 1 milhão de crianças menores de 5 anos de idade morrem anualmente de doença causada por *S. pneumoniae* (GREENHILL *et al.*, 2015). Desse modo, *N. meningitidis* é agora considerada como a principal causa de meningite bacteriana em muitas regiões do mundo, sendo responsável por cerca de 1,2 milhões de casos de meningite bacteriana e sepse no mundo a cada ano (CEYHAN *et al.*, 2014).

N. meningitidis é um patógeno comensal que coloniza, na maioria das vezes, de forma assintomática, o trato respiratório superior dos humanos. A bactéria (Figura 1) se apresenta na forma de cocos Gram negativo, oval, ocorrendo normalmente em pares, com os lados adjacentes achatados ou côncavos e é classificada em 13 diferentes grupos (A, B, C, E-29, H, I, K, L, M, W135, X, Y, Z), com base nas diferenças estruturais da cápsula polissacarídica, sendo que, apenas seis grupos: A, B, C, Y, W135 e X estão relacionados com a maioria dos casos de infecção invasiva causados por esta bactéria (POLLARD *et al.*, 2009; SCHAFFNER *et al.*, HARRISON *et al.*, 2009; CUCCUI e WREN, 2014; TAN *et al.*, 2016).

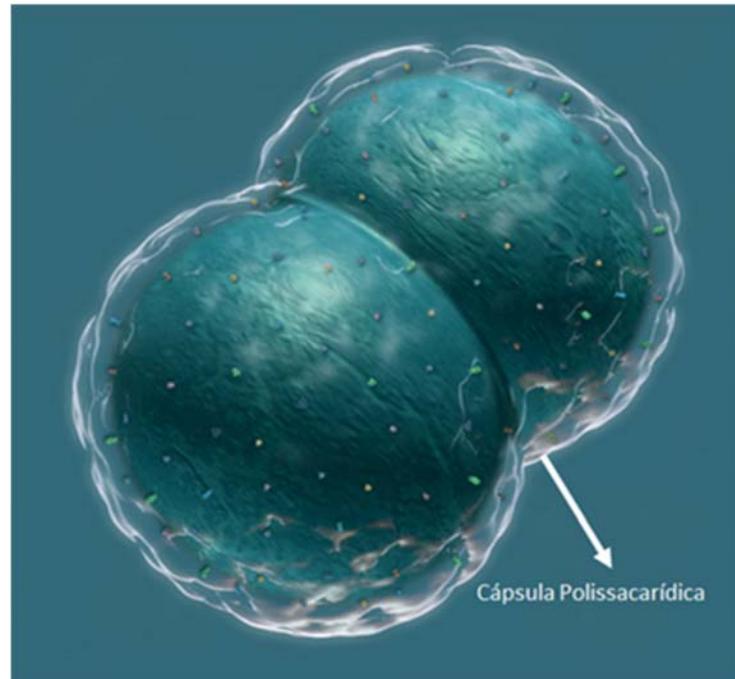


Figura 1: *N. meningitidis*. http://www.novartisvaccines.com/images/products-diseases/meningococcal-disease/bexsero/Meningitis_bacteria.jpg acesso em 29 de novembro de 2014)

As cápsulas polissacarídicas dos diferentes grupos relacionados com a doença meningocócica apresentam estrutura química e propriedades antigênicas distintas (Tabela 1). Juntamente com o lipopolissacarídeo (LPS), a cápsula constitui o principal fator de virulência da bactéria (GASPARINI *et al.*, 2015). O grupo A apresenta cápsula composta de unidades de *N*-acetilmanosamina-1-fosfato, enquanto os grupos B, C, Y e W135 são constituídos por unidades de ácido *N*-acetil neuramínico (NANA), um tipo de ácido siálico. Os grupos Y e W135 apresentam o ácido siálico ligado à glicose ou galactose, respectivamente e o polissacarídeo do grupo X consiste de um homopolímero de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose ligados por ligação fosfodiéster α -(1→4) (BUNDLER *et al.*, 1974). As cápsulas dos grupos B e C são constituídas por homopolímeros de NANA unidos por ligação α -(2→8) ou α -(2→9), respectivamente. A cápsula do grupo C pode ser tanto *N*-acetilada como *O*-acetilada, enquanto a do grupo B apresenta-se *N*-acetilada (LIU *et al.*, 1971). O fato da cápsula do grupo B apresentar homopolímeros de NANA unidos por ligação α -(2→8) é suficiente para caracterizá-la como não

munogênica, uma vez que a semelhança de sua estrutura conformacional com moléculas de adesão das células nervosas presentes em tecido cerebral de fetos humanos faz com que não seja reconhecida como um componente estranho ao sistema imunológico. Esse mimetismo molecular induz a sua rápida despolimerização pela neuraminidase nos tecidos (REQUEJO, 1997; AVCI e KASPER, 2010; HILL *et al.*, 2015; GASPARINI *et al.*, 2015).

Tabela 1: Estrutura química dos polissacarídeos encontrados nos grupos mais frequentemente relacionados com a doença meningocócica. Adaptado de LEMERCINIER e JONES (1996).

Grupo	Unidade	Ligação	Localização do O-acetil
A	$\rightarrow 6\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Man-}p\text{-Nac-1(PO}_4\rightarrow$	$\alpha\text{-(1}\rightarrow 6)$	C-3 de manosamina
B	$\rightarrow 8\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Neu-}p\text{-Nac-(2}\rightarrow$	$\alpha\text{-(2}\rightarrow 8)$	Ausente
C	$\rightarrow 9\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Neu-}p\text{-Nac-(2}\rightarrow$	$\alpha\text{-(2}\rightarrow 9)$	C-7 e C-8 do ácido siálico
Y	$\rightarrow 6\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Glc-}p\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Neu-}p\text{-Nac-2}\rightarrow$	$\alpha\text{-(2}\rightarrow 6)$	C-3 e C-4 da Glc; C-7 do ácido siálico
W135	$\rightarrow 6\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Gal-}p\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Neu-}p\text{-Nac-2}\rightarrow$	$\alpha\text{-(2}\rightarrow 6)$	Ausente
X	$4\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Glc-}p\text{-Nac-1(PO}_4\rightarrow$	$\alpha\text{-(1}\rightarrow 6)$	Ausente

A infecção invasiva causada pela *N. meningitidis* resulta em amplo espectro clínico de doença, denominada doença meningocócica, que inclui a meningite e a meningococemia, ou ambas, sendo a meningite a forma clínica mais frequentemente observada (SÁFADI e BARROS, 2006; TAN *et al.*, 2010; BORROW, 2012; MAIDEN, 2013).

As manifestações clínicas da doença podem ocorrer dentro de 1-14 dias após a infecção, sendo os sintomas iniciais muito similares aos de outras infecções bacterianas, o que dificulta a sua rápida identificação. A meningite ocorre em 50-70% dos casos e os sintomas característicos são: febre, dor de cabeça, fotofobia, rigidez na nuca, náuseas, vômitos e alteração do estado mental. Dentre

os sintomas menos frequentes estão: pneumonia, conjuntivite, otite média, epiglote, uretrite, pericardite, artrite. A pneumonia meningocócica acomete com maior frequência indivíduos idosos e imunocomprometidos. A meningococemia tem manifestação mais severa, caracterizando-se pela febre alta e pela presença de manchas vermelhas na pele (denominado “rash” purpúreo). Em cerca de 5 a 20% dos casos, os sintomas podem evoluir em poucas horas, resultando em sepse fulminante, sem que sejam observados os sintomas característicos da meningite (BECKA e CHACON-CRUZ, 2015).

A transmissão da *N. meningitidis* se dá através de aerossóis ou pelo contato com secreções respiratórias ou saliva, ou ainda por inalação de gotículas em aerossóis. A aquisição do meningococo pode ser transitória, levando à colonização assintomática ou resultar em doença invasiva (SÁFADI e CINTRA, 2010). Estima-se que, em situações não epidêmicas, cerca de 5-10% da população seja portadora do meningococo, sendo esta taxa fortemente relacionada com a faixa etária dos indivíduos, com maior prevalência na fase final da adolescência (20 – 50%) (HILL *et al.*, 2015; TAN *et al.*, 2016). Em um pequeno número dos portadores a bactéria pode penetrar a mucosa e alcançar a corrente sanguínea, causando doença sistêmica, contudo, na maioria dos casos o estado de portador promove a imunização do indivíduo, em função da produção sistêmica de anticorpos protetores (ROSENTEIN *et al.*, 2001, CUCCUI e WREN, 2014).

Estudos conduzidos na América do Norte e na Europa mostraram que o número de portadores é muito baixo durante os primeiros anos de vida, aumenta entre adolescentes e adultos jovens e decresce, novamente, na idade adulta (BORROW *et al.*, 2013; DE MORAES *et al.*, 2015). A alta prevalência de portadores entre os adolescentes apontada nestes estudos tem sido associada com o comportamento social dessa faixa etária. Um estudo recente, conduzido no Brasil com o objetivo de avaliar a prevalência de portadores assintomáticos entre os adolescentes com idade entre 11 e 19 anos, que frequentam escolas públicas e privadas em Campinas (SP), mostrou que a proporção de portadores foi significativamente maior entre os alunos de escolas públicas, com doença viral recente (semelhante à gripe), frequentadores de boates, relatando tabagismo passivo, que não foram vacinadas anteriormente e cujos pais tinham menor escolaridade. Este estudo também mostrou que em sua maioria os adolescentes eram portadores, especificamente, do meningococo C.

O número de portadores assintomáticos pode ser consideravelmente mais elevado em situações de surto, no caso de contato domiciliar com pessoas com a doença e em condições de confinamento e aglomeração, como por exemplo, em quartéis militares. Ainda não há um entendimento claro sobre a relação existente entre a incidência da doença meningocócica e o número de indivíduos portadores assintomáticos de uma população. O que se sabe é que, embora o estado de portador seja relativamente comum, a evolução para doença invasiva raramente acontece (DE MORAES *et al.*, 2015).

A doença meningocócica invasiva ocorre primariamente em pessoas suscetíveis, recentemente colonizadas por uma cepa patogênica, podendo acometer indivíduos de todas as faixas etárias. A taxa de mortalidade é de aproximadamente 5 – 10 % e cerca de 12 – 20 % dos sobreviventes adquirem sequelas graves como surdez, convulsões, paralisia e deficiência mental (ABIO *et al.*, 2013). Inúmeros fatores de risco têm sido associados a esta enfermidade, tais como: infecções respiratórias virais recentes (especialmente influenza), aglomerações domiciliares, residência em quartéis ou alojamentos de estudantes, tabagismo (passivo ou ativo), condições socioeconômicas menos privilegiadas e contato íntimo com portadores. O risco de desenvolver doença invasiva em familiares de um doente é de 500 a 800 vezes maior do que na população em geral (ROSENTEIN *et al.*, 2001; HILL *et al.*, 2010; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). Além disso, indivíduos com asplenia (anatômica ou funcional), deficiência de properdina, de C3 e de componentes terminais da cascata do complemento (C5 a C9) apresentam maior risco de episódios recorrentes de doença meningocócica, em função da incapacidade de provocar a lise da bactéria, sendo, portanto, considerados grupos prioritários para a profilaxia com vacinas (SÁFADI, 2014; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015).

3.1.1 Um breve histórico

A doença meningocócica é uma doença relativamente nova que foi observada pela primeira vez em 1805 na Europa, em 1806 na América do Norte, e 1905 na África (ABIO *et al.*, 2013). O primeiro relato clínico sobre a meningite meningocócica aconteceu há mais de dois séculos, em 1805, quando um surto epidêmico de “febre cérebro-espinhal” que acometeu dezenas de crianças foi relatado em Genebra, na Suíça pelo médico Gaspard Vieusseux (apud BORROW, 2012; REQUEJO, 2005; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). Nesta época, acreditava-se tratar de uma doença não contagiosa, sendo que a sua transmissibilidade se tornou conhecida somente no final

do século XIX. Por muitos anos não se conhecia o agente etiológico da doença. Somente em 1887 o médico alemão Anton Weichselbaum descobriu a bactéria que causava a meningite epidêmica e a chamou de *Diplococcus intracellularis*, o qual ficou conhecido como meningococo de Weichselbaum (apud REQUEJO, 2005; ABIO *et al.*, 2013; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). A partir do processo de colonização europeia na África e nas Américas, a meningite começou a ser relatada fora da Europa. No início do século XX, a meningite cérebro-espinhal epidêmica causava surtos nas populações civis que se acumulavam nos navios que cruzavam os oceanos. Dessa forma, ao desembarcarem nos diversos portos das Américas nos anos 1900, esses viajantes gravemente enfermos disseminavam a doença entre os colonos.

Em 1906, chegou ao Brasil o navio Provence, trazendo imigrantes de Portugal e Espanha. Ao desembarcarem no porto de Santos, havia entre os passageiros adultos e crianças acometidos da grave doença. As amostras de líquido cefalorraquidiano das crianças adoecidas no navio foram enviadas ao Instituto Bacteriológico de São Paulo, onde o Dr. Adolfo Lutz e o Dr. Teodoro Baima identificaram, pela primeira vez, os meningococos de Weichselbaum. Em 1915 foi desenvolvido o primeiro sistema de classificação dos isolados bacterianos em grupos numerados de I a IV. Este sistema foi posteriormente modificado, e a classificação dos isolados passou a ser realizada com base nas diferenças estruturais da cápsula polissacarídica que recobre a bactéria, sendo o método de classificação utilizado até os dias atuais (BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). Nas décadas de 1910 e 1920 ocorreram grandes surtos da meningite cérebro-espinhal em São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte e Curitiba (REQUEJO, 2005).

Na Europa, desde o início do século XX, já havia o tratamento soroterápico, com antissoros meningocócicos produzidos em cavalos, através de método rudimentar, no qual o paciente era inoculado por via intrarraquidiana. O tratamento foi instituído pelo médico patologista Simon Flexner do Instituto Rockefeller de Pesquisa Médica (BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). Embora relativamente útil na cura da meningite, a soroterapia provocava muitas vezes choques anafiláticos e infecções com outras bactérias contaminantes. No Brasil, a produção desse soro antimeningocócico foi introduzida em 1920 pelo Dr. Miguel Couto no Hospital São Sebastião no Rio de Janeiro. Na década de 1930, a soroterapia foi substituída pelas sulfonamidas, na Europa e também nas Américas. Esses antibióticos eram usados tanto na cura das meningites como no controle profilático de portadores assintomáticos de meningococos. Em 1926 Alexander

Flemming, na Inglaterra, descobriu a penicilina, mas, somente durante a Segunda Guerra Mundial (1938-1945), Howard Florey e Ernest Chain conseguiram produzir esse antibiótico em grande escala. Esse novo quimioterápico passou a ser então empregado na cura das meningites e de outras infecções bacterianas. No Brasil, a penicilina foi introduzida em São Paulo em 1947, sendo um grande avanço na cura e no controle da epidemia que ocorreu naquela época (REQUEJO, 2005; MAIDEN, 2013).

Dois grandes ciclos epidêmicos ocorreram em São Paulo e outras grandes capitais brasileiras, um na Primeira Guerra Mundial (1914-1918) e o outro na Segunda Guerra Mundial (1938- 1945). Essas grandes epidemias também ocorreram na Europa e demais continentes, nessa mesma época. Os surtos observados no exército britânico durante a Primeira Guerra Mundial levaram à realização dos primeiros estudos sobre a transmissão dos meningococos e sua relação com a manifestação da doença. Sabe-se que a maioria dos casos de doença meningocócica ocorre pouco depois de um indivíduo adquirir o meningococo, presumivelmente, como consequência de uma tentativa frustrada da bactéria em estabelecer a colonização. Durante a Segunda Guerra Mundial, as tentativas de conter a transmissão da doença, como por exemplo, mudando a distância entre as camas nos quartéis, não foram bem sucedidas e o problema da doença meningocócica, tanto entre os recrutas, como nas populações dos países combatentes tornou-se grave (REQUEJO, 2005; HOLS *et al.*, 2013; MAIDEN, 2013).

Os meningococos A e C já eram descritos mundialmente nessas epidemias. Passados os anos da Segunda Guerra, a meningite epidêmica passou à sua forma endêmica nos anos 1950 e 1960, tanto no Brasil como na maioria dos países da Europa e das Américas. Nos anos 1970 a doença, já com o nome de meningite meningocócica, voltou à sua forma epidêmica em todos os continentes. Grandes epidemias foram registradas em Portugal, Espanha, Grã-Bretanha, Finlândia e outros países europeus, e ainda na África, Ásia e Oceania. A grande epidemia em que os meningococos dos grupos A e C predominavam ocorreu em São Paulo, com focos também no Rio de Janeiro, Salvador e outras capitais. Neste período, foram produzidas as primeiras vacinas polissacarídicas contra esses meningococos e a vacinação maciça das populações reduziu a doença para níveis endêmicos. A partir dos anos 1980, vieram novos ciclos epidêmicos, com origem em focos provavelmente europeus, como por exemplo, França, Alemanha, República Tcheca e Noruega (ABIO *et al.*, 2013). Cepas de meningococos virulentos do grupo B

alastraram-se no Brasil, a partir de São Paulo, e também em diversos países norte e sul-americanos como Cuba, Canadá, Estados Unidos, Chile, Argentina. A dificuldade de se produzir uma vacina eficaz contra o meningococo B, devido ao antígeno dessa bactéria não ser imunogênico, faz com que a doença causada por este grupo venha se mantendo em níveis endêmicos, principalmente nas grandes capitais (REQUEJO, 2005).

Mesmo antes da descoberta do meningococo no início do século XIX, a septicemia meningocócica e a meningite eram doenças muito temidas. A doença meningocócica é classificada como uma doença grave e de evolução rápida, que pode se caracterizar por uma sintomatologia inicial leve e resultar em morte ou invalidez permanente. Assim, existe uma elevada preocupação com a possibilidade da ocorrência de uma epidemia ou doença esporádica repentina, causada por clones virulentos, passíveis de acometer indivíduos saudáveis. Antes da era dos antibióticos, a taxa de mortalidade era de 70 - 90%, mas nos últimos 50 anos, apesar do surgimento dos modernos antibióticos, o número de casos fatais ainda se mantém entre 5 e 15%, e os casos de invalidez permanente afetando 10 - 20% dos sobreviventes. Essas taxas de letalidade são um pouco maiores no caso de pacientes com septicemia, em situações epidêmicas e entre adolescentes e idosos. Apesar dos recém-nascidos e crianças com menos de cinco anos de idade serem mais comumente afetados pela doença meningocócica invasiva, observa-se um aumento no número de casos entre os adolescentes, especialmente durante as epidemias (HOLS *et al.*, 2013; ABIO *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2014).

Os meningococos são sensíveis a vários antibióticos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas (HILL *et al.*, 2010). Infelizmente, até os dias de hoje, apesar da disponibilidade de antibióticos e das campanhas de vacinação, a *N. meningitidis* continua sendo a principal causa de meningite e septicemia no mundo (BORROW, 2012). A Organização Mundial da Saúde estima que existam 1,2 milhões de casos de doença meningocócica e 135.000 mortes relacionadas anualmente (TAN *et al.*, 2010; JAFRI *et al.*, 2013). Os surtos têm característica cíclica, ou seja, ocorre um aumento progressivo da taxa de incidência, seguido de uma diminuição, igualmente progressiva e que pode durar décadas (IBARZ-PAVÓN *et al.*, 2012). Acredita-se que estas oscilações ocorram devido à suscetibilidade do hospedeiro e, possivelmente também devido à evolução e disseminação de cepas virulentas (HILL *et al.*, 2015). A doença, que de maneira geral é endêmica, ocorre durante todo o ano, com maior incidência

durante o inverno e o início da primavera, acometendo principalmente crianças e adolescentes, com taxas maiores entre lactentes (3 – 12 meses), o que está relacionado à queda dos títulos de anticorpos maternos adquiridos passivamente durante a gestação, enquanto nas epidemias meningocócicas, as taxas de incidência são maiores em crianças mais velhas e adultos jovens (ROSENTEIN *et al.*, 2001; WHO, 2002).

3.1.2 Distribuição pelo mundo

A doença meningocócica ocorre em todo o mundo, havendo, entretanto, marcantes diferenças geográficas na sua incidência e na distribuição de grupos causadores de doença (HEDARI *et al.*, 2014; OVIEDO-ORTA *et al.*, 2015) (Figura 2).

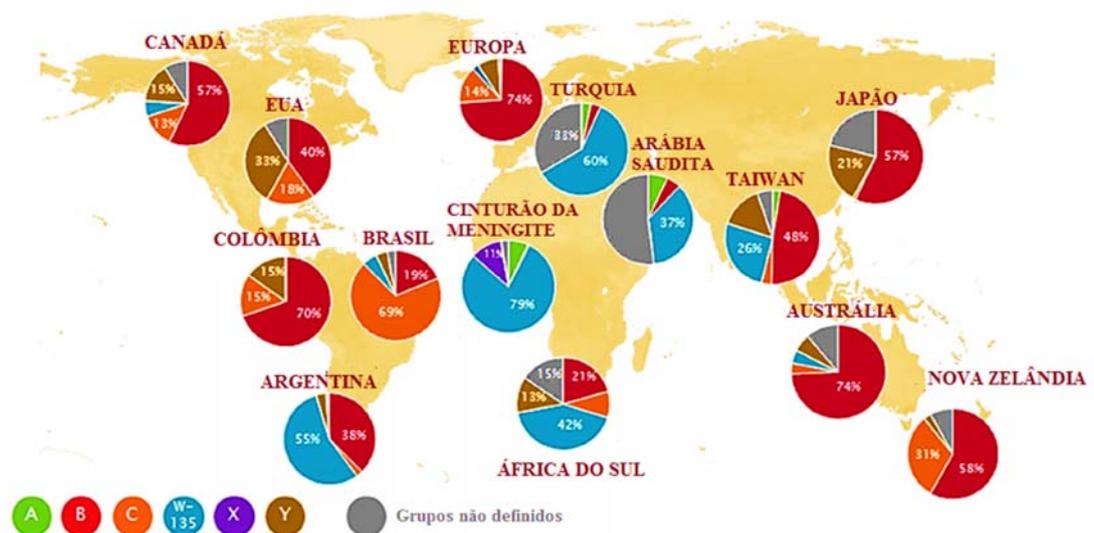


Figura 2: Distribuição global dos grupos de *N. meningitidis*. Adaptado de Oviedo-Orta *et al.* (2015)

Historicamente, o grupo A está associado à doença epidêmica na região da África subsaariana, conhecida como “cinturão da meningite” (Figura 3). A incidência anual de doença, durante essas epidemias, pode atingir valores tão altos como 1.200 casos por 100.000 habitantes, enquanto nos períodos endêmicos, a incidência é de 10 a 20 casos por 100.000 habitantes. Os grupos X, Y e

W135 também são responsáveis por elevada taxa da doença na África (SÁFADI E BARROS, 2006; GRANOFF *et al.*, 2012; ABIO *et al.*, 2013; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). Surto de doença meningocócica causada pelo grupo W135 ganharam destaque especial na Arábia Saudita, Burkina Faso e no Chad, durante a peregrinação do Hajj, entre os anos 2000 - 2001. O grupo X, que anteriormente estava associado a casos esporádicos de meningite, foi responsável pelos surtos ocorridos no Quênia, Niger, Togo, Uganda e Burkina Faso, entre 2006 e 2010 e tornou-se, mais recentemente, o grupo prevalente na região do cinturão da meningite (JAFRI *et al.*, 2013; CHILUKURI *et al.*, 2014; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). Vários fatores afetam a frequência de surtos na região. Dentre eles, citam-se os conflitos sociais, as condições econômicas, as limitações do sistema de saúde pública e os costumes da população, além das peregrinações anuais que acontecem na região, onde se concentra um grande número de pessoas, propiciando a transmissão da bactéria (BECKA e CHACON-CRUZ, 2015).



Figura 3: Cinturão da meningite na região da África subsaariana, que se estende desde a Etiópia até o Senegal (<http://www.menafricar.org/> - acesso em 28 de julho de 2013)

A maioria dos países asiáticos possui pouco ou nenhum dado epidemiológico disponível em relação à doença meningocócica. Apenas o Japão, Hong Kong, Coreia, Filipinas, Singapura, Tailândia e Taiwan possuem sistemas de vigilância para a doença, sendo sistemas de comunicação passiva. O grupo A tem sido relacionado com a maioria dos casos durante as epidemias na China, Bangladesh e na Índia, sendo o grupo B comumente responsável por casos esporádicos e endêmicos. Surto causado pelos grupos B e C têm sido relatados no Japão, na China e em Taiwan (BECKA e CHACON-CRUZ, 2015).

Nos EUA e na Europa, a ocorrência de doença é geralmente endêmica. Mais de 95% dos casos observados na Europa são atribuídos aos grupos B e C, sendo Noruega, Alemanha, Dinamarca e Holanda os países onde há maior proporção de casos associados ao grupo B, enquanto na Espanha, Grécia, Eslováquia, República Checa, Irlanda e Reino Unido, observou-se, a partir do final da década de 1990, um aumento proporcional de casos atribuídos ao grupo C. Nos EUA, o grupo B é o principal responsável por doença endêmica e o grupo C está relacionado a surtos em adolescentes e adultos jovens. O aumento na proporção de casos associados ao grupo Y foi observado na última década, principalmente em adultos e em idosos no país (SÁFADI E BARROS, 2006; IBARZ-PAVÓN *et al.*, 2012; ANDERSON *et al.*, 2013; JAFRI *et al.*, 2013; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). Cepas do grupo Y também estão relacionadas com casos recentes da doença meningocócica na Colômbia, partes do Canadá, África do Sul, Suécia e outros países europeus, como o Reino Unido. Pacientes com doença causada pelo grupo Y (e também pelo grupo W135) são mais propensos a ter a pneumonia do que os pacientes com doença causada pelos demais grupos capsulares. A doença causada pelo grupo Y afeta todas as faixas etárias, incluindo crianças, embora seja predominante entre indivíduos com 65 anos de idade ou mais. Por razões que permanecem sem explicação, a doença causada por este grupo é relativamente rara na maioria das outras partes do mundo, apesar de ser frequentemente isolado (GRANOFF *et al.*, 2012). Historicamente, eram raros os casos de doença meningocócica causados pelo grupo W na Inglaterra. No entanto, desde o ano de 2008, tem-se observado o aumento do número de casos relacionados a este grupo. Este aumento foi observado, inicialmente em adultos e se estendeu para outras faixas etárias, principalmente adolescentes (entre 15 e 19 anos de idade) e crianças menores de 1 ano (CAMPBELL *et al.*, 2015). A doença meningocócica invasiva causada por este grupo é caracterizada por sintomas atípicos, como por exemplo, pneumonia, artrite séptica, endocardite e epiglotite / supraglotite, principalmente em adultos mais velhos. No entanto, foram relatados casos de adolescentes apresentando predominantemente sintomas gastrointestinais, como náusea, vômitos e diarreia; caracterizados pela elevada letalidade (CAMPBELL *et al.*, 2016).

Casos relacionados ao grupo W135 também são comuns na Turquia, África do Sul (onde foi observado um surto entre 2003-2007), Nigéria, Argentina, e, mais recentemente, no Chile e no Brasil. Até 2011, a prevalência do grupo W135 tinha alcançado 31% de todos os casos de doença meningocócica no Chile (JAFRI *et al.*, 2013; HEDARI *et al.*, 2014). Inclusive, durante o surto de

doença meningocócica ocorrido neste país no ano de 2012, causado pelo grupo W135, foram reportados sintomas gastrointestinais, que não são usualmente associados à doença, em 24% dos indivíduos diagnosticados, que evoluíram para a morte (CAMPBELL *et al.*, 2015).

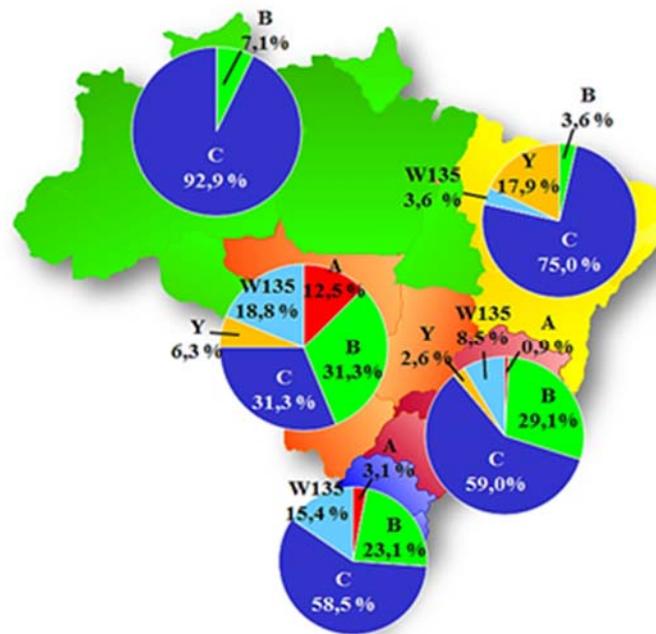
Apesar de ser uma doença de notificação compulsória e presumivelmente, uma das principais causas de doença bacteriana invasiva na América Latina, a incidência real da doença meningocócica é amplamente subestimada na maioria dos países da região. As taxas de incidência relatadas vão desde, aproximadamente 2/100.000 casos registrados anualmente no Brasil, um país com um sistema de controle e vigilância bem estabelecido, até números abaixo de 0,1/100.000 casos, em países como Paraguai, Costa Rica, México, Cuba e Bolívia (IBARZ-PAVÓN *et al.*, 2012; SÁFADI *et al.*, 2015; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015). As maiores taxas de doença meningocócica na América Latina são relatadas na Argentina, Brasil, Chile e Uruguai, provavelmente, porque esses países possuem sistemas de vigilância e serviços de laboratório mais avançados do que nos demais países da região. Além disso, como o diagnóstico laboratorial de casos suspeitos de doença meningocócica baseia-se principalmente no cultivo da bactéria, o possível emprego de técnicas microbiológicas incorretas, aliado ao uso de antibióticos contribuem para subestimar o número de casos da doença (SÁFADI *et al.*, 2015). Tal fato acontece mesmo após a implementação do Sistema Regional de Vacina (SIREVA) pela Organização Pan Americana de Saúde (OPAS), em 1993. O sistema de vigilância epidemiológica foi criado, inicialmente, para monitorar a incidência das doenças causadas por *S. pneumoniae* entre os países da América Latina, mas foi, posteriormente, estendido ao monitoramento das doenças causadas por *H. influenzae* (1997) e *N. meningitidis* (2000). Atualmente, mais de 20 países desta região participam do programa de vigilância, embora seja observada grande variabilidade de dados fornecidos por eles, em termos de quantidade e precisão, sendo o Brasil o país que relata a maior parte dos dados (SÁFADI *et al.*, 2013).

Entre os anos de 1978 e 1979, o grupo A foi o responsável pela maioria dos casos de doença meningocócica em um surto ocorrido no sul do Chile, com incidência de 21 casos por 100.000 habitantes. Após a vacinação com a vacina polissacarídica A/C, os níveis de incidência caíram para 0,8 - 1,1 casos por 100.000 habitantes. Na década de 1980 foram relatados vários surtos de doença meningocócica causados pelo grupo B nos países da América Latina que estavam associados à propagação de clones da bactéria relacionados aos casos de doença meningocócica

na Europa e nos EUA. A incidência da doença foi de 14 casos por 100.000 habitantes em Cuba e de 20 casos para cada 100.000 habitantes no Chile. A vacina cubana (VA-MENGOC-BC®), desenvolvida em resposta a esta epidemia, foi utilizada em um programa de vacinação em massa e, posteriormente, incorporada ao programa nacional de imunização, o que reduziu sensivelmente a incidência da doença meningocócica no país para 1,4 casos por 100.000 habitantes. A vacina cubana foi utilizada para o controle de surtos ocorridos no mesmo período em outros países da América Latina como no Brasil, Uruguai e Colômbia, no entanto, os estudos de eficácia demonstraram que a vacina não confere proteção contra cepas heterólogas, além de apresentar baixo nível de proteção em crianças pequenas. Surtos de doença meningocócica causados pelo grupo C foram relatados no início da década de 1970, na Costa Rica, com incidência de até 7,8 casos por 100.000 habitantes. No período de 1995 até 2001, observou-se na Argentina, o aumento de casos de doença endêmica causada pelo grupo C e desde 2000 são reportados mais casos de doença meningocócica associados ao grupo C, em relação ao grupo B, por exemplo, na Colômbia. Antes do ano 2000, eram raros os casos de doença causada pelo grupo W135 na América Latina. No entanto, evidências sugerem o aumento do número de casos relacionados a este grupo na Argentina e no Chile, com a prevalência aumentando de nenhum caso em 2001 para 31% do total de casos relatados até novembro 2011 no Chile e de 2% dos casos confirmados em 2000, para 37%, 47% e 52% dos casos na Argentina, em 2008, 2009 e 2012, respectivamente. Há relatos de aumento do número de casos de doença meningocócica relacionados ao grupo W135 no Brasil, mais especificamente no Rio Grande do Sul e no Rio de Janeiro (ABAD *et al.*, 2014). Antes do século 21 os casos de doença meningocócica relacionados com o grupo Y raramente eram observados na América Latina. No entanto, desde 2003, este grupo tem sido cada vez mais frequente, chegando a corresponder à metade dos casos confirmados na Colômbia. De modo semelhante, um ligeiro aumento na incidência do grupo Y também tem sido relatado na Venezuela, Argentina, Costa Rica, Chile e Uruguai (SÁFADI *et al.*, 2013; SÁFADI *et al.*, 2015).

A vigilância epidemiológica da doença meningocócica no Brasil é passiva, e todos os casos suspeitos devem ser relatados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), administrado pelo Ministério da Saúde (SÁFADI *et al.*, 2014). O país registrou, no início da década de 1970, a maior epidemia de doença meningocócica do país, com o epicentro em São Paulo e caracterizada pela sobreposição de duas ondas epidêmicas, a primeira provocada pelo meningococo C, com início em abril de 1971, e a segunda pelo meningococo A, iniciada em abril

de 1974, sem que a incidência de casos relacionados ao meningococo C tivesse retornado aos valores endêmicos. A taxa de incidência que era de 2,1 casos por 100 mil habitantes em 1970 chegou a atingir a marca de 179 casos por 100.000 habitantes em 1974. A epidemia permitiu a primeira grande experiência com o uso das vacinas polissacarídicas A e C em grande escala, resultando no controle da epidemia a partir de 1975. A década de 1980 iniciou com uma baixa incidência da doença (1 caso para 100.000 habitantes), com o grupo B tornando-se prevalente sobre o grupo C e praticamente não se registrando mais casos do grupo A. A partir de 1987, registrou-se um aumento no número de casos, com epidemias atribuídas ao grupo B em vários locais do país. Esse crescimento atingiu o ápice em 1996, com registro de 7.104 casos (4,5 casos/100.000 habitantes), em grande parte decorrente de surtos localizados em grandes cidades, como São Paulo e Rio de Janeiro. Entretanto, a partir do ano de 2002, registrou-se um aumento na proporção de casos atribuídos ao grupo C (DE MORAES *et al.*, 2015; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015), mostrando uma tendência de crescimento percentual em algumas regiões do país, como por exemplo, no estado de São Paulo, onde foi responsável, em 2005, por 63% dos casos identificados de doença meningocócica, com o grupo B respondendo por 32% dos casos e os demais, por 5%. A letalidade da doença, ou seja, a proporção de casos que evoluem para a morte, ainda é bastante elevada (19%) (SÁFADI E BARROS, 2006; ABIO *et al.*, 2013). O grupo W135 surgiu no país em 2001 e o número de casos aumentou desde então, passando de 17 casos, registrados em 2001, para 28 casos em 2012 (SÁFADI *et al.*, 2015). Em 2013, a incidência de doença meningocócica no Brasil era de 1,1 casos por 100.000 habitantes e letalidade correspondente a 21,1% (Ministério da Saúde/SINAN 2014). Atualmente, no país, cerca de 60% dos casos são relacionados com o grupo C, seguido pelo grupo B com 25%, W135 com 11% e Y com 2% (Ministério da Saúde/SINAN 2015). A Figura 4 mostra a distribuição dos grupos causadores da doença meningocócica nas diferentes regiões do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE / SVS, 2015).



Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

Figura 4: Distribuição dos grupos causadores de doença meningocócica nas diferentes regiões do Brasil (2015). Valores percentuais calculados a partir de dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificações – SINAN/Net - acesso em 31 de Julho de 2016.

3.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA ANTÍGENOS POLISSACARÍDICOS

A resposta imunológica contra os antígenos polissacarídicos é qualitativamente diferente da resposta contra os antígenos proteicos. De maneira geral, as células do sistema imunológico são capazes de reconhecer e processar proteínas estranhas, sendo os fragmentos peptídicos resultantes deste processamento apresentados para as células T por moléculas constituintes do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (“Major Histocompatibility Complex Class” II - MHC II), encontradas na superfície das células apresentadoras de antígeno. Após o reconhecimento do peptídeo ligado, as células B são estimuladas pelas células T, a se multiplicar e produzir as imunoglobulinas, além de se diferenciarem nas células B de memória, que têm vida longa e são capazes de produzir anticorpos com maior afinidade do que os produzidos inicialmente (principalmente, do tipo imunoglobulina classe G - IgG). Devido ao fato dessas respostas serem dependentes da participação das células T, as proteínas são denominadas

antígenos "T-dependentes". Suas principais características são uma resposta de memória, mudança de classe de anticorpo, e maturação da afinidade do anticorpo. Por outro lado, os polissacarídeos são denominados antígenos "T-independentes". Tais antígenos são reconhecidos pelas células B, sem a participação de moléculas do MHC II. Conseqüentemente, não ocorre o recrutamento de células T auxiliares, e, como consequência, não induzem uma resposta de memória. Os anticorpos produzidos pelas células B são, em grande parte, do tipo imunoglobulina classe M (IgM) e não é observado o aumento da afinidade dos anticorpos com o tempo (FREESE, 2001; ASTRONOMO e BURTON, 2010; AVCI et al., 2011; MAIDEN, 2013; GASPARINI *et al.*, 2015).

Estudos referentes à resposta imunológica de camundongos contra os polissacarídeos bacterianos demonstraram que tais moléculas, normalmente, estimulam os linfócitos B, através da ligação direta ao seu receptor, a se diferenciarem em plasmócitos secretores de anticorpos (Figura 5). Assim, não são geradas células B de memória e a resposta é de curta duração.

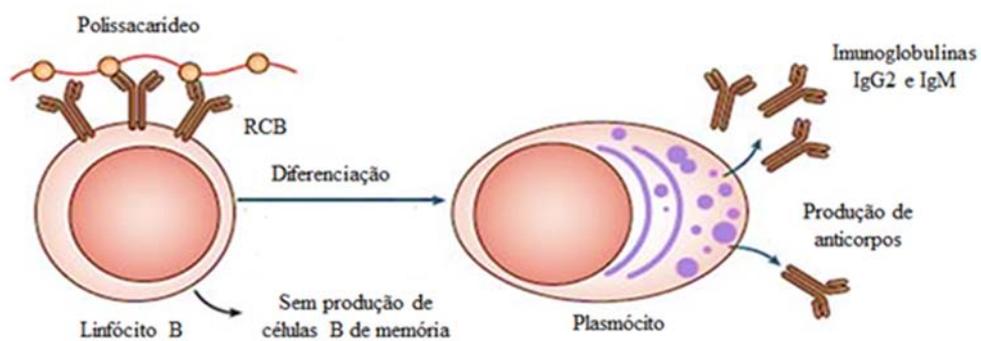


Figura 5: Resposta imunológica ao polissacarídeo. Os polissacarídeos estimulam as células B através da ligação ao receptor de célula B (RCB), induzindo a produção de imunoglobulinas. Este processo não induz a produção de células B de memória. Adaptado de: Pollard *et al.* (2009).

As características referentes à resposta de células B é similar para a maioria dos polissacarídeos capsulares das bactérias que causam infecções graves em humanos, incluindo o Hib, *N. meningitidis* grupo C (MenC) e os polissacarídeos pneumocócicos, mas há algumas exceções. Por exemplo, ao contrário do polissacarídeo meningocócico C (PSC), e por razões desconhecidas, o polissacarídeo meningocócico A (PSA) é mais imunogênico em crianças. Outra exceção são

alguns polissacarídeos zwitteriônicos (isto é, aqueles que apresentam tanto carga positiva como negativa na molécula), tais como o polissacarídeo capsular de *Bacteroides fragilis*, o polissacarídeo pneumocócico sorotipo 1 e os polissacarídeos tipo 5 e tipo 8 de *Staphylococcus aureus*, que podem ser apresentados diretamente ao MHC II (COBB e KASPER, 2005; POLLARD *et al.*, 2009; STEPHEN *et al.*, 2010; ASTRONOMO e BURTON, 2010; AVCI e KASPER, 2010).

3.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA ANTÍGENOS POLISSACARÍDICOS CONJUGADOS

A conjugação química entre um polissacarídeo e uma proteína direciona o processamento da proteína por células B específicas e a apresentação dos peptídeos resultantes deste processamento para as células T, em associação com moléculas do MHC II (ASTRONOMO e BURTON, 2010). O glicoconjugado liga-se aos receptores presentes na superfície de células B (RCB) específicos para polissacarídeos, sendo imediatamente internalizado em endossomas. Uma vez dentro da célula, a porção proteica sofre a ação de proteases gerando epitopos peptídicos que se ligam ao MHC II, através do qual são apresentados ao receptor de células T (RCT), ativando-as. A ativação das células T desencadeia a liberação de citocinas que promovem a maturação das células B, que deixam de produzir anticorpos do tipo IgM e passam a secretar IgG específicas contra o polissacarídeo (Figura 6) (AVCI e KASPER, 2010). Até bem pouco tempo, essa era a explicação tradicionalmente utilizada para o mecanismo através do qual os glicoconjugados induzem a produção de anticorpos específicos contra os polissacarídeos. No entanto, apesar de todas as tentativas no sentido de comprovar esta hipótese ao nível celular, o mecanismo molecular que envolve o processamento e a apresentação do glicoconjugado juntamente com o MHC II, ainda não foi totalmente elucidado. Principalmente, no que diz respeito ao processamento do glicídio no interior do endossoma. O ambiente químico no interior deste compartimento pode ser suficientemente favorável à oxidação do glicídio, ou à digestão enzimática da proteína, contudo, não seria suficiente para quebrar a ligação covalente formada entre ambos, caracterizada por ser uma ligação forte. Alguns estudos têm demonstrado que o processamento endolisossomal de glicoconjugados resulta em glicopeptídeos, e não somente peptídeos, que são apresentados em conjunto com o MHC II às células T (WOLFERT e BOONS, 2013).

Portanto, o conjugado induz uma resposta imunológica dependente de células-T além de memória imunológica em resposta ao segundo contato com o antígeno. A principal subpopulação de células B envolvida na resposta imunológica aos conjugados em seres humanos é desconhecida, no entanto, as características da resposta, tais como a indução de memória imunológica e a maturação da avidéz dos anticorpos, indicam fortemente, que as células B foliculares são, provavelmente, ativadas e formam centros germinativos. Ao contrário da resposta aos polissacarídeos, a resposta aos conjugados pode proporcionar imunidade em longo prazo em função da produção de novas células B de memória. A imunogenicidade de diferentes vacinas conjugadas varia em função de diferenças na natureza química do polissacarídeo, a quantidade residual de polissacarídeo não conjugado na vacina e a natureza da proteína carreadora (POLLARD *et al.*, 2009).

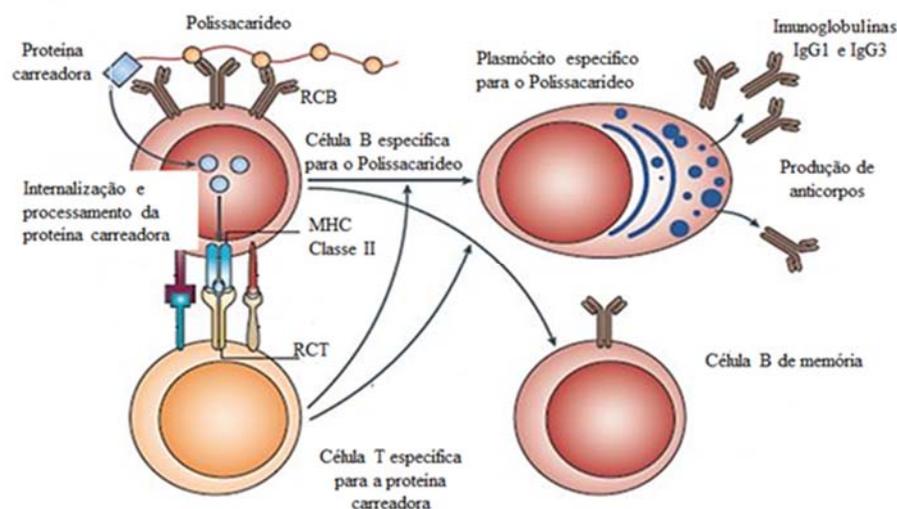


Figura 6: Resposta imunológica ao conjugado. A proteína carreadora presente na molécula conjugada é processada por células B específicas e os peptídeos são apresentados às células T, via receptor de célula T (RCT), através do MHC-II, o que resulta tanto na produção de plasmócitos secretores de anticorpos, como de células B de memória. Adaptado de: Pollard *et al.* (2009).

Estudos realizados na década de 60 do século passado demonstraram a correlação direta entre a suscetibilidade à doença meningocócica invasiva e a ausência de anticorpos séricos detectáveis com atividade bactericida mediada pela ativação do sistema complemento, que resulta em lise da

bactéria (SÁFADI *et al.*, 2012; GASPARINI *et al.*, 2015). Sendo assim, a proteção contra a doença depende da imunidade inata, em particular, do funcionamento do sistema complemento. As deficiências nos componentes terminais e alterações nos reguladores do sistema complemento estão ambos associados com o risco aumentado de infecção em função da incapacidade de provocar a lise da bactéria. O baço também exerce um papel importante na eliminação da bactéria na corrente sanguínea, uma vez que a resposta de anticorpos contra os polissacarídeos ocorre mais rapidamente no baço do que nos gânglios linfáticos. Assim, uma explicação mais plausível para a importância do baço é a de que as células B da zona marginal são necessárias durante as respostas a tais antígenos (VINUESA *et al.*, 2001; TAN *et al.*, 2010).

As doenças causadas por bactérias encapsuladas têm elevada incidência nas crianças no primeiro ano de vida, em função da inexistência da subpopulação de células B responsável pelo reconhecimento e resposta aos polissacarídeos. Estas células têm uma ontogenia tardia no sistema imunológico e estão presentes na zona marginal do baço de crianças entre 18 e 24 meses de idade (MOND *et al.*, 1995). Além disso, nesta faixa etária, as crianças possuem os níveis mais baixos de anticorpos bactericidas, como uma consequência natural da diminuição dos anticorpos adquiridos passivamente, através da mãe durante a gestação, que ocorre antes do desenvolvimento da imunidade adaptativa. Desta forma, a capacidade de produção de anticorpos contra antígenos polissacarídeos não se desenvolve até os 2 anos de idade, e não atinge os níveis observados, normalmente em adultos, até cerca de 5 anos de idade (VINUESA *et al.*, 2001; GASPARINI *et al.*, 2015).

Acredita-se que uma proteção de longa duração adquirida após a imunização contra bactérias encapsuladas depende da manutenção de três mecanismos: a persistência de anticorpos funcionais; a manutenção da memória imunológica e a imunidade “de rebanho”. Sabe-se que os títulos de anticorpos induzidos pela imunização infantil não são mantidos e, ao contrário, apresentam-se abaixo do limiar protetor em 50% das crianças com menos de 1 ano de idade. Em apenas 12% das crianças imunizadas a proteção conferida por anticorpos funcionais persiste até os 4 anos de idade. O segundo mecanismo de proteção é a memória imunológica, que é geralmente definida como uma resposta anamnésica a uma segunda dose do imunógeno. As respostas de células B de memória foram observadas, mesmo entre indivíduos que não apresentaram uma resposta primária detectável ao imunógeno. Entretanto, a infecção causada

pelo meningococo pode se instalar em um período de tempo menor que aquele necessário para o estabelecimento da resposta de células B de memória, que leva quatro ou mais dias após o reencontro com o antígeno. Por outro lado, este mecanismo de proteção pode ser eficaz nos casos em que há um período prolongado de incubação previamente à instalação da infecção. Estas observações sugerem fortemente que a resposta de células B de memória pode não ser tão importante quanto a presença de anticorpos funcionais circulantes para conferir proteção, em longo prazo, contra um agente patogênico que invade rapidamente. O terceiro mecanismo que garante a proteção da população é a imunidade de “rebanho”, caracterizada como um benefício da vacinação em pessoas não vacinadas, ou seja, a proteção de indivíduos não vacinados devido à redução da transmissão do agente infeccioso por aqueles que receberam a vacina. A manutenção da imunidade de “rebanho” ao longo de anos ou décadas depende da capacidade do sistema imunológico em impedir a aquisição do microrganismo pelos indivíduos ou grupos da população que são os principais transmissores. Acredita-se que seja mediada pelos anticorpos da mucosa, ou os anticorpos do soro que atravessam a mucosa. Em resumo, a persistência de níveis adequados de anticorpos bactericidas parece ser o fator determinante de proteção individual contra o meningococo C e a imunidade de “rebanho” é o mecanismo de proteção mais importante consequente da persistência de anticorpos nos portadores saudáveis. Assim, o principal requisito para uma proteção em longo prazo, é a manutenção dos níveis de anticorpos séricos nos indivíduos portadores, acima do limiar de proteção (POLLARD *et al.*, 2009).

Existem poucas informações disponíveis capazes de explicar tanto os mecanismos envolvidos na persistência dos níveis de anticorpos protetores nos seres humanos, como o fato da imunização na infância não ser capaz de induzir resposta imunológica sustentada. No entanto, é provável que, pelo menos em parte, a causa seja a curta sobrevivência das células plasmáticas na medula óssea nesta fase da vida. Embora muitas crianças desenvolvam uma fraca resposta imunológica, a maior persistência de anticorpos durante o primeiro ano de vida é característica naquelas em que a resposta inicial de células B é mais elevada, ou seja, em que se observa maior número de células B de memória no sangue periférico, após a imunização primária. Isto indica que a magnitude da reação inicial do centro germinativo em resposta à vacinação infantil pode determinar proteção, em longo prazo, contra a doença. As estratégias para melhorar a resposta inicial à imunização utilizando adjuvantes eficazes ou ajustando o esquema de vacinação, poderiam aumentar a persistência de anticorpos séricos. Vale ressaltar que a resposta de células B

de memória para as vacinas conjugadas é ainda menor em crianças não imunizadas com até 12 meses de idade, quando comparadas com adultos jovens e que os adultos jovens parecem sustentar a resposta de anticorpos. Uma questão fundamental na manutenção dos níveis de anticorpos, portanto, é a idade em que a vacina é administrada. Portanto, a solução para a manutenção da imunidade pode ser simplesmente a imunização do grupo responsável pela imunidade de “rebanho” ou o uso estratégico de doses reforço da vacina em períodos de maior suscetibilidade, conforme determinado pela diminuição dos níveis de anticorpos. Alternativamente, uma melhor compreensão dos mecanismos que contribuem para a baixa resposta imunológica em crianças, além dos mecanismos pelos quais os adjuvantes e formulações vacinais são capazes de potencializar a resposta imunológica, pode permitir o desenvolvimento da segunda geração de vacinas conjugadas capazes de induzir a produção de anticorpos de maior duração e resposta duradoura em crianças (POLLARD *et al.*, 2009).

3.4 VACINAS CONTRA OS MENINGOCOCOS

As primeiras tentativas para o desenvolvimento de vacinas meningocócicas usavam células inteiras da bactéria morta. Vários ensaios foram realizados entre 1900 e 1940, mas os estudos foram mal controlados e, na maioria dos casos, era impossível dizer se as vacinas conferiam imunidade protetora. Os benefícios de uma vacina contendo células inteiras foram sobrepostos pela reatogenicidade excessiva de tais preparações. Após o sucesso no desenvolvimento de vacinas contra o tétano e a difteria, na década de 1930, utilizando as proteínas tetânica e diftérica, respectivamente, foi realizada uma nova tentativa de desenvolver uma vacina meningocócica. Tal vacina era constituída pelo extrato bruto da bactéria contendo a exotoxina inativada e provou ser imunogênica, embora certamente estivesse “contaminada” com polissacarídeo capsular, proteínas de membrana externa da bactéria e também por endotoxinas. Durante o início da década de 1940, Scherp & Rake demonstraram que o soro de cavalos imunizados com polissacarídeos capsulares grupo-específicos protegia ratos contra o desafio letal com *N. meningitidis*. No entanto, tais preparações não foram capazes de desencadear respostas de anticorpos em seres humanos. A fraca imunogenicidade foi atribuída ao tamanho molecular relativamente baixo do polissacarídeo presente na formulação testada. Os estudos posteriores demonstraram que antígenos polissacarídicos com peso molecular elevado induziam resposta com produção de anticorpos em seres humanos. O entusiasmo pelo desenvolvimento de vacinas meningocócicas diminuiu,

posteriormente, em face do otimismo em torno dos primeiros casos de sucesso no tratamento utilizando antibióticos, principalmente as sulfonamidas (GRANOFF, *et al.*, 2012). Todavia, até o início dos anos 1960, foram relatados muitos casos de *N. meningitidis* resistentes à sulfonamida, o que representou um importante problema no caso de recrutas militares durante a Guerra do Vietnã. Os surtos causados por cepas resistentes dos grupos B e C, levaram à realização de estudos sobre a biologia da doença meningocócica. Tais estudos se tornaram paradigmas para o desenvolvimento, tanto de vacinas meningocócicas, como também contra as demais bactérias encapsuladas (MAIDEN, 2013).

3.4.1 Vacinas polissacarídicas

A estratégia de utilizar o polissacarídeo capsular como um antígeno vacinal foi descoberta e desenvolvida no final da década de 1960, por Emil C. Gotschlich, Irvin Goldschneider e colaboradores. Tais pesquisadores, que trabalhavam no *Walter Reed Army Institute*, desenvolveram uma abordagem alternativa para a purificação de polissacarídeos com elevado peso molecular que resultou na obtenção de vacinas eficazes contra os grupos A e C (GRANOFF, *et al.*, 2012; GASPARINI *et al.*, 2015). Com base no mesmo princípio, foram desenvolvidas as vacinas contra os grupos Y e W135 (HOLS *et al.*, 2013). Tais vacinas provaram ser seguras e eficazes no controle de surtos e epidemias e estão disponíveis desde a década de 70 do século passado. Infelizmente, este “sucesso” não foi alcançado contra o meningococo do grupo B, devido ao fato deste polissacarídeo não ser imunogênico (ASTRONOMO e BURTON, 2010; HARRISON *et al.*, 2011; AZEVEDO *et al.*, 2013). Neste sentido, as vacinas disponíveis contra o grupo B utilizam uma abordagem proteica, como o emprego de vesículas de membrana externa (“outer Membrane Vesicles” – OMV) (BRÖKER *et al.*, 2009; HILL *et al.*, 2015). O uso de vacinas com OMV contra o meningococo B tem sido explorado desde a década de 1970 e as ações de saúde pública em países como Cuba, Noruega e Nova Zelândia provaram a sua eficácia nas regiões onde a cepa circulante era constituinte da vacina. A vacina cubana VA-MENGOC-BC[®] mostrou 83% de eficácia, enquanto as vacinas da Noruega (MenBVac[®]) e da Nova Zelândia (MeNZB) mostraram eficácia de 87% e 73%, respectivamente, entre jovens e adultos. De maneira geral, as estimativas de eficácia dessas vacinas em crianças e lactentes são superiores a 70%. A ampla aplicabilidade de tais vacinas tem sido questionada, uma vez que não são capazes de proteger contra cepas diferentes das que as constituem. As vacinas com OMV têm como

principal antígeno, as porinas (Por A e Por B), proteínas altamente variáveis entre cepas do mesmo grupo. Como consequência, a resposta imune contra a OMV é cepa-específica, e alguns autores propuseram o conceito de desenvolvimento de vacinas “tailor-made” para caracterizá-las (ACEVEDO *et al.*, 2014; GASPARINI *et al.*, 2015). Sendo assim, novas estratégias de desenvolvimento de vacinas contra o meningococo B foram implementadas e, em janeiro de 2013 a farmacêutica Novartis recebeu aprovação para a comercialização da vacina Bexsero[®] na Europa e subsequentemente, no Canadá e Austrália (BORROW *et al.*, 2013). Em 2015, a vacina recebeu a aprovação da agência regulatória americana, FDA (“Food and Drug Administration”). A vacina contém, além de OMV, antígenos recombinantes identificados por vacinologia reversa, como Proteína de fusão fHbp - proteína ligante fator H; Proteína NadA - Adesina A de *Neisseria* e Proteína de fusão NHBA - Antígeno de *Neisseria* de Ligação à Heparina, que são capazes de induzir resposta imunológica contra diferentes cepas do grupo B. Em outubro de 2014, o FDA aprovou outra vacina proteica contra o meningococo B produzida pela farmacêutica Pfizer, a vacina Trumenba[®], que contém variantes da proteína de fusão fHbp - proteína ligante fator H pertencentes às subfamílias A e B, que são capazes de induzir resposta imunológica protetora contra cepas do meningococo B prevalentes nos EUA (ANDERSON *et al.*, 2013; SRIDHAR *et al.*, 2015; GASPARINI *et al.*, 2015).

A primeira vacina polissacarídica meningocócica (contra o grupo C) foi licenciada nos Estados Unidos em 1974. A vacina tetravalente A, C, Y, W135 (Menomune[®], Sanofi Pasteur) foi licenciada em 1978. Dentre as vacinas polissacarídicas atualmente licenciadas estão a bivalente contra os grupos A e C, a trivalente contra os grupos A, C e W135 e a tetravalente, contra os grupos A, C, W135 e Y, produzidas pela Sanofi Pasteur e GlaxoSmithKline (GSK), além da vacina bivalente contra os grupos A e C produzida a partir da colaboração “sul-sul” firmada entre dois institutos da América Latina: Bio-Manguinhos (Brasil) e Instituto Finlay (Cuba) (Tabela 2) (GRANOFF *et al.*, 2012; CORTES *et al.*, 2012; ALI *et al.*, 2014; HEDARI *et al.*, 2014).

Tabela 2: Vacinas meningocócicas polissacarídicas licenciadas. Adaptado de GRANOFF *et al.* (2012).

Empresa produtora	Vacina	Composição	Excipientes	Diluyente
Sanofi Pasteur	Mengivac®	PSA	Lactose (2 mg)	Solução Salina tamponada
		PSC		
Sanofi Pasteur	Menomune®	PSA	Lactose (2,5 – 5,0 mg)	Água para injetáveis
		PSC		
		PSY	NaCl (4,25 – 4,75 mg)	
		PSW135		
Sanofi Pasteur	MenceVax®AC	PSA	Lactose (12,6 mg)	Solução salina
		PSC		
GSK	MenceVax®ACW	PSA	Lactose (12,6 mg)	Solução salina
		PSC		
		PSW135		
GSK	MenceVax®ACWY	PSA	Lactose (12,6 mg)	Solução salina
		PSC		
		PSY		
		PSW135		
Bio-Manguinhos / Finlay	Vacina meningocócica AC	PSA	Lactose (2,1 – 3,95 mg)	Solução salina tamponada
	PSC			

Todas as vacinas contêm 50 µg de cada um dos polissacarídeos capsulares e são liofilizadas, requerendo a reconstituição com o respectivo diluyente, sem conservantes. Para frascos de múltiplas doses, o diluyente utilizado para reconstituir Menomune® contém timerosal (derivado de mercúrio) de 1:10.000 como conservante.

No Brasil, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), unidade produtora de imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz, foi criado em 1976 através da norma regulamentar 02/76, assinada pelo então presidente da Fiocruz: Vinícius da Fonseca, a fim de

produzir e distribuir vacinas polissacarídicas A e C, sendo responsável pelo fornecimento destas ao Ministério da Saúde. Na época, era denominado “Laboratório de Tecnologia em Produtos Biológicos de Manguinhos” e herdou a atividade de produção de vacinas (principalmente a vacina contra a febre amarela) e soros do IOC (Instituto Oswaldo Cruz) que, desde o início do século XX, produzia diferentes imunizantes, inclusive para uso veterinário. Como o principal alvo era a produção da vacina contra a meningite, foi criado um acordo de cooperação com o Instituto Mérieux que incluiu a transferência da tecnologia de produção da vacina e a doação de equipamentos. O objetivo era estabelecer uma plataforma para a fabricação posterior de outros imunobiológicos, assegurando no futuro a autossuficiência em termos de vacinas, já que o país despendia volumosos recursos com a importação (AZEVEDO *et al.*, 2007). A produção da vacina meningocócica A/C foi descontinuada, após terem sido produzidos mais de 60 milhões de doses até o ano de 1996, em função das mudanças observadas no cenário epidemiológico do país (BARBOSA *et al.*, 2015).

Em meados de 2006, com a perspectiva de redução da produção da vacina polissacarídica contra os grupos A e C pelas farmacêuticas GSK e Sanofi-Pasteur, a Organização Mundial da Saúde (OMS) buscou alternativas para a manutenção do abastecimento deste insumo aos países do sub-Saara africano, com preços acessíveis. Neste sentido foi estabelecida, em janeiro de 2007 através do “International Coordinating Group” (ICG) da OMS, um acordo de produção compartilhada entre Bio-Manguinhos e Instituto Finlay de Cuba para viabilizar a produção emergencial da vacina com os quantitativos requeridos pela Organização e evitar que a falta deste produto impedisse o controle de epidemias na África. Através desse acordo o Instituto Finlay ficou responsável pela produção do ingrediente farmacêutico ativo (IFA) a partir da cepa bacteriana e da tecnologia fornecidas por Bio-Manguinhos, que realizaria todo o processamento final (SÁENZ *et al.*, 2010; CORTES *et al.*, 2012), ou seja as etapas de formulação; envasamento; liofilização; rotulagem; embalagem e o controle de qualidade da vacina. Devido ao comprometimento e dedicação dos produtores, já em 2007 a vacina pode ser fornecida à OMS e desde então, até o ano de 2012, foram entregues mais de 19 milhões de doses distribuídas através de instituições como a OMS, Médicos sem Fronteiras, Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e Comitê Internacional da Cruz Vermelha (THORSTEINSDÓTTIR e SÁENZ, 2012). Em 2008 esta vacina foi pré-qualificada pela OMS, graças à colaboração existente entre as agências regulatórias de ambos os países: ANVISA e CECMED (“Centro para el Control Estatal de Medicamentos,

Equipos y Dispositivos Médicos”) o que permitiu a participação em licitações internacionais promovidas pela UNICEF, tendo como concorrentes grandes produtores de vacinas (SÁENZ *et al.*, 2010). A partir da introdução da vacina conjugada MenAfriVac em 2010 observou-se a diminuição do número de casos de doença meningocócica do grupo A ao mesmo tempo que houve o aumento proporcional dos casos de doença em função do grupo W135 na África. Assim, a OMS propôs o fornecimento de uma vacina polissacarídica trivalente contemplando o grupo W135, que foi registrada pelo CECMED em 2013. Desde então foram entregues 460 mil doses desta vacina (BIO-MANGUINHOS, 2015).

As vacinas polissacarídicas foram as primeiras a serem definidas quimicamente, sendo utilizadas para a prevenção de doenças causadas por bactérias encapsuladas. Desde o final do século XX, a vacinação de rotina contra a doença meningocócica tem se tornado cada vez mais comum devido aos contínuos avanços da tecnologia e o aumento da conscientização sobre a doença. As vacinas polissacarídicas não são adequadas para uso em lactentes e precisam ser administradas repetidamente, até mesmo em adultos. Também são ineficazes contra a transmissão do meningococo tendo, na melhor das hipóteses, um efeito de curto prazo, de modo que, embora sejam eficazes no caso de epidemias, essas vacinas não são adequadas para a imunização de rotina da população. Por essas razões, o uso das vacinas polissacarídicas é indicado apenas para grupos de alto risco ou durante surtos ou epidemias (HARRISON *et al.*, 2011; MAIDEN, 2013; BECKA e CHACON-CRUZ, 2015).

3.4.2 Vacinas conjugadas

O surgimento das vacinas conjugadas na década de 1980 foi um dos principais avanços no desenvolvimento das vacinas polissacarídicas. Tais vacinas contêm um polissacarídeo conjugado a proteínas, por exemplo, a proteína diftérica ou tetânica. Assim como acontece com as vacinas polissacarídicas, estas preparações têm um excelente perfil de segurança, com a vantagem de ser imunogênica em crianças pequenas e em adultos, o que as torna adequadas para intervenções em toda a população. Os custos de produção dessas vacinas são mais elevados porque contêm, pelo menos, duas macromoléculas que devem ser previamente ativadas, conjugadas e purificadas antes de serem submetidas à conjugação química (MAIDEN, 2013).

O sucesso desta abordagem foi demonstrado pela primeira vez em seres humanos com a vacina conjugada contra o Hib, que resultou na diminuição da doença invasiva e evidenciou o potencial para o controle de doenças causadas por outras bactérias encapsuladas. As vacinas meningocócicas conjugadas contra o grupo C tornaram-se disponíveis no final da década de 1990, quando ocorreu, na Inglaterra e no País de Gales, uma epidemia de doença meningocócica causada por este grupo. Esta epidemia foi caracterizada pelos elevados níveis da doença em adolescentes e adultos jovens, e pelos surtos localizados em ambientes como os alojamentos universitários. Em resposta a este problema, o licenciamento da vacina meningocócica C conjugada (MCC) ocorreu de forma acelerada, com base em ensaios sorológicos como correlato de proteção. A natureza esporádica da doença e a situação epidemiológica naquela época foram os motivos para que os ensaios clínicos de Fase III não fossem realizados (ALI *et al.*, 2014) e a eficácia da vacina foi avaliada através da medida da resposta imunológica, particularmente pela geração de anticorpos bactericidas. Em função do perfil etário das pessoas infectadas, principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens, a vacina foi introduzida no calendário de imunização de rotina através de uma campanha de grande cobertura cujo alvo era indivíduos de até 18 anos de idade, e que mais tarde foi estendida para adultos jovens. Ao mesmo tempo, foi posto em prática um programa visando uma maior vigilância da doença, a fim de monitorar os efeitos da introdução da vacina. Este sucesso estimulou a introdução de vacinas meningocócicas C conjugadas em outros países e proporcionou a perspectiva de controle da doença meningocócica causada pelo grupo C. Os resultados obtidos em vários estudos realizados desde a introdução dessas vacinas nortearam as mudanças no calendário de vacinação do Reino Unido, principalmente em função da constatação de que os efeitos na transmissão da doença eram até mais importantes do que a própria indução de memória imunológica nos indivíduos. Isso levantava a interessante questão sobre a hipótese de que os efeitos sobre a transmissão seriam mais relevantes para o estabelecimento da eficácia da vacina (MAIDEN, 2013; ALI *et al.*, 2014).

As primeiras vacinas antimeningocócicas conjugadas, desenvolvidas na década de 90 do século passado, continham oligossacarídeos capsulares dos grupos A e C conjugados à proteína CRM₁₉₇, uma variante atóxica da toxina diftérica (COSTANTINO *et al.*, 1992). Os estudos iniciais com essas vacinas comprovaram a sua segurança (ANDERSON *et al.*, 1994), entretanto, a baixa prevalência da doença meningocócica causada pelo grupo A em países desenvolvidos direcionou o desenvolvimento de vacinas conjugadas para controlar a doença causada apenas pelo grupo C

(SNAPE e POLLARD, 2005). Assim, foram desenvolvidas vacinas meningocócicas monovalentes conjugadas contra o meningococo C constituídas pelo polissacarídeo C, contendo grupo *O*-acetil, conjugado à CRM₁₉₇ (MCC-CRM₁₉₇ - Meningitec[®] - Laboratório Wyeth – atual Pfizer e Menjugate[®] - Novartis – atual GSK) (GIRARD *et al.*, 2006; CAMPBELL *et al.*, 2011). Tais vacinas mostraram-se imunogênicas em lactentes, pré-escolares, crianças maiores, adolescentes e adultos. Posteriormente, estudos de caracterização antigênica dos meningococos constataram que cerca de 12% das cepas de meningococos do grupo C causadores de doença não continham em sua cápsula polissacarídica o radical *O*-acetil. Esse achado sugeriu a possibilidade de que a resposta imunológica fosse baseada, fundamentalmente, em anticorpos grupo-específicos induzidos pelas vacinas que utilizavam polissacarídeos com o radical *O*-acetilado, que poderiam ser ineficazes contra cepas que produzissem o polissacarídeo sem o radical *O*-acetil. Foi, então, desenvolvida uma vacina que utiliza polissacarídeo desacetilado conjugado à anatoxina tetânica (MenC-TT- Neisvac-C[®] - Laboratório Baxter) (GIRARD *et al.*, 2006). Esta vacina induz a produção de anticorpos direcionados contra antígenos presentes tanto nas cepas de meningococo produtoras de polissacarídeo com o radical *O*-acetil, como naquelas que produzem o polissacarídeo sem o referido radical, gerando, assim, uma resposta mais abrangente e maiores títulos de anticorpos bactericidas séricos (FUSCO *et al.*, 2007; BORROW *et al.*, 2013). Sabe-se, atualmente, que tanto as vacinas constituídas pelo polissacarídeo acetilado como aquelas em que o componente encontra-se desacetilado são capazes de induzir resposta imunológica efetiva. A primeira vacina meningocócica tetravalente – Menactra[®] (Sanofi Pasteur) foi licenciada pelo FDA em 2005. Nos anos de 2010 e 2012 foram licenciadas as vacinas Menveo[®] (Novartis – atual GSK) e Nimenrix[®] (Glaxo Smithkline), respectivamente (BORROW *et al.*, 2013; ALI *et al.*, 2014). Essas vacinas também estão licenciadas no Canadá e em alguns países da Europa, América Latina, incluindo o Brasil, do Oriente Médio e da Ásia. Nenhuma delas contém conservante ou adjuvante. Uma vacina conjugada combinada contra o Hib e o meningococo C, produzida pela GSK (Menitorix[®]) está disponível no Reino Unido (GRANOFF *et al.*, 2012). Esta empresa também desenvolveu uma vacina contendo os polissacarídeos de Hib e meningocócicos C e Y conjugados à proteína tetânica (MenHibrix[®]) licenciada em 2012 nos Estados Unidos (PERRETT *et al.*, 2013). Mais recentemente, teve início o desenvolvimento de uma vacina pentavalente contra os grupos A, C, W135, Y e X para uso na África, e os estudos clínicos de Fase I e II estão previstos para acontecer ainda em 2016 (LAFORCE *et al.*, 2014; WHO, 2015;

LAFORCE, 2016). A Tabela 3 mostra as vacinas meningocócicas conjugadas atualmente licenciadas.

A introdução bem sucedida das vacinas conjugadas contra o meningococo C estimulou o interesse de proporcionar a vacinação em massa no local onde ocorrem os maiores episódios de doença meningocócica em nível mundial: o "cinturão da meningite", na região subsaariana da África. Os surtos sazonais, relatados pela primeira vez em 1905 e sistematicamente descritos por Lapeyssonnie em meados do século XX são normalmente causados pelo meningococo pertencente ao grupo A, ocorrendo com periodicidade de 7-10 anos, e frequentemente, envolvem centenas de milhares de casos com milhares de mortes. Além dessa elevada morbidade e mortalidade, principalmente em crianças, a intensidade dos surtos, que costumam durar algumas semanas, aumenta o impacto negativo sobre sistemas de saúde em países de baixa renda. As tentativas de controlar estes surtos com vacinas polissacarídicas simples só foram parcialmente bem sucedidas quando as vacinas foram administradas assim que o surto foi detectado, o que requer a manutenção e mobilização de grandes estoques de vacinas em curto prazo (MAIDEN, 2013).

O Projeto Vacina contra a Meningite ("Meningitis Vaccine Project" - MVP), uma parceria entre a OMS e PATH ("Programme for Appropriate Technology in Health"), financiado pela Fundação Bill e Melinda Gates, foi criado para solucionar o problema através do desenvolvimento de uma vacina conjugada contra o grupo A de custo acessível. Isto foi possível a partir da formação de uma parceria inovadora, em que a tecnologia de conjugação e os componentes da vacina foram fornecidos pelos Estados Unidos e Europa e a produção da vacina realizada por um Instituto da Índia ("Serum Institute of India" LTD - SIIL). O produto resultante, a vacina contendo a anatoxina tetânica (TT) conjugada ao polissacarídeo meningocócico A (MenAfriVac[®]), foi produzido, testado, pré-qualificado e introduzido durante a primeira década do século XXI, ao custo de U\$ 0,50 por dose (MAIDEN, 2013; ISAACS, 2015).

Tabela 3: Vacinas meningocócicas conjugadas licenciadas. Adaptado de GRANOFF *et al.* (2012).

Fabricante	Vacina	Composição por dose	Adjuvante	Outros excipientes	Apresentação
Vacinas monovalentes					
Pfizer	Meningitec®	10 µg de oligossacarídeo C <i>O</i> -acetilado conjugado com 15 µg da proteína CRM ₁₉₇	AlPO ₄	NaCl	Vacina líquida – frasco de dose única
Baxter Bioscience	NeisVac-C®	10 µg de oligossacarídeo C desacetilado conjugado com 10-20 µg da TT	Al(OH) ₃	NaCl	Vacina líquida – seringa de dose única
Novartis / GSK	Menjugate®	10 µg de oligossacarídeo C <i>O</i> -acetilado conjugado com 11-25 µg da proteína CRM ₁₉₇	Al(OH) ₃	Manitol, solução tampão fosfato de sódio	Vacina liofilizada – frasco de dose única a ser reconstituído com o diluente
SIIL	MenAfriVac®	10 µg de oligossacarídeo A conjugado com 10-33 µg da TT	AlPO ₄	Manitol, Sacarose, Tris e Timerosal	Vacina liofilizada – frasco de 10 doses a ser reconstituído com o diluente
Vacinas quadrivalentes					
Novartis / GSK	Menveo®	5 µg de cada oligossacarídeo dos grupos C, Y, e W135 e 10 µg de oligossacarídeo do grupo A conjugados com 33-64 µg da proteína CRM ₁₉₇	Nenhum	Sacarose, KH ₂ PO ₄ , NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ , NaCl	Frasco de dose única contendo o componente A liofilizado e frasco de dose única contendo os demais componentes em formulação líquida
Sanofi Pasteur	Menactra®	4 µg de polissacarídeos grupos A, C, Y, e W135 conjugado a aproximadamente 48 µg da proteína diftérica	Nenhum	NaCl	Vacina líquida – seringa de dose única
GSK	Nimenrix®	5 µg de cada oligossacarídeo dos grupos A, C, Y, e W135 conjugados com 44 µg da TT	Nenhum	Sacarose, Trometamol, NaCl	Vacina liofilizada – frasco de dose única reconstituído com o diluente envasado em uma seringa

Tabela 3cont.: Vacinas meningocócicas conjugadas licenciadas. Adaptado de GRANOFF *et al.* (2012).

Fabricante	Vacina	Composição por dose	Adjuvante	Outros excipientes	Apresentação
Vacina combinada					
GSK	Menitorix®	5 µg de polissacarídeo de Hib conjugado com 12,5 µg da TT + 5 µg de polissacarídeo meningocócico C conjugado com aproximadamente 5 µg da TT	Nenhum	Tris, sacarose, NaCl	Vacina liofilizada – frasco de dose única reconstituído com o diluente envasado em uma seringa
	MenHibrix®	2,5 µg de polissacarídeo de Hib com 6,25 µg da TT + 5 µg de polissacarídeo meningocócico C com 5 µg da TT e 5 µg de polissacarídeo meningocócico Y conjugado com aproximadamente 6,5 µg da TT	Nenhum	Tris, sacarose, NaCl	Vacina liofilizada – frasco de dose única reconstituído com o diluente envasado em uma seringa

Como havia pouca informação disponível sobre a transmissão do meningococo na África, no momento da introdução da vacina, a estratégia adotada foi imunizar todos os indivíduos até a idade de 29 anos para garantir a eficácia máxima da vacina. A vacina foi introduzida pela primeira vez em Burkina Faso em 2010, juntamente com a implementação de um forte sistema de vigilância com relação à doença e a realização simultânea de estudos referentes à transmissão da bactéria, para avaliar o impacto da vacinação. Assim como aconteceu com as vacinas conjugadas contra o grupo C, foi observado um efeito rápido e intenso na diminuição, tanto nas taxas da doença, como na transmissão do meningococo grupo A. O lançamento da MenAfriVac em todo o cinturão da meningite trouxe a perspectiva de eliminação da epidemia da doença meningocócica causada pelo grupo A nesses países (MAIDEN, 2013). Estudos recentes mostraram sensível redução do número de portadores assintomáticos de *N. meningitidis* grupo A entre indivíduos vacinados e não vacinados em função da imunidade de rebanho induzida pela vacina (ALI *et al.*, 2014; CUCCUI e WREN, 2014).

De maneira geral, as vacinas meningocócicas não estão incluídas em programas de vacinação de rotina na América Latina, apesar de serem utilizadas nas campanhas de vacinação em massa para controlar surtos e epidemias. Uma exceção é o programa de vacinação infantil de rotina implementado em Cuba desde a década de 1980, onde são administradas as vacinas meningocócicas polissacarídica contra o grupo C e a vacina proteica contra o grupo B (VA-MENGOC-BC[®]). Embora esta última tenha sido utilizada no controle de surtos em outros países da América Latina como Colômbia, Brasil, Uruguai e Argentina, o seu potencial para o uso rotineiro fica comprometido devido à limitação da resposta imunológica desenvolvida e à falta de evidência de proteção em crianças com idade inferior a dois anos (SÁFADI *et al.*, 2013).

No Brasil, até o mês de outubro de 2010, a vacina meningocócica C conjugada era utilizada apenas em clínicas privadas, para controle de surtos e em pacientes de risco nos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIEs). A partir do final de 2010, em função das elevadas taxas e incidência de doença meningocócica causada pelo grupo C e dos surtos reportados em diferentes regiões, o país tornou-se o primeiro da América Latina a

introduzir a vacina conjugada contra o meningococo C no calendário de vacinação da criança do Programa Nacional de Imunizações (PNI). A decisão do Ministério da Saúde baseou-se na situação epidemiológica relatada no país naquele período, quando 80 % dos casos de doença meningocócica identificados eram associados ao grupo C, seguido pelos grupos B (15 %), W135 e Y (5 % cada). Os coeficientes de incidência eram estáveis, com cerca de 1,6 casos para cada 100.000 habitantes e 40 % a 50 % dos casos notificados em crianças menores de 5 anos de idade, sendo os maiores coeficientes de incidência da doença observados em lactentes, no primeiro ano de vida (SÁFADI, 2014). A vacina é proveniente do acordo de transferência de tecnologia entre o laboratório produtor (Novartis – atual GSK) e o laboratório público, Fundação Ezequiel Dias (Funed), em que foi estabelecido que a Novartis/GSK será o fornecedor da vacina (Menjugate®) até que tenha ocorrido a transferência total da tecnologia para a Funed. O esquema de vacinação preconizado para os lactentes foi de duas doses, aos 3 e 5 meses, com uma dose reforço aos 12 meses de idade. As crianças entre 12 e 23 meses de idade recebem uma dose da vacina, não havendo naquele momento inclusão de crianças acima de 2 anos de idade e adolescentes no programa de vacinação de rotina. Todas as vacinas do PNI no Brasil são totalmente financiadas pelo governo e a cobertura para as duas doses primárias foi de, aproximadamente, 85 % no final de 2011, chegando a 90 % - 95 % em 2012 e 2013 (SÁFADI *et al.*, 2012; SÁFADI *et al.*, 2014).

Dados iniciais (2011 e 2012) referentes ao impacto da vacina demonstraram uma redução de 50 % nas taxas de incidência de doença meningocócica em crianças com idade inferior a dois anos, grupo etário alvo para vacinação. Esses dados foram baseados no número de casos anuais confirmados de doença meningocócica relatados pelo SINAN e da população estimada em cada faixa etária, fornecido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Nenhum impacto inicial foi observado em outras faixas etárias, principalmente os adolescentes, como reflexo da inexistência de uma campanha que contemple este grupo, frequentemente relacionado com o estado de portador nasofaríngeo e que é passível de transmitir a bactéria (Tabela 4) (SÁFADI *et al.*, 2014; DE MORAES *et al.*, 2015).

Tabela 4: Taxas de incidência da doença meningocócica no Brasil, antes e após a introdução da vacina conjugada contra o meningococo C. Adaptado de SÁFADI *et al.* (2014)

Faixa etária	Taxa de incidência (casos / 100.000 habitantes)				
	2008 – 2010	2011	Redução	2012	Redução
	(pré-vacina)		(95% IC)		(95% IC)
< 1	13,5	10,8	20% (14-27)	7,9	42% (34-49)
1	7,2	4,2	42% (31-51)	2,9	60% (48-71)
2	5,8	5,1	12% (2-21)	2,5	57% (44-69)
3	5,5	5,6	-	4,0	27% (17-38)
4	4,2	5,1	-	4,5	-
5 – 9	2,7	2,9	-	2,7	-
10 – 14	1,9	1,8	-	1,8	-
15 – 19	1,4	1,7	-	1,6	-
20 – 29	0,8	0,9	-	0,8	-
30 – 39	0,6	0,6	-	0,7	-
40 – 49	0,6	0,7	-	0,8	-
50 – 59	0,5	0,7	-	0,6	-
≥ 60	0,4	0,6	-	0,5	-
Total	1,2	1,47	-	1,30	15% (12-17)

A vacinação de rotina das crianças menores de 2 anos de idade, que representam o grupo etário onde se observa os maiores coeficientes de incidência da doença no Brasil, antecipa um impacto imediato, com redução importante da morbidade e da mortalidade associadas a essa doença nesse grupo etário. No entanto, as constatações, tanto da ausência de títulos de anticorpos protetores poucos anos após a vacinação em lactentes e crianças pequenas como da limitação do mecanismo da memória imunológica em mantê-los protegidos na ausência de títulos de anticorpos circulantes associados à proteção (GARRIDO-ESTEPA, *et al.*,

2014), no cenário atual do país, onde não se espera a ocorrência do importante efeito da proteção de rebanho, sinalizam a necessidade de um esquema de imunização com o objetivo de garantir a proteção contra a doença meningocócica durante a infância e a adolescência. Neste sentido, está se tornando bastante claro que o controle da doença meningocócica do grupo C no Brasil exigirá a implementação de estratégias de vacinação em massa na população adolescente (grupos etários específicos terão de ser definidos e vacinados, e o impacto bem monitorado) (SÁFADI *et al.*, 2015). A partir do momento que for possível observar o efeito de imunidade de rebanho na população, o que provavelmente só ocorrerá com a ampliação da vacinação a outros grupos etários, a necessidade de manter as doses reforço para a proteção individual de crianças e adolescentes poderá ser revista.

Em resumo, a introdução das vacinas conjugadas ainda é considerada um sucesso no combate à doença meningocócica, como consequência da sua eficácia na indução da imunidade de rebanho. Não há, pelo menos até o momento, informações sobre a ocorrência de falhas vacinais, seja devido à mudança de cápsula por parte da bactéria, ou seja, a aquisição de uma nova cápsula pela cepa patogênica original, ou devido à substituição da cepa original por outra, genética e antigenicamente distinta. A elevada eficácia dessas vacinas parece ser consequência de vários fatores, incluindo a indução de imunidade de longa duração efetiva contra o estado de portador (MAIDEN, 2013).

3.5 MÉTODOS DE CONJUGAÇÃO

As técnicas para a obtenção de vacinas conjugadas variam de acordo com o tipo de proteína e de polissacarídeo utilizado, principalmente em função dos grupamentos químicos presentes na estrutura dessas moléculas. Os produtores de vacinas optam, frequentemente, por reduzir, através de reações químicas, o tamanho do polissacarídeo gerando oligossacarídeos. No caso, o tamanho do oligossacarídeo depende da reação química efetuada com o polissacarídeo, a qual deve ser acompanhada através de metodologias específicas. Isto permite avaliar com maior segurança, a reprodutibilidade desta parte do processo de conjugação (JÓDAR *et al.*, 2004).

Para a produção das vacinas conjugadas entre a proteína e o glicídio são empregados, preferencialmente, métodos de conjugação que não utilizem espaçadores entre os dois componentes a serem conjugados, como os métodos relacionados ao uso da carbodiimida e da aminação redutiva (HERMANSON, 2008). O método de conjugação utilizando a carbodiimida, empregado para o desenvolvimento da primeira vacina conjugada contra a infecção causada por Hib, caracteriza-se pela obtenção de conjugados com ligações múltiplas entre dois antígenos polifuncionais (SCHNNERSON *et al.*, 1980), enquanto que no método de aminação redutiva, a proteína carreadora é polissubstituída com cadeias de glicídio, originando uma estrutura denominada de neoglicoproteína (JONES e RAVENSCROFT, 2008).

A conjugação química entre um polissacarídeo e uma proteína não ocorre geralmente, de maneira direta, sendo necessária a geração de grupamentos reativos que, normalmente, encontram-se distribuídos aleatoriamente na estrutura do polímero (ASTRONOMO e BURTON, 2010; CUCCUI e WREN, 2014). No caso da obtenção da vacina contra Hib, a modificação química empregada no polissacarídeo capsular consiste de uma ativação com o brometo de cianogênio (CNBr), e produção de um isocianato intermediário que, em seguida reage com a di-hidrazida do ácido adípico (ADH), resultando na introdução de grupos amina (NH₂) na molécula glicídica. Isto possibilita a ligação covalente entre o derivado glicídico e os grupamentos carboxílicos da proteína (resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico), previamente ativados pela carbodiimida (EDAC - *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), na etapa subsequente de conjugação (CHU *et al.*, 1983; LINDBERG, 1999). Um dos problemas dessa estratégia de conjugação é o grande número de grupos reativos gerados desnecessariamente na proteína e no polissacarídeo (LINDBERG, 1999; HERMANSON, 2008). O uso de moléculas bifuncionais, como a ADH, pode produzir um entrelaçamento entre as moléculas do polissacarídeo, criando estruturas de alto peso molecular, conforme mostra a Figura 7. A carbodiimida produz uma série de produtos secundários, devido à reatividade e instabilidade do intermediário formado. Todos estes fatores podem induzir a obtenção de estruturas antigênicas novas e

indesejáveis na molécula do conjugado, além de uma vacina que pode apresentar potência variável (HERMANSON, 2008).

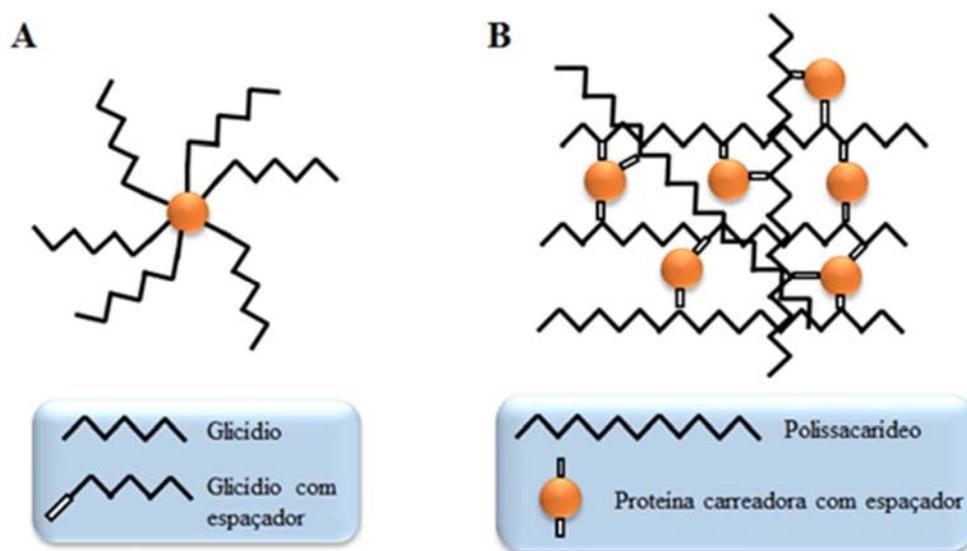


Figura 7: Representação de diferentes tipos estruturais de vacinas conjugadas. (a) Vacina neoglicoconjugada obtida através da ativação do glicídio com periodato de sódio e conjugação com a proteína carreadora via aminação reductiva, (b) Vacina conjugada obtida através de uma rede de ligações cruzadas, com alto peso molecular (conjugação via carbodiimida). Adaptado de: JONES (2005).

Atualmente, o CNBr tem sido substituído pelo reagente 1-ciano-4-dimetilaminopiridina tetraflouoroborato (CDAP), que reage diretamente com o polissacarídeo, resultando na substituição de grupos hidroxila, abundantes na cadeia glicídica, por grupos ciano, e na formação de um cianoéster bastante reativo. A formação deste composto é altamente dependente do pH e a eficiência da reação de ativação do polissacarídeo é maior em pH 9,0 a 10,0. O cianoéster formado reage com os grupamentos ϵ -lisina da proteína dando origem a uma ligação estável *O*-alquil-isourea. Para finalizar a reação utiliza-se um reagente que contenha grupos amina, como por exemplo, a glicina para consumir o excesso de polissacarídeo (FRASCH, 2009).

O método de aminação redutiva foi empregado pela primeira vez para a obtenção de glicoconjugados em 1981, quando Jennings & Lugowski conjugaram algumas proteínas como a albumina sérica bovina (BSA) e a TT aos polissacarídeos meningocócicos grupos A, B e C. A formação da ligação covalente entre as moléculas foi possível devido à introdução prévia de grupamentos aldeído no polissacarídeo, através de reação com o reagente meta-periodato de sódio (NaIO_4), e posterior reação do aldeído com os grupamentos amino da proteína, em presença do agente redutor ciano-borohidreto de sódio (JENNINGS e LUGOWSKI, 1981). Reações de hidrólise ácida ou alcalina também são capazes de originar grupamentos aldeído nas cadeias glicídicas e os conjugados obtidos a partir da utilização do método de aminação redutiva são caracterizados por apresentar estrutura denominada neoglicoproteína, onde a proteína encontra-se ligada a várias cadeias do glicídio ativado (Figura 7). Dentre as vantagens apresentadas por este método, estão a de ser um meio de ligação entre oligo ou polissacarídeos e os grupamentos amino de proteínas passível de ocorrer em meio aquoso e em condições reacionais brandas, resultando em uma conjugação onde as unidades monossacarídicas encontram-se mais expostas para o sistema imunológico (ROY *et al.*, 1984). O método propicia a ligação entre as duas moléculas sem a presença de um espaçador, o que é uma grande vantagem, já que alguns autores citam a dificuldade de padronização do acoplamento via espaçador, que resulta na formação de glicoconjugados com imunogenicidade variável (SHEN *et al.*, 2001).

A Figura 8 apresenta, de maneira esquemática, as etapas de obtenção de um conjugado vacinal hipotético, a partir de um polissacarídeo e uma proteína carreadora, em que é feita a ativação do polissacarídeo e, em alguns casos, também da proteína carreadora, antes da conjugação.

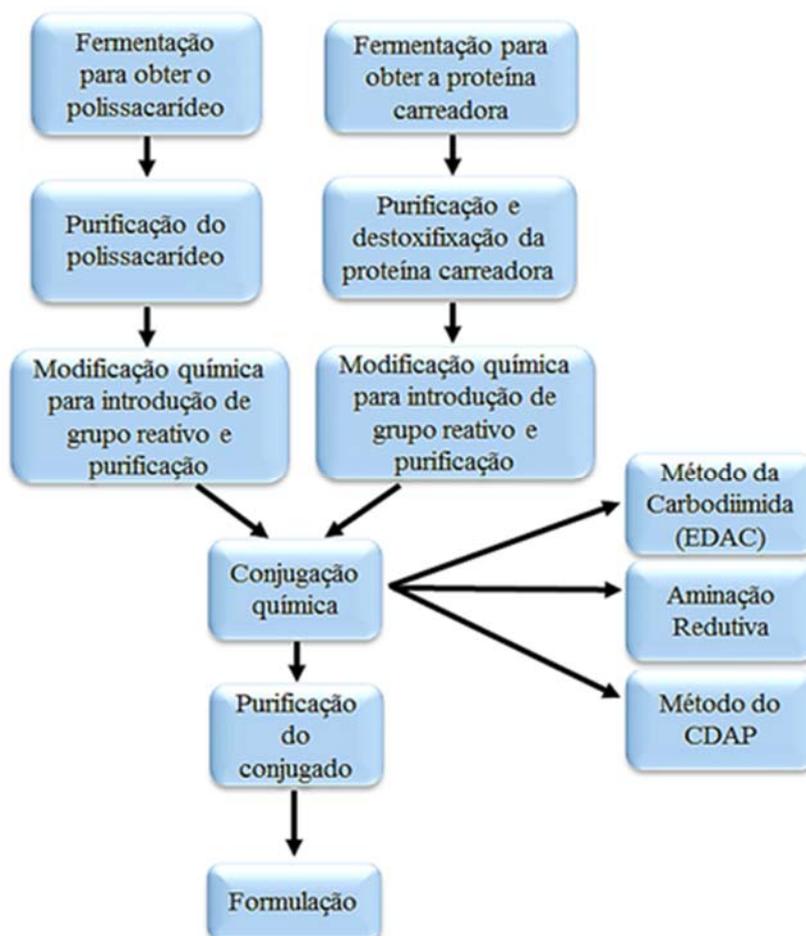


Figura 8: Etapas de obtenção de conjugados a partir de um polissacarídeo e uma proteína carreadora com a ativação do polissacarídeo e/ou da proteína carreadora antes da conjugação. Adaptado de: JOSEFSBERG e BUCKLAND (2012).

Nos últimos anos, uma nova abordagem, denominada tecnologia de acoplamento entre glicídios e proteína (“Protein Glycan Coupling Technology” - PGCT), tem sido descrita como uma alternativa viável e promissora para a obtenção de vacinas conjugadas. Através da técnica, desenvolvida a partir da caracterização do primeiro sistema de *N*-glicosilação bacteriana em *Campylobacter jejuni* é possível obter glicoproteínas recombinantes expressas em um microrganismo heterólogo e não patogênico, como por exemplo, *E. coli* (Figura 9). (TERRA *et al.*, 2012; CUCCUI e WREN, 2014).

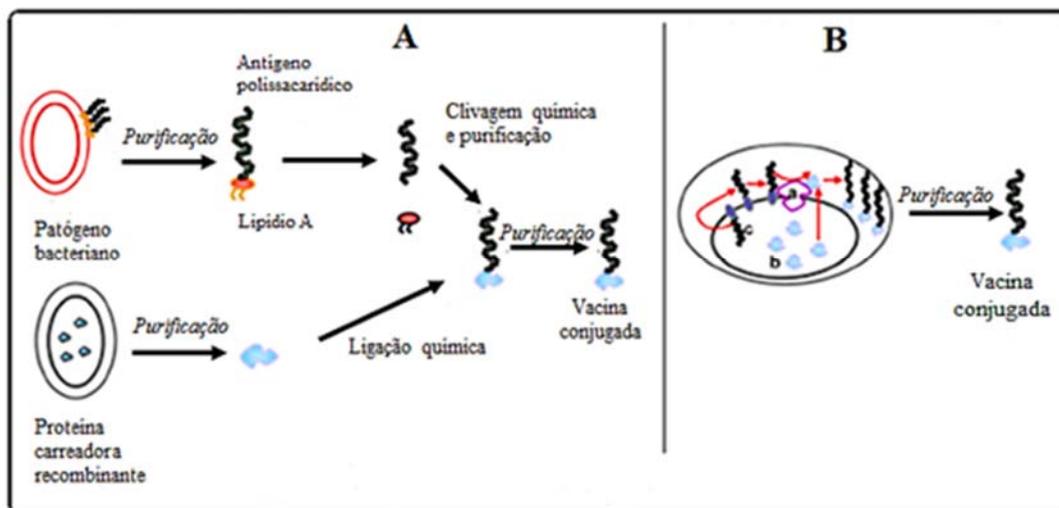


Figura 9: Esquemas de obtenção de vacinas polissacarídicas conjugadas através de síntese química (A) e utilizando a tecnologia PGTC (B). A tecnologia é versátil e permite a conjugação biológica de glicídeos bacterianos a qualquer proteína carreadora, através do acoplamento enzimático “in vivo” utilizando a via de glicosilação presente na bactéria *Campylobacter jejuni* (via *N*-glicosilação em resíduos de asparagina), em *Escherichia coli* recombinante. Adaptado de: IHSEN *et al.* (2010).

Essa tecnologia tem sido utilizada para o desenvolvimento de vacinas contra microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos e os estudos de eficácia demonstraram que as vacinas obtidas são seguras e capazes de induzir resposta imunológica robusta. Dentre as principais vantagens dessa abordagem, em comparação com os métodos convencionais de obtenção de vacinas glicoconjugadas estão: a redução do risco biológico em função da ausência de contato com o microrganismo patogênico, a redução do custo de produção, uma vez que não são realizadas as purificações da proteína e do polissacarídeo antes da etapa de conjugação, sendo necessária apenas uma etapa de isolamento e purificação (do glicoconjugado). Além disso, o sistema de produção é dito “flexível”. Uma simples troca do plasmídeo proporcionaria múltiplas combinações de glicoconjugados que poderiam ser montadas e testadas rapidamente (CUCCUI e WREN, 2014). Neste sentido, é possível que a PGTC venha a se consolidar como uma nova plataforma que representa uma

evolução do processo de produção de vacinas conjugadas utilizando métodos químicos, inaugurando uma nova era na glicoengenharia.

3.6 VACINAS MENINGOCÓCICAS LICENCIADAS

Dentre as vacinas meningocócicas conjugadas atualmente licenciadas, a Meningitec[®] (Pfizer) é obtida por meio de reação controlada entre o polissacarídeo C e o reagente NaIO₄, seguida pelo isolamento dos oligossacarídeos resultantes e, por fim, a conjugação à proteína CRM₁₉₇ através do método de aminação redutiva. A vacina Menjugate[®] (Novartis/GSK) é obtida a partir da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo C gerando oligossacarídeos, que são fracionados por tamanho molecular, previamente à conjugação com a proteína CRM₁₉₇ por meio de um éster de *N*-hidroxissuccinimida do ácido adípico. Para a produção de tais vacinas, somente os oligossacarídeos gerados, cuja cadeia contém apenas seis monômeros, são utilizados na conjugação. Para a produção da vacina NeisVac-C[®] (Baxter), o polissacarídeo C é primeiramente desacetilado através de reação com hidróxido de sódio. Segue-se uma reação de despolimerização do polissacarídeo por meio de reação com NaIO₄, o fracionamento por tamanho molecular e a conjugação com a TT através da aminação redutiva (GRANOFF *et al.*, 2012).

Com relação às vacinas tetravalentes, a Menactra[®] (Sanofi Pasteur) é preparada através da despolimerização controlada dos polissacarídeos A, C, Y, e W135, seguida da derivatização com um espaçador contendo uma di-hidrazida. Os oligossacarídeos derivatizados são conjugados de forma independente, através de ligação com grupos carboxílicos da proteína diftérica. Para a produção da vacina Menveo[®] (GSK), cada polissacarídeo é hidrolisado separadamente, a fim de gerar oligossacarídeos que são covalentemente conjugados à proteína CRM₁₉₇ pelo método de aminação redutiva. No caso da vacina Menitorix[®] (GSK), o polissacarídeo de Hib é derivatizado, por meio de reação com uma molécula contendo di-hidrazida e, posteriormente, conjugado com a TT pelo método de conjugação que utiliza a carbodiimida. O polissacarídeo C é ativado através de uma reação de cianilação e conjugado diretamente à TT através do grupo amino (GRANOFF *et al.*, 2012).

3.7 PROTEÍNAS CARREADORAS

As cinco proteínas utilizadas como carreadoras nas vacinas conjugadas licenciadas atualmente são a CRM₁₉₇, a TT, a proteína diftérica (DT), o complexo de proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* (“Outer Membrane Protein” - OMP) e a proteína D do Hib. Todas as proteínas citadas têm papel semelhante, no que diz respeito ao aumento da imunogenicidade por parte do conjugado, quando se compara com a resposta imunológica do polissacarídeo não conjugado. Contudo, cabe ressaltar que, dependendo do tipo de proteína, há diferenças marcantes no que se refere à quantidade e avidéz dos anticorpos produzidos, sendo os conjugados obtidos com a TT, os mais imunogênicos (DAGAN *et al*, 2010). Essas proteínas também diferem entre si com relação à capacidade de serem conjugadas a diferentes polissacarídeos em um mesmo produto e na possibilidade de serem administradas simultaneamente com outras vacinas (PICHICHERO, 2013).

A proteína CRM₁₉₇ é uma variante não tóxica da toxina diftérica, isolada a partir do sobrenadante de cultivo da bactéria *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β197). A diferença entre esta proteína e a toxina diftérica é uma mutação no resíduo de glicina 52 da toxina, que na CRM₁₉₇ encontra-se substituído pelo ácido glutâmico, o que elimina a atividade enzimática e, conseqüentemente, a toxicidade. Tal mutação não é capaz de comprometer a imunogenicidade da CRM₁₉₇, que é indistinguível da proteína diftérica. Outra forma de eliminar a toxicidade da toxina diftérica é através de reação com formaldeído, cujo produto é a proteína diftérica. As OMP são obtidas a partir do isolamento do complexo de proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* grupo B. A proteína D é uma proteína de superfície de *H. influenzae* não tipável, isolada originalmente, a partir do meio de cultivo contendo a bactéria. Atualmente, é obtida como proteína recombinante (PICHICHERO, 2013).

A toxina tetânica é uma potente neurotoxina produzida pela bactéria *Clostridium tetani* que possui 1315 resíduos de aminoácidos e peso molecular de cerca de 150.000. A toxina se caracteriza por apresentar uma cadeia pesada (100 kDa) ligada por uma das duas pontes dissulfeto presentes na estrutura, à cadeia leve (50 kDa), responsável pela toxicidade da

molécula (Figura 10) (KRIEGLSTEIN *et al.*, 1990; RAO *et al.*, 2005; THAYSEN-ANDERSEN *et al.*, 2007). A toxina pode ser inativada por meio de reação com formaldeído, originando a forma destoxificada (anatoxina), que apresenta estrutura secundária e terciária bastante similar à da toxina nativa, além de grande estabilidade térmica (HO *et al.*, 2002). A inativação química da proteína não compromete os sítios imunogênicos desta macromolécula, logo, não influencia sua capacidade de estimular a produção de anticorpos (THAYSEN-ANDERSEN *et al.*, 2007).



Figura 10: Estrutura tridimensional da cadeia leve da toxina tetânica. Fonte: RAO *et al.*, 2005.

3.8 CONJUGAÇÃO UTILIZANDO HIDRAZINA

Os métodos de conjugação utilizam, geralmente, ou os grupos carboxila dos ácidos glutâmico e aspártico ou as aminas primárias de resíduos de lisina das proteínas. No entanto, a destoxificação por meio de tratamento com formaldeído pode comprometer a disponibilidade dos resíduos de lisina da proteína (THAYSEN-ANDERSEN *et al.*, 2007).

Apesar dessa limitação, a proteína tetânica tem sido frequentemente usada como proteína carreadora em vacinas conjugadas, por ser altamente imunogênica (DAGAN *et al.*, 2010).

As condições reacionais para a clivagem oxidativa durante a reação entre o NaIO_4 e o polissacarídeo C utilizadas neste trabalho, promovem não só a ativação da molécula glicídica, a partir da introdução dos grupamentos aldeído, como também a sua despolimerização. A reação de conjugação pelo método de aminação redutiva caracteriza-se pela redução da imina formada entre o aldeído do polissacarídeo e a amina da proteína. A formação da imina ocorre lentamente em uma reação cujo equilíbrio não é favorável. Para contornar esta desvantagem foi desenvolvido um método em que os grupos carboxílicos da TT foram derivatizados através de reação com hidrazina. Os grupos hidrazidas formados apresentam maior reatividade do que as ϵ -aminas livres das lisinas, que eventualmente foram comprometidas pelo processo de destoxificação com formaldeído (Lee *et al.*, 2009; LAFERRIERE *et al.*, 2011; RANA *et al.*, 2015). Alguns autores relatam que o baixo valor de pKa das hidrazidas (pKa 2,6) comparado com o valor de pKa das aminas primárias (pKa 9 – 10) permite que, em condições levemente ácidas, as hidrazidas sejam ligadas aos grupamentos aldeído, preferencialmente a outros sítios contendo grupamentos amino (HEINDEL *et al.*, 1990).

O método de conjugação de proteínas a diversos ligantes, a partir da formação de hidrazona vem sendo utilizado há algum tempo. Alguns estudos citam a utilização de glicoproteínas contendo grupamentos aldeído que foram gerados após serem submetidas a uma oxidação química ou enzimática. Tais grupamentos foram conjugados a compostos contendo grupos hidrazidas e, de acordo com os autores, esta química foi explorada para permitir a conjugação de agentes anticancerígenos contendo grupamentos hidrazida a carbonilas de aldeído (CHO) (KING *et al.*, 1986). Estas carbonilas são muitas vezes geradas através da oxidação de unidades de glicídio presentes em glicoproteínas, como na molécula de um anticorpo, por exemplo. Além disso, as acil-hidrazonas geradas são consideravelmente mais resistentes à hidrólise e dispensam a etapa de redução para garantir a estabilidade da molécula (HEINDEL *et al.*, 1990). Outra importante observação desses autores é a de que o grau de substituição na molécula resultante da reação de conjugação entre a hidrazida e os

grupos aldeído é dependente da razão entre os reagentes, expressa em termos de número de moles de hidrazida por mol de grupos aldeído presentes na molécula do glicídio, bem como do método de purificação empregado. Tal fato foi também relatado por Te Piao King *et al.*, (1986), que observaram o maior rendimento em hidrazona, proporcionalmente ao aumento da razão molar entre os dois reagentes (hidrazida e grupos aldeído) (KING *et al.*, 1986).

Heindel *et al.* (1990) ressaltaram ainda a importância da purificação do produto resultante da reação entre glicídios e o NaIO₄. Segundo eles, é essencial remover o iodato ou periodato residual previamente à reação com a hidrazida, já que esta reação não ocorre quando impurezas residuais oriundas da reação oxidação estão presentes. Tais autores sugeriam que o processo de purificação por UF, além de ser mais rápido, quando comparado com a diálise ou a cromatografia de troca aniônica, resultava em maior rendimento em termos do conjugado obtido (HEINDEL *et al.*, 1990).

3.9 CARACTERÍSTICAS DO PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

A disponibilidade das vacinas para uso em humanos depende de fatores que envolvem desde os métodos complexos de produção e controle da qualidade, até a necessidade de uma rede de distribuição eficiente, capaz de assegurar que produtos eficazes estejam ao alcance do público-alvo. Além disso, as tecnologias utilizadas para a fabricação de diferentes tipos de vacinas podem afetar os custos de produção, a facilidade do escalonamento, a estabilidade e, em última instância, também, a sua disponibilidade para a população (SMITH *et al.*, 2011).

A eficácia de vacinas provenientes de diferentes produtores, tendo como alvo o mesmo agente causador da doença pode variar, dependendo do modo de fabricação e da via de administração. Em geral, vacinas contendo o microrganismo inteiro induzem resposta imunológica mais potente, entretanto, podem oferecer maiores riscos relativos à segurança, quando comparadas com as vacinas inativadas ou as de subunidades (SALINSKY e WERBLE, 2006).

Embora as vacinas e os medicamentos terapêuticos sejam classificados como produtos farmacêuticos, existem algumas diferenças relacionadas principalmente à disponibilidade, acessibilidade e o impacto econômico, que devem ser consideradas. De maneira geral, os medicamentos são produtos farmacêuticos constituídos por ingredientes farmacêuticos ativos com composição e estrutura química definidas, que são normalmente usados para o tratamento de doenças. As vacinas, por sua vez, são produtos farmacêuticos obtidos a partir de, ou constituídos de sistemas vivos, portanto, de difícil padronização que apresentam elevada complexidade no que diz respeito à composição molecular. Uma diferença importante entre o desenvolvimento de vacinas preventivas e o de medicamentos terapêuticos é que as vacinas são normalmente administradas não só para grandes populações, mas também para indivíduos saudáveis, com o objetivo de proteger contra a doença que possa acontecer no futuro. Soma-se a isso, a maior complexidade do processo de produção e a necessidade de um número maior de testes referentes ao controle de qualidade das vacinas em relação aos produtos farmacêuticos, em geral, devido à menor tolerância ao risco e também pela necessidade de testar o produto por meio de um processo que represente adequadamente a população para a qual a vacinação se destina (LEROUX-ROELS *et al.*, 2011; GEIGERT, 2013).

O desenvolvimento de vacinas envolve muitas etapas até que se tornem produtos licenciados. De maneira geral, o tempo necessário desde o início do desenvolvimento até o seu licenciamento pode ser muito superior a 10 anos, considerando as etapas de pesquisa básica, pré-clínicas, clínicas e de pós-licenciamento (farmacovigilância) (Figura 11) ((LEROUX-ROELS *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2012; PIMENTEL *et al.*, 2013).

Assim como os demais produtos farmacêuticos, as vacinas necessitam de aprovação por parte das agências regulatórias a fim de que possam ser comercializadas. Para garantir essa aprovação, os fabricantes devem realizar pesquisas pré-clínicas, em animais, e clínicas, em humanos, que comprovem a segurança e eficácia dos seus produtos. Os testes pré-clínicos se referem a todas as atividades requeridas pelas agências regulatórias para comprovação da eficácia e segurança de novos compostos, após sua descoberta científica, mas antes de serem testados em humanos. O principal objetivo nessa etapa de desenvolvimento é a

avaliação toxicológica e a investigação dos efeitos adversos em organismos vivos. A importância desses testes se deve, particularmente, à grande probabilidade de que um composto em desenvolvimento com problemas de segurança ou eficácia seja descartado ainda nessa etapa. Entre a elaboração das formulações e os testes pré-clínicos, a chance de novos compostos chegarem ao mercado é inferior a 1 %, resultando na eliminação de “candidatos” inapropriados antes que sejam feitos muitos investimentos no composto. A realização de um teste pré-clínico com qualidade e eficiência significa redução expressiva dos custos de descoberta de uma nova molécula (PIERONI *et al.*, 2009).

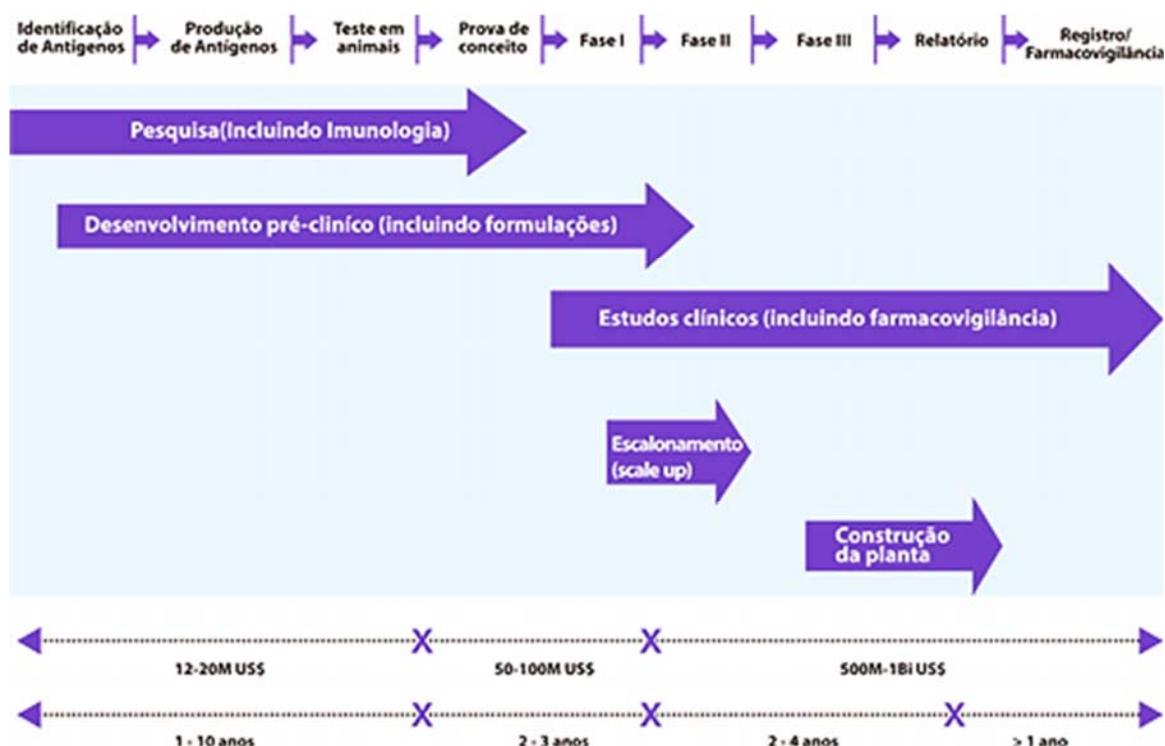


Figura 11: Processo de desenvolvimento de vacinas: O processo de desenvolvimento de uma vacina pode ser demorado e envolve muitos passos que incluem controles e regulamentações. De maneira geral é dividido em quatro etapas: pesquisa básica, pré-clínica, clínica e de pós-licenciamento (farmacovigilância), necessárias para garantir a segurança e imunogenicidade / eficácia do produto final licenciado. Adaptado de: BARBOSA (2009).

Depois de serem exaustivamente testadas em um modelo animal, preparações biológicas candidatas a vacinas que demonstraram, em uma etapa pré-clínica, serem seguras e capazes de induzir resposta imunológica, podem avançar para testes clínicos em humanos. Consequentemente, um dos principais desafios enfrentados dentro do ambiente de pesquisa no campo de vacinas é a exigência de recrutar voluntários saudáveis para a realização de ensaios clínicos (WHO, 2004; BIOTECANADA, 2010).

Os ensaios clínicos são testes desenhados para determinar segurança, eficácia, dose e eventos adversos de longo prazo em função do uso em humanos. Os testes são conduzidos, em geral, em três Fases antes do registro do novo produto e uma Fase posterior ao registro, que se caracterizam por envolver quantidade crescente de voluntários sadios. Sua execução deve se dar sob normas éticas e sanitárias internacionalmente harmonizadas e aceitas, definidas como Boas Práticas Clínicas (BPC). O custo total e o tempo necessário são crescentes a cada etapa, principalmente em função da ampliação do tamanho da amostra de voluntários. Entretanto, as etapas iniciais envolvem maior desafio tecnológico, com destaque para as Fases I e II, quando se definem a dose do novo produto e a eficácia de sua ação (GOMES *et al.*, 2012; PIMENTEL *et al.*, 2013). Os estudos clínicos de Fase I visam reunir dados preliminares sobre a tolerância/segurança da vacina em um número restrito de voluntários (20 a 100) adultos sadios (WHO, 2004; PIERONI *et al.*, 2009; BIOTECANADA, 2010; LEROUX-ROELS *et al.*, 2011). Nos estudos clínicos de Fase II são realizados testes em um número maior de voluntários (100 a 200) para validar os dados de segurança e imunogenicidade gerados nos estudos de Fase I, além de obter informações mais precisas sobre a relação da magnitude da resposta imunológica em função da dose e/ou dos intervalos entre as doses. Embora os dados gerados possam fornecer boa informação sobre a eficácia da vacina candidata, eles são muito imprecisos para garantir o licenciamento, sendo necessários estudos adicionais antes da aprovação ser concedida (WHO, 2004; PIERONI *et al.*, 2009). O sucesso nesta fase permite que se passe à Fase III dos estudos, onde é avaliado um número muito maior (1000 a 5000) e mais diversificado de voluntários com o objetivo de validar dados de segurança e imunogenicidade gerados nos estudos de Fase I e II. Os estudos clínicos de Fase III também têm como objetivo medir a

eficácia e segurança da vacina nos indivíduos vacinados com o produto em questão em relação a um grupo controle (WHO, 2004; PIERONI *et al.*, 2009; LEROUX-ROELS *et al.*, 2011). Os participantes do estudo devem ser monitorados ao longo do tempo para determinar se a resposta imunológica desencadeada pela vacina realmente confere proteção contra a doença, uma vez que considerações éticas impedem a realização de um teste de desafio da doença, ou seja, a exposição intencional ao agente causador da doença. O número de participantes em tais ensaios precisa ser muito grande, especialmente no caso das vacinas contra os agentes etiológicos causadores de doenças que são relativamente incomuns. Os ensaios de Fase III também procuram provar a relação entre a proteção contra a doença e a presença de marcadores de resposta do sistema imunológico, como por exemplo, os níveis de anticorpos. O estabelecimento de tais relações permite que estudos posteriores se concentrem sobre esses biomarcadores, reduzindo o tempo necessário para observar a incidência da doença (LEROUX-ROELS *et al.*, 2011).

Para garantir a confiabilidade dos resultados, o lote do produto utilizado nos ensaios de Fase III deve ser representativo dos lotes que serão comercializados. Assim, a escala de produção em todas as etapas de fabricação deve estar estabelecida, de modo que a vacina utilizada para estes estudos seja produzida de acordo com os processos destinados à obtenção do produto na escala industrial. Os custos de desenvolvimento de vacinas, especialmente àqueles relacionados aos ensaios de Fase III, são geralmente, muito maiores do que para os demais produtos farmacêuticos, porque as vacinas são administradas em um grande número de pessoas saudáveis e a rigidez das agências regulatórias para com os riscos à saúde associados a estes produtos tende a ser extremamente alta (WHO, 2004; GEIGERT, 2013).

Se uma vacina candidata é considerada eficaz em ensaios clínicos de Fase III, a próxima etapa é apresentar aos órgãos regulatórios um pedido de registro e licenciamento para a comercialização da vacina. Este é o mecanismo legal para garantir que a eficácia / segurança da vacina esteja adequada para o uso, ou seja, é a maneira de assegurar o acesso da população a produtos de qualidade. A preocupação com a qualidade, que é importante para todos os medicamentos, é crítica para as vacinas, por serem administradas

em indivíduos saudáveis de todas as faixas etárias (LEROUX-ROELS *et al.*, 2011). O registro sanitário é um dos instrumentos que a vigilância sanitária dispõe para controlar a entrada em circulação de todos os medicamentos. Constitui a avaliação dos estudos realizados com uma substância ativa, suas características químico-farmacêuticas, especificações e a capacidade de produção da empresa, visando conceder a autorização para sua comercialização. Para obtê-lo, todas as informações sobre o medicamento e suas fases de desenvolvimento devem ser compiladas em formulários específicos, que são submetidos à agência para aprovação. Em geral, esse processo leva de um a dois anos e o produto deve ser registrado em cada um dos países em que será comercializado (PIERONI *et al.*, 2009). No Brasil, o registro de produtos biológicos, incluindo vacinas é atualmente regulamentado pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA nº 55, de 16 de dezembro de 2010, que dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos no país, visando garantir a qualidade, segurança e eficácia (BRASIL, 2010).

Os estudos clínicos de Fase IV (farmacovigilância) são realizados após a aprovação regulamentar, para avaliar a segurança em longo prazo e eficácia da vacina, bem como os efeitos sociais e econômicos promovidos por ela. Nos estudos de Fase IV, acompanha-se o produto já no mercado para avaliar possíveis efeitos colaterais desencadeados por interações com outras medicações, por exemplo, em função da sua ampla utilização (PIERONI *et al.*, 2009; LEROUX-ROELS *et al.*, 2011). Vale ressaltar que todas as vacinas produzidas para testes em humanos devem ser fabricadas de acordo com as boas práticas de fabricação (BPF) e os ensaios clínicos, incluindo ensaios de Fase IV, são realizados em conformidade com os princípios de BPC (BARBOSA, 2009; BIOTECANADA, 2010).

O grande número de casos de doença meningocócica causada pelo grupo C atualmente no Brasil, levou o PNI a introduzir, no segundo semestre de 2010, uma vacina meningocócica C conjugada, produzida por um laboratório multinacional, no calendário nacional de vacinação somente para crianças menores de 2 anos. Entretanto, existe uma demanda nacional de cerca de 20 milhões de doses anuais para a proteção de milhares de crianças, adolescentes e adultos jovens brasileiros, contra a infecção causada pela *N. meningitidis* grupo C. Esta demanda sinaliza a necessidade de utilização das vacinas produzidas por

mais de um produtor. Sendo assim, é crucial a necessidade do escalonamento da produção da nova vacina meningocócica C conjugada, já que a capacidade de obtenção no estágio atual (escala piloto) não atenderia à demanda do PNI.

3.10 ESCALONAMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE VACINAS CONJUGADAS UTILIZANDO PERMEAÇÃO EM MEMBRANAS

Muitos fatores, tais como os rendimentos totais de produção, custos, eficiência, tempo, o conhecimento do processo, experiência adquirida, disponibilidade de equipamentos e a conformidade com as BPF desempenham um papel importante no escalonamento de um processo produtivo. O emprego de estratégias e metodologias adequadas nesta etapa pode ser consideravelmente benéfico para a operação bem sucedida e econômica do sistema em grande escala que está sendo modelado (BALL, 2000; BUCKLAND, 2005; BAART *et al.*, 2007).

As autoridades regulatórias buscam por evidências de que as tecnologias utilizadas na escala laboratorial, durante o desenvolvimento de um novo produto, estejam relacionadas com aquelas utilizadas na produção em escala industrial e os métodos que comprovam a possibilidade de escalonamento da metodologia utilizada dependem grandemente da tecnologia empregada. Assim, faz-se necessário estabelecer os parâmetros físicos e / ou físico-químicos considerados importantes para a avaliação do escalonamento. Por exemplo, no caso da operação unitária de filtração tangencial, utilizada no presente trabalho de tese para a purificação dos componentes intermediários e conjugados, os fatores que influenciam o desempenho do processo são a pressão transmembrana (TMP), a velocidade tangencial de escoamento (isto é, a velocidade do fluido ao longo da superfície da membrana) e o comprimento do percurso, que é a distância que o fluido percorre à medida que flui transversalmente à membrana. Para os estudos de escalonamento é importante manter esses parâmetros constantes desde a pequena escala até a produção em grande escala (BALL, 2010).

Após a reação de conjugação, é necessária uma etapa de purificação para remover a proteína e o polissacarídeo que não reagiram, além de reagentes residuais e compostos de

baixo peso molecular gerados (AUNINS *et al.*, 2000). Esta é uma etapa muito importante do processo de produção de vacinas conjugadas; logo, o emprego de métodos robustos e econômicos para este fim é extremamente desejável (RAY, 2011). A necessidade de redução dos custos de produção em diferentes escalas requer o desenvolvimento de tecnologias de separação que apresentem alta taxa de transferência e seletividade e os sistemas de purificação empregando membranas permeáveis têm o potencial para superar esses desafios (VAN REIS e ZYDNEY, 2001).

Os processos de separação com membranas (PSM) atingiram o “status” de processos comerciais devido a uma série de vantagens inerentes a esta tecnologia, tais como: economia de energia; seletividade; aplicabilidade na separação de compostos termolábeis, além da simplicidade de operação e escalonamento. Em geral, esta tecnologia opera à temperatura ambiente, podendo ser aplicada no fracionamento de misturas contendo substâncias termo sensíveis. Ao contrário da maioria dos processos de separação, os PSM apresentam, ainda, a vantagem de serem extremamente simples do ponto de vista operacional e em termos de escalonamento. Os sistemas são modulares e os dados para o escalonamento do processo podem ser obtidos a partir de equipamentos piloto operando com módulos de membranas com a mesma dimensão daqueles utilizados industrialmente (HABERT *et al.*, 2006; RATHORE e SHIRKE, 2011).

Embora os PSM como a diálise e a microfiltração (MF) já fossem conhecidos e utilizados em pequena escala, desde 1930, eles não evoluíram para uma escala industrial mais sólida devido, principalmente, aos baixos fluxos permeados resultantes das elevadas espessuras das membranas disponíveis. Somente no final da década de 50, quando os EUA decidiram investir em projetos de pesquisa que tinham por objetivo principal a dessalinização de águas, os PSM saíram da esfera de laboratório para se tornarem operações industriais. Tais projetos resultaram na melhoria da seletividade das membranas e na redução da resistência ao transporte das espécies permeadas, o que tornaram os PSM, em muitos casos, mais competitivos do que os processos de separação tradicionais (HABERT *et al.*, 2006).

As membranas podem ser definidas como uma fase permeável ou semipermeável, geralmente constituída de fina camada de sólido polimérico, que restringe a locomoção de determinadas espécies. Esta barreira, que controla o transporte de massa através de sua superfície, fornece duas correntes distintas: 1) o fluido que atravessa a membrana, chamado de filtrado ou permeado, e 2) o fluido que permanece ao lado da alimentação que contém os solutos (ou sólidos suspensos) maiores que o tamanho dos poros da membrana, chamado de concentrado ou retido (REZZADORI, 2010). As membranas podem ser feitas a partir de polímeros orgânicos ou inorgânicos, bem como a partir de materiais como vidro, metais e cerâmicas, ou até mesmo líquidos. Exemplos de material polimérico (ou orgânicos) constituintes das membranas incluem aqueles feitos a partir de celulose, acetato de celulose, polisulfona, polietersulfona, poliamidas, fluoreto de polivinilideno e poliacrilonitrila. As membranas inorgânicas podem ser feitas a partir de materiais cerâmicos, vidro, carbono pirolizado e aço inoxidável (GHOSH, 2006; HABERT *et al.*, 2006; RATHORE e SHIRKE, 2011).

As membranas microporosas separam os contaminantes insolúveis de soluções, processo chamado de “clarificação”, podem remover totalmente os microrganismos do ar ou de soluções, processo chamado de “esterilização”, além da separação (fracionamento), diálise ou concentração de macromoléculas (GRONEMEYER *et al.*, 2014). Para que ocorra o transporte de uma espécie através de uma membrana é necessária uma força motriz agindo sobre ela (GHOSH, 2006; HABERT *et al.*, 2006; RATHORE e SHIRKE, 2011). Os processos comerciais de separação com membranas utilizam como força motriz o gradiente de potencial químico e/ou o gradiente de potencial elétrico. Como os PSM são, em sua maioria atômicos, o gradiente de potencial químico pode ser expresso, apenas, em termos do gradiente de pressão e/ ou de concentração (ou pressão parcial). Em função da morfologia da membrana e do tipo de força motriz empregada, o transporte das diferentes espécies através desta pode ocorrer tanto pelo mecanismo de convecção, como pelo mecanismo de difusão. O transporte por convecção ocorre em função da TMP, portanto os processos conduzidos desta maneira são também denominados de processos dirigidos por pressão. Por outro lado, o mecanismo de transporte por difusão utiliza a diferença de

concentração entre as espécies a serem transportadas através da membrana como força motriz (HABERT *et al.*, 2006; GHOSH, 2006).

Nos processos que utilizam membranas porosas a seletividade está diretamente associada à relação entre o tamanho das espécies presentes e o tamanho dos poros da membrana. Este é o caso de processos como a MF, UF, nanofiltração (NF) e a diálise. Além disso, as espécies devem ser na medida do possível, inertes em relação ao material que constitui a membrana. No caso da UF, MF e NF, para os quais a força motriz é o gradiente de pressão através da membrana, o fluxo permeado é fundamentalmente convectivo. Já no caso da diálise, a força motriz é o gradiente de concentração das espécies através da membrana e o fluxo de permeado é de natureza difusiva, ou seja, as espécies se difundem, através dos poros das membranas, no meio em que se encontram (HABERT *et al.*, 2006).

Os PSM que utilizam gradiente de pressão através da membrana como força motriz, têm sido utilizados para concentrar, fracionar e purificar soluções diluídas, em particular, soluções aquosas. Em função da natureza e do tipo de solutos e da presença ou não de partículas em suspensão, membranas com diferentes tamanhos e distribuição de poros ou mesmo densas, são empregadas, caracterizando os processos conhecidos como MF, UF e osmose inversa. A nanofiltração define um processo com membranas capaz de efetuar separações de moléculas de massa molecular média entre 500 e 2000 Dalton. Na Figura 12 são apresentadas as principais características dos PSM que utilizam a diferença de pressão como força motriz (HABERT *et al.*, 2006).

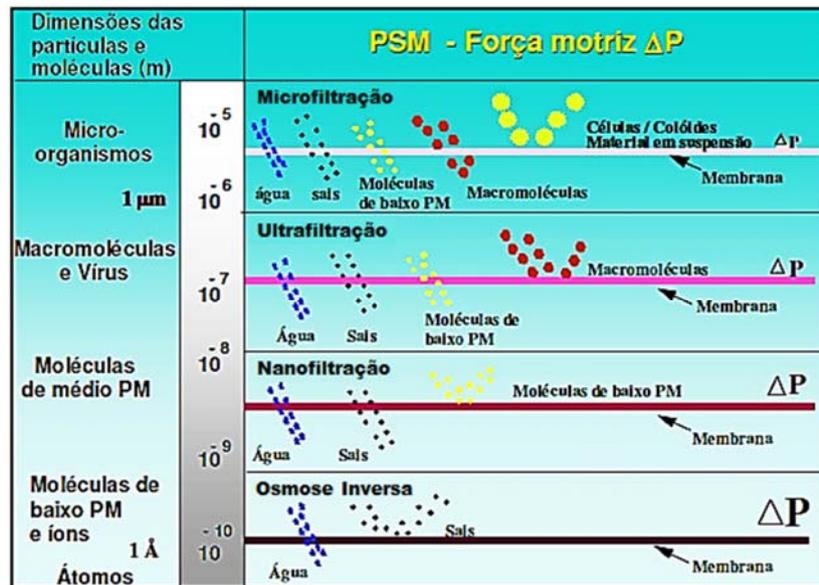


Figura 12: Principais características dos processos que utilizam diferença de pressão como força motriz. Adaptado de: HABERT *et al.* (2006).

A filtração convencional, ou filtração com fluxo normal (“dead-end filtration” ou “normal flow filtration” - NFF) e a filtração com fluxo tangencial (TFF) são os dois principais modos de filtração com membranas. A diferença entre eles é o fluxo contínuo do fluido que pode ser perpendicular (Figura 13A), ou tangencial à membrana (Figura 13B).

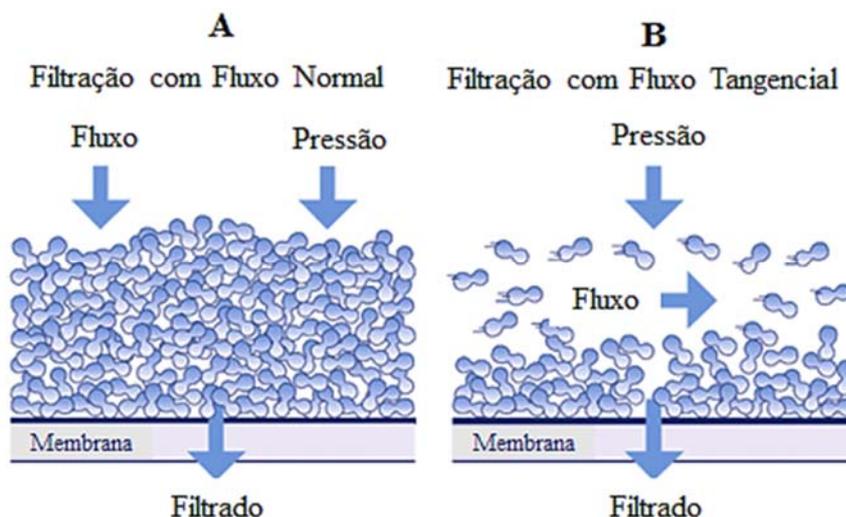


Figura 13: Modelo esquemático de representação dos tipos de filtração: (A) Filtração com fluxo normal (NFF) e (B) Filtração com fluxo tangencial (TFF). Adaptado de: Technical Brief, Millipore Publication, 2003, Disponível em: http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/MILLIPORE_TFF.pdf.> (Acesso em 26/07/2016)

Na filtração com fluxo normal, o fluido escoava perpendicularmente à superfície da membrana sob uma pressão aplicada. As partículas de maior diâmetro não atravessam a membrana e acumulam na sua superfície, o que resulta numa diminuição considerável do fluxo de permeado, sendo uma desvantagem operacional. Já na TFF, o fluido é bombeado tangencialmente ao longo da superfície da membrana. Assim como na filtração convencional, as partículas e macromoléculas que são maiores que os poros de membrana são retidas sem acumular na superfície da membrana, pois as altas velocidades de fluxo possibilitam o arraste dos solutos que tendem a se acumular na superfície (HABERT *et al.*, 2006). Nos sistemas de TFF (Figura 14), a TMP é determinada através da fórmula:

$$\Delta p = \frac{P_a + P_r}{2} - P_f$$

Onde:

Δp = queda de pressão

P_a = pressão de alimentação

P_r = pressão do retido

P_f = pressão do filtrado

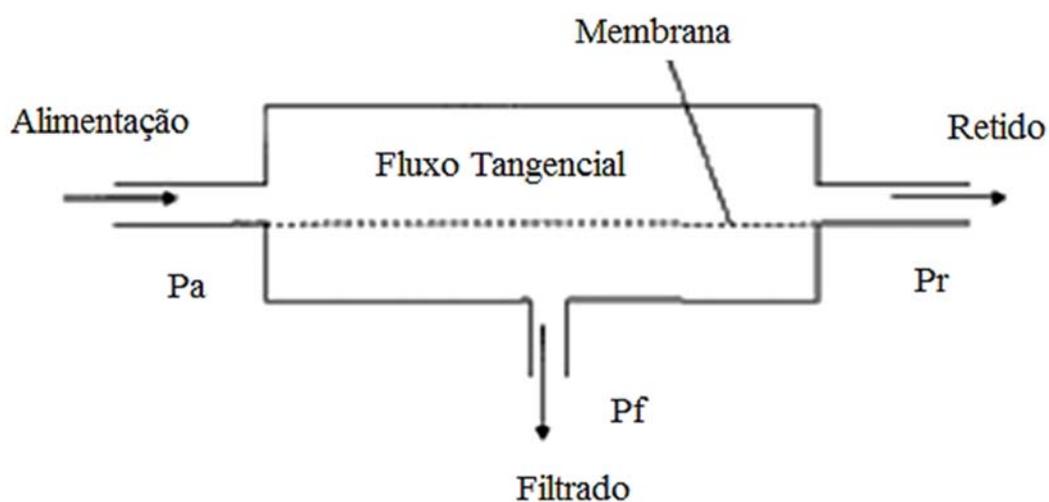


Figura 14: Tipos de pressão em um sistema de filtração tangencial. Adaptado de: GHOSH (2006).

O processo de separação com membranas que mais se aproxima da filtração convencional é a MF. São utilizadas membranas com poros na faixa de 0,03 e 1,00 μm (LIGHTFOOT e MOSCARIELLO, 2004) sendo, portanto, indicadas para a retenção de materiais em suspensão e emulsão. Quando se deseja purificar e fracionar soluções contendo solutos em uma ampla faixa de massa molar (macromoléculas de peso molecular maior que 10^4 Dalton) utiliza-se a UF que, normalmente é operada no modo de filtração com fluxo tangencial (LUTZ e RAGHUNATH, 2007). As membranas apresentam poros na faixa entre 1 e 100 nm, portanto mais “fechadas” que as membranas de MF. As membranas de UF são especificadas, normalmente, através da retenção nominal ou corte molecular (“cut off”),

definida como sendo o valor da massa molecular para a qual a membrana apresenta coeficiente de rejeição de 95%. Assim, por exemplo, uma membrana com retenção nominal de 15 kDa é aquela capaz de rejeitar 95% das moléculas presentes em uma solução de um soluto com massa molecular de, aproximadamente, 15.000 Dalton. Para a UF, são usadas membranas poliméricas capazes de reter o produto de interesse ao mesmo tempo em que permitem a passagem da água e de compostos com baixo peso molecular. Com isso, é possível concentrar o produto de interesse, através da remoção de água e, de certa forma, purificar, através da eliminação de compostos com peso molecular inferior ao do produto retido pela membrana.

Em comparação com outras operações unitárias empregadas para a purificação, como a extração com solventes, a precipitação e a cromatografia, os PSM são relativamente mais brandos, além de não requererem a adição de produtos químicos, o que os torna adequados para o processamento de produtos biotecnológicos (RATHORE e SHIRKE, 2011). A cromatografia líquida de exclusão e filtração molecular é um método cromatográfico não adsorptivo em que as moléculas são separadas com base no seu volume hidrodinâmico. Pode ser utilizada para a remoção de sais ou compostos de baixo peso molecular, e também para a troca de solução tampão. Entretanto, tem sido substituída pela UF e pela DF devido ao seu alto custo (LIGHTFOOT e MOSCARIELLO, 2004; LUTZ e RAGHUNATH, 2007; SCHWARTZ, 2014). Dentre as principais desvantagens da cromatografia de exclusão molecular em relação à UF estão o fato da primeira promover a diluição do produto a ser purificado, o que possivelmente exigiria uma nova etapa de concentração, além de requerer um tempo de processo maior (VAN REIS e ZYDNEY, 2001). Atualmente a UF também tem sido utilizada para o fracionamento de proteínas (LIGHTFOOT e MOSCARIELLO, 2004). O processo de DF permite também realizar a troca da solução tampão em que o produto de interesse encontra-se suspenso ou dissolvido. Durante o processo, o volume do produto é mantido constante, assim como o fluxo, a menos que haja alteração na viscosidade da amostra ou as alterações no ambiente iônico sejam capazes de provocar mudanças conformacionais na molécula retida, suficientes para modificar sua permeabilidade (LUTZ e RAGHUNATH, 2007; SCHWARTZ, 2014).

As membranas podem ser preparadas com configurações diversas, como tubular (ou espiral), planas e fibras ocas (Figura 15). Os principais aspectos a serem considerados na seleção da geometria adequada são as variáveis do processo e as características da mistura a ser fracionada, uma vez que a geometria da membrana tem impacto direto sobre a eficiência do processo. A utilização de membranas em processos industriais deve considerar o projeto do módulo de permeação, de forma a permitir o livre escoamento da solução de alimentação e do permeado. O objetivo é aumentar ao máximo a área superficial da membrana e o fluxo do permeado, no menor tamanho possível do módulo, de modo a reduzir o volume morto. Ao mesmo tempo a sanitização e a limpeza devem ser de fácil realização, o que resulta em menores custos e tempos de processo. As membranas na geometria plana são de longe a forma mais empregada em todos os PSM (HABERT *et al.*, 2006; LUTZ e RAGHUNATH, 2007; RATHORE e SHIRKE, 2011).

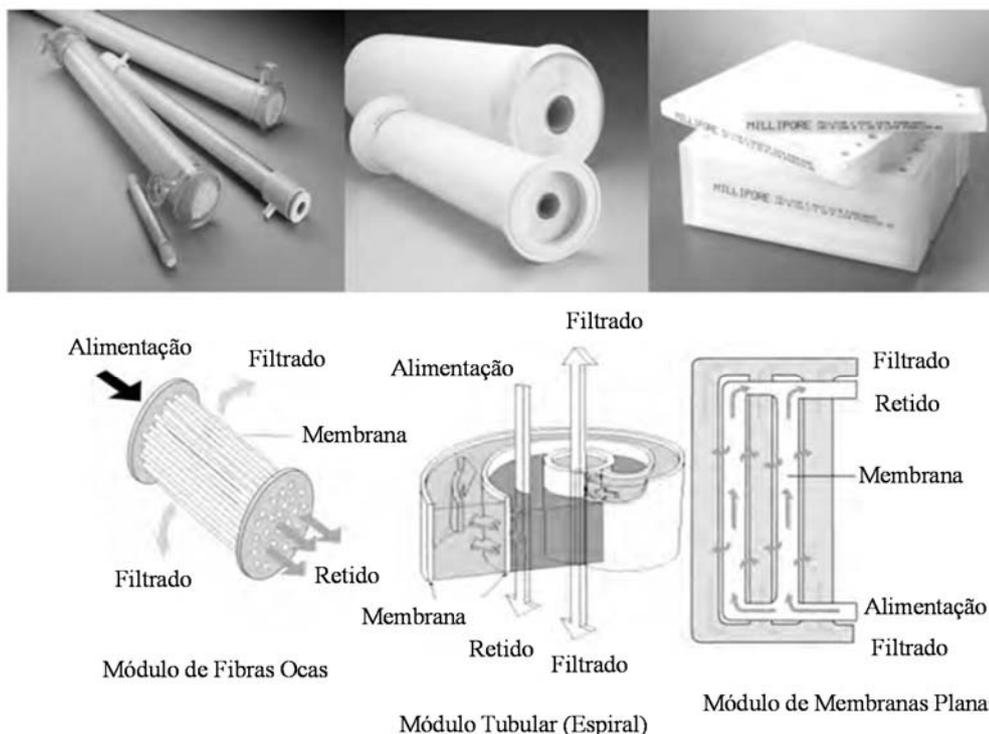


Figura 15: Principais geometrias dos módulos comerciais de UF e seus respectivos fluxos de alimentação, filtrado e retido. Adaptado de: LUTZ e RAGHUNATH (2007).

De modo geral, para os processos que utilizam o gradiente de pressão como força motriz, o fluxo de filtrado (J) é diretamente proporcional ao próprio gradiente de pressão, ou seja:

$$J = A \cdot \Delta P$$

Onde A é uma constante de proporcionalidade dependente das características da membrana e da solução a ser processada e ΔP é a queda de pressão através da membrana. No caso de solvente puro, admitindo-se que a membrana seja inerte em relação ao solvente e que ela não se deforme pela ação da pressão, o fluxo de filtrado apresentará uma dependência linear com a pressão, independentemente do processo em questão (HABERT *et al.*, 2006).

Durante o processo de separação, o desempenho da membrana pode mudar, apresentando uma diminuição da vazão de permeado em função do tempo. Três fenômenos são conhecidos por limitarem a vazão de filtrado: polarização por concentração, camada gel polarizada e *fouling* (HABERT *et al.*, 2006; LUTZ e RAGHUNATH, 2007). Todos esses fatores induzem resistências adicionais ao transporte através da membrana. Uma das principais características dos PSM é que eles podem ser operados tanto com fluxo tangencial, como com fluxo normal. No caso de solvente puro e sem interação com o material da membrana, o fluxo de filtrado, para uma dada pressão de operação, deve ser constante com o tempo. No caso de uma solução ou suspensão processada por filtração com fluxo normal, em que o permeado passa através da membrana e o soluto ou os materiais em suspensão são retidos, acumulando-se na superfície da membrana, trata-se de um modo de operação, fundamentalmente transiente, uma vez que a concentração do soluto próximo à membrana aumenta com o tempo. Este acúmulo pode se traduzir na formação de um depósito ou de uma torta de filtração que reduz o fluxo de filtrado com o tempo (Figura 16-A). Na filtração com fluxo tangencial, a solução ou suspensão escoam paralelamente à superfície da membrana, enquanto o permeado é transportado transversalmente à mesma. Neste caso, o escoamento paralelo à membrana limita o acúmulo do material retido, tornando possível a operação do sistema em condições de regime permanente, ou seja, a vazão de filtrado pode permanecer constante com o tempo, mas em um valor menor do que o obtido com o solvente puro, na mesma pressão de operação (Figura 16-B).

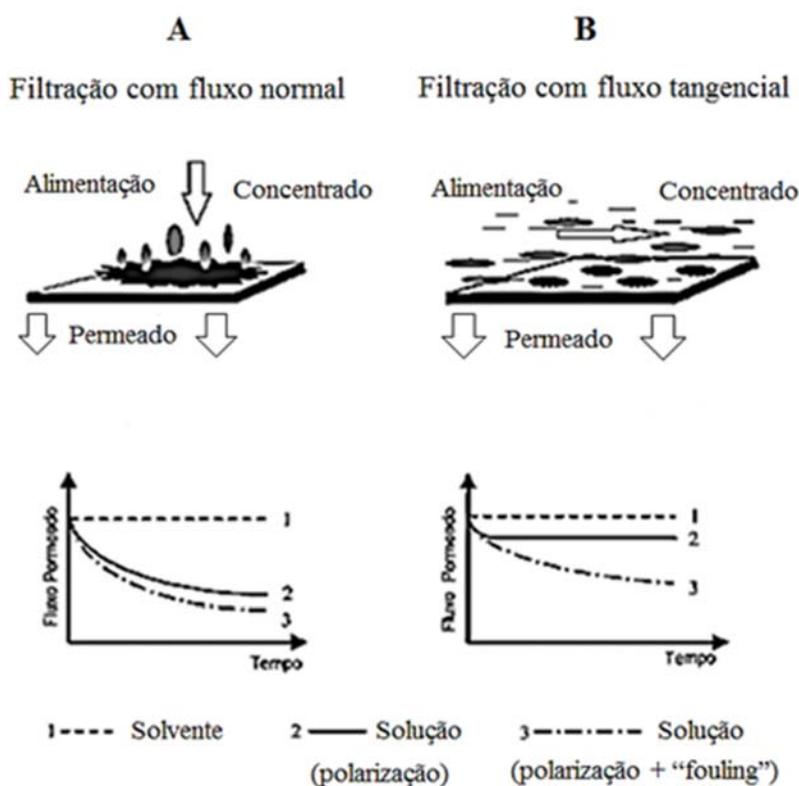


Figura 16: Comparação esquemática entre filtração com fluxo normal e filtração com fluxo tangencial. Adaptado de: HABERT *et al.* (2006).

Quando se processa uma solução com solutos tanto de baixo peso molecular como de macromoléculas, utilizando os PSM, independentemente da operação ser do tipo normal ou tangencial, sempre haverá aumento da concentração das espécies retidas próximo à superfície da membrana, devido à seletividade do processo. O fato da concentração do soluto próximo à superfície da membrana ser maior do que no seio da solução provoca um movimento difusivo do soluto, no sentido de retornar ao seio da solução. No caso da filtração com fluxo normal, mesmo havendo este retorno de soluto pelo mecanismo difusivo, a tendência predominante é o aumento da concentração de soluto na região próxima à membrana, e o processo será transiente. Por outro lado, se o sistema é operado em escoamento tangencial, é possível alcançar um equilíbrio entre quantidade de soluto que

é transportado em direção à membrana, arrastado pelo fluxo de solvente que permeia a membrana, e a quantidade de soluto que se difunde da região próxima à superfície da membrana, em direção ao seio da solução. O resultado deste equilíbrio é um perfil de concentração de soluto próximo à membrana, independentemente do tempo, o que possibilita a operação do sistema com fluxo de filtrado constante. Este fenômeno conhecido como polarização de concentração, ilustrado na Figura 17, é inerente a qualquer processo de transporte seletivo por membranas permeáveis.

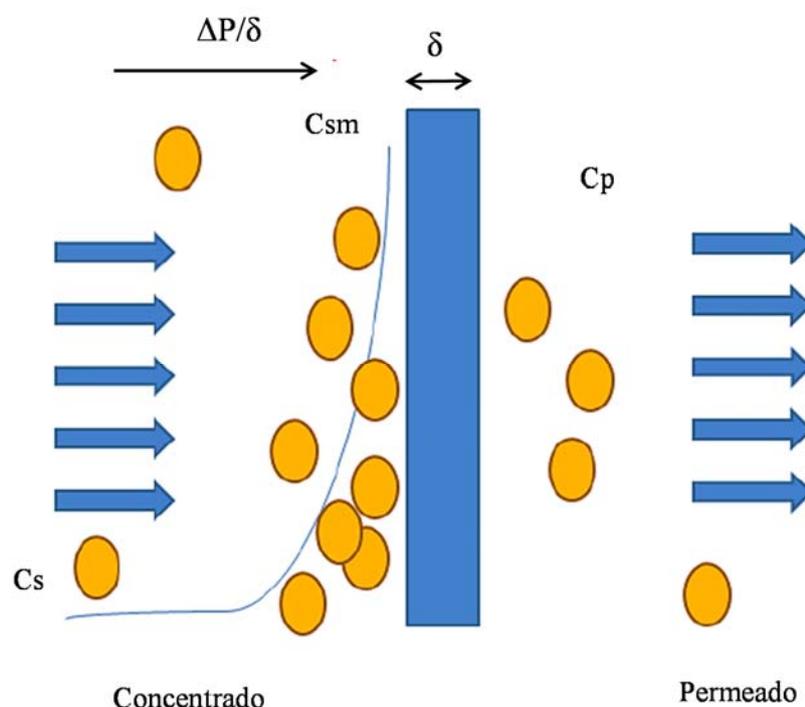


Figura 17: O fenômeno de polarização da concentração. A figura ilustra, de maneira esquemática, o fenômeno de polarização da concentração durante o processo de filtração. O soluto é impulsionado através da membrana de espessura δ com queda de pressão de operação ΔP . Observa-se o aumento da concentração de soluto próximo à membrana (C_{sm}), seja em função da transferência de massa deste soluto, ou pela permeação do solvente através da membrana. Adaptado de: BLAKE *et al.* (2011).

Quando a concentração de partículas próximas à superfície filtrante excede seu limite de solubilidade ocorre a gelificação (formação de uma camada de gel) da solução devido à precipitação por supersaturação de macromoléculas. Esta camada, denominada camada gel polarizada, ocasiona um aumento adicional na resistência ao fluxo de filtrado. Neste sentido, o aumento da pressão de trabalho resulta no aumento linear da vazão de filtrado, até que este seja quase coincidente com o perfil de vazão do solvente puro. No entanto, o aumento da vazão de filtrado provoca uma maior concentração das espécies retidas próximo à superfície da membrana, o que tende a provocar uma queda no fluxo de filtrado. Assim, a partir de um certo valor de pressão, o aumento adicional desta corresponde a um aumento equivalente na resistência ao transporte do solvente. Como consequência, o fluxo de filtrado tende a um valor constante, denominado fluxo limite, à medida que aumenta a pressão de operação, o que sugere a formação da camada gel (GOSH, 2006; HABERT *et al.*, 2006).

Nos PSM, particularmente aqueles que utilizam membranas porosas, mesmo com operação em fluxo tangencial, é comum observar uma queda contínua da vazão de filtrado com o tempo, indicando que outros fenômenos, além da polarização de concentração, devem estar presentes durante o processamento. Este fenômeno normalmente é acompanhado por um decréscimo na rejeição do soluto. O “fouling” ou incrustação ocorre quando há deposição e acúmulo de componentes da alimentação na superfície e/ou dentro dos poros da membrana de forma irreversível (por adsorção ou bloqueio físico dos poros). Este fenômeno está relacionado às características da membrana e interações soluto-soluto e soluto-membrana que, em alguns casos, pode levar a um fluxo de filtrado tão baixo que chega a inviabilizar uma determinada aplicação. O fenômeno da polarização de concentração é reversível, ou seja, uma vez terminada a operação e a limpeza da membrana, a permeabilidade do solvente puro é recuperada. Já os fenômenos que constituem a incrustação (“fouling”) são considerados total ou parcialmente irreversíveis.

3.11 CONTROLE DA PRODUÇÃO DE VACINAS CONJUGADAS

Os processos de produção de vacinas são altamente complexos e especializados. Pequenos desvios no processo podem gerar um grande impacto sobre sua potência e eficácia, assim, é necessário o controle de qualidade rigoroso do produto obtido (SALINSKY e WERBLE, 2006; LEROUX-ROELS *et al.*, 2011). Durante o processo de desenvolvimento de uma vacina, deve ser assegurada a atividade biológica do imunógeno através de diferentes ensaios, inclusive ensaios de potência, entretanto tais ensaios não são exigidos nos requerimentos da OMS para o registro e comercialização das vacinas conjugadas (WHO, 2004). Por outro lado, os métodos físico-químicos são fundamentais, já que o controle de qualidade destas vacinas é altamente dependente das análises de caracterização estrutural físico-químicas das moléculas obtidas. A liberação lote a lote de vacinas conjugadas, através de testes físico-químicos, só é possível em função da natureza do antígeno, desde que os conjugados são moléculas puras, com estrutura química bem definida, isentas de massa bacteriana, atóxicas e produzidas a partir de componentes purificados, por um processo químico claramente definido (WHO, 2004).

As técnicas para a análise e caracterização de vacinas conjugadas incluem a cromatografia de exclusão e filtração molecular (SEC), principalmente quando acoplada à detecção do espalhamento de luz (SEC-MALLS), para a determinação da distribuição de peso molecular e métodos espectroscópicos, tais como dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência que possibilitam a análise conformacional da proteína carreadora. Para a caracterização do componente glicídico, frequentemente utiliza-se a espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN), que permite, não só avaliar a sua identidade e integridade estrutural, bem como a sua homogeneidade. A técnica possibilita também identificar e quantificar impurezas presentes na molécula, além de permitir a detecção e quantificação do grau de degradação e despolimerização após a conjugação. Ela tem sido utilizada no controle e caracterização físico-química de vacinas meningocócicas, para a determinação da identidade e a distribuição dos grupamentos *O*-acetil no glicídio conjugado (AVCI e KASPER, 2010). A resposta imunológica desencadeada pelas vacinas conjugadas pode ser influenciada por diferentes fatores, como por exemplo, a estrutura do

polissacarídeo, o tipo de proteína carreadora, o método de conjugação e a quantidade de polissacarídeo livre. Cada lote deve ser testado para a determinação do teor de polissacarídeo livre, a fim de assegurar que a quantidade esteja dentro dos limites estabelecidos com base nos lotes clínicos que demonstraram a segurança e eficácia da vacina. Um dos métodos físico-químicos utilizados para este fim é a eletroforese capilar de zona livre (CZE), que permite a determinação do conteúdo de polissacarídeo e proteína não conjugados de algumas vacinas (SOUZA *et al.*, 2013). Os métodos de dosagem química e/ou físico-química podem ser utilizados para a determinação da quantidade de proteína e polissacarídeo presentes na molécula conjugada, o que fornece uma medida indireta da extensão da conjugação, uma vez que possibilita determinar a razão entre as concentrações de polissacarídeo e proteína (PS/Ptn) da molécula conjugada (JOSHI *et al.*, 2009).

3.12 – ESTUDO DE TERMOESTABILIDADE DE VACINAS

Os programas de vacinação em massa são, sem dúvida, uma das maiores conquistas da saúde pública da atualidade. O principal objetivo da maioria das vacinas é simular infecções naturais por organismos patogênicos. Assim, tanto as vacinas vivas atenuadas como também as que são compostas de bactérias e vírus mortos são usadas para este propósito e historicamente constituem a maioria das vacinas bem sucedidas. Tais preparações oferecem a vantagem de apresentar pouca ou até nenhuma patogenicidade além de serem estáveis, apesar da alta heterogeneidade dos antígenos vacinais. Neste sentido, a substituição por antígenos melhor definidos continua a ser uma meta desejável (HASIJA *et al.*, 2013; KUMRU *et al.*, 2014). Atualmente, a maioria das vacinas disponíveis é constituída por moléculas complexas altamente suscetíveis a fatores ambientais capazes de impactar significativamente a sua atividade. Dentre esses fatores, o principal que afeta as características de todas as vacinas ao longo do tempo é a temperatura (WHO, 2006).

A estabilidade química de produtos farmacêuticos é um assunto de grande preocupação, uma vez que afeta a segurança e a eficácia do produto final. No caso de produtos biológicos / biotecnológicos cujos componentes ativos são principalmente proteínas e / ou

polipeptídeos, a manutenção da conformação molecular e, conseqüentemente, da atividade biológica é dependente da estabilidade de ligações covalentes e também de forças não covalentes. Esses produtos são particularmente sensíveis aos fatores do meio ambiente, como mudanças na temperatura, reações de oxidação, incidência da luz, força iônica do meio, por exemplo (KUMRU *et al.*, 2014). Assim, para evitar a degradação e garantir a manutenção da atividade biológica, devem ser armazenadas sob condições rigorosamente controladas (ICH, 1995). Sob o ponto de vista do armazenamento em longo prazo, as vacinas inativadas e as de subunidades são geralmente mais estáveis do que as vacinas vivas atenuadas, no entanto, qualquer que seja a natureza do antígeno, é necessário realizar testes de estabilidade, que incluam tanto os estudos acelerados como os de longo prazo sob diferentes condições (por exemplo, pH, temperatura, força iônica, etc.), como parte do desenvolvimento da formulação da vacina. Além disso, os estudos sob condições reais de armazenamento são usados para estabelecer o prazo de validade do produto quando mantido na temperatura recomendada de armazenagem (KUMRU *et al.*, 2014).

As vacinas conjugadas são relativamente mais estáveis em comparação com vacinas vivas atenuadas, por exemplo. No entanto as moléculas conjugadas tendem a sofrer degradação por hidrólise da cadeia polissacarídica (LEE *et al.*, 2007). A eficácia dessas vacinas depende, não só da eficiência da reação de conjugação entre o glicídio e a proteína carreadora, como também da manutenção da integridade da molécula conjugada dentro do prazo de validade. Assim, os fatores que eventualmente afetem adversamente a estabilidade do conjugado podem diminuir a potência da vacina através da redução da quantidade, acessibilidade e solubilidade do glicídio e da proteína carreadora reduzindo, conseqüentemente, a sua eficácia (HO *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 2014). Sabe-se que o aumento da temperatura pode causar instabilidades físicas, tais como a alteração da estrutura terciária e a agregação de proteínas, bem como instabilidades químicas, como a dissociação da ligação, no caso de vacinas conjugadas, entre o polissacarídeo e a proteína carreadora. Estas mudanças podem ser detectadas quando são realizados estudos sob estresse térmico, a condição adversa mais amplamente utilizada para esse tipo de avaliação na indústria (CHEN e KRISTENSEN, 2009; HASIJA *et al.*, 2013). As informações sobre a

potência de vacinas sujeitas ao armazenamento em temperatura diferente daquela recomendada são clinicamente úteis, principalmente quando não há possibilidade de manter a cadeia de frio. Além disso, os estudos sob estresse térmico podem ser úteis para determinar se a exposição acidental, em curto prazo, às condições indesejáveis, tais como durante o transporte inadequado, pode comprometer a qualidade dos produtos (LEE *et al.*, 2007). Assim, a utilização de métodos eficazes, que detectem as alterações com potencial para afetar a eficácia destas vacinas é essencial para o monitoramento da sua qualidade, sendo os métodos físico-químicos de análise amplamente utilizados no controle de qualidade pré e pós-licenciamento, para assegurar a conformidade com as especificações de fabricação e consistência de cada lote do produto (HO *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 2014). O conhecimento a respeito da estabilidade da molécula ajuda na seleção tanto da formulação como da embalagem mais apropriadas, bem como no estabelecimento das condições adequadas de armazenamento e do prazo de validade. Tais informações devem constar nas documentações apresentadas às agências regulatórias, que exigem a apresentação de dados referentes aos testes de estabilidade, a fim de entender como a qualidade do produto pode alterar com o tempo sob a influência de vários fatores ambientais (BLESSY *et al.*, 2014). De modo geral, não existe um único ensaio ou parâmetro capaz de caracterizar a estabilidade de um produto biotecnológico / biológico. Portanto, deve ser proposto um perfil de estabilidade para assegurar a detecção de eventuais alterações estruturais do produto, bem como em sua homogeneidade e potência (ICH, 1995).

A principal dificuldade para a determinação da estabilidade de vacinas é o fato de possuírem atividade biológica específica que não pode ser totalmente caracterizada somente através da utilização de métodos físico-químicos. Neste sentido, os ensaios biológicos são essenciais para o estabelecimento dos parâmetros de controle de qualidade de vacinas, como por exemplo, os ensaios de potência baseados em testes de desafio “in vivo”, utilizados para verificar a estabilidade de algumas delas, sejam virais ou bacterianas. No caso de vacinas virais utiliza-se, por exemplo, testes capazes de determinar o título viral. Com relação às vacinas bacterianas, por exemplo, os testes biológicos apresentam maior dificuldade de execução, por exigirem um grande número de animais para a sua realização.

A variabilidade inerente aos testes biológicos torna difícil estabelecer de maneira contundente o perfil de degradação de vacinas, a menos que as mudanças observadas sejam substanciais (GALAZKA *et al.*, 1998). Assim, os testes de estabilidade de vacinas são baseados na determinação das mudanças das suas propriedades, que podem ser um indicador direto ou indireto da manutenção da imunogenicidade ou eficácia (WHO, 2006) e a utilização de métodos físico-químicos, bioquímicos ou imunoquímicos apropriados possibilita a caracterização do produto, bem como a detecção precisa das alterações causadas pela degradação durante a estocagem (ICH, 1995).

3.13 – ECONOMIA DE ESCALA E ANÁLISE DE CUSTOS

O desenvolvimento da biotecnologia trouxe consigo inúmeras contribuições para as mais diversas áreas, e a farmacêutica foi provavelmente a mais positivamente afetada. O potencial da biotecnologia no âmbito farmacêutico atrai os olhares não só da comunidade científica como também de investidores que desejam aplicar seus capitais em mercados promissores. O custo médio para a comercialização de produtos biotecnológicos é alto e isso tem exigido a utilização da análise econômica, por parte das empresas, como uma ferramenta durante o desenvolvimento do processo, capaz de auxiliar na tomada de decisões que privilegiem a execução de processos otimizados, robustos e com custos econômicos reduzidos (RATHORE *et al.*, 2006; ERICKSON *et al.*, 2012).

A produtividade de uma atividade pode ser dividida em três classes: aquela na qual a produção (quantidade) pode ser maior do que a atual com um incremento diretamente proporcional do custo; a segunda em que a produção pode ser incrementada com um aumento menor que o diretamente proporcional nos custos e a terceira classe, constituída por uma produção maior, sendo obtida com um aumento maior que o diretamente proporcional dos custos. Em outras palavras, significa dizer que a produção poderá ser incrementada com custos unitários constantes, decrescentes ou crescentes, respectivamente (VERA-CALDERÓN e FERREIRA, 2004).

Por definição, economias de escala são reduções no custo médio geradas pelo aumento da escala de produção. Neste sentido, alguns autores relacionam o conceito de economia de

escala a um nível ótimo operacional para um dado tamanho fabril. À medida que o volume aumenta, o custo unitário médio diminui até atingir o melhor nível operacional. Se este nível for ultrapassado, ocorre a deseconomia de escala (RIBEIRO *et al.*, 2014). Portanto, o aumento do volume da produção, não necessariamente quer dizer economia de escala. Esta só é observada quando há diminuição do seu custo médio, isto é, a diminuição do custo por unidade produzida, sendo o cálculo deste custo total médio baseado na soma dos custos totais fixos e dos custos totais variáveis para certa quantidade de produção (ESBERARD *et al.*, 2009). Existem processos mais produtivos em grande escala, quando comparados com uma escala inferior, por proporcionarem reduções nos custos médios de produção, em decorrência dos volumes produzidos não aumentarem os custos fixos (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Os principais fatores que contribuem para a ocorrência da economia de escala são: a especialização dos funcionários nas atividades em que são mais produtivos; a otimização do gerenciamento do processo produtivo visando torná-lo mais eficaz; e o poder de barganha na compra de insumos em grande quantidade. Por outro lado, dentre os fatores relacionados com a deseconomia de escala citam-se: a dificuldade dos funcionários em realizar um trabalho eficaz devido a fatores como a falta de espaço e equipamentos adequados ao processo; o aumento de tarefas que pode tornar a gestão de uma empresa mais complexa e ineficiente; e as restrições na oferta de insumos essenciais ao processo produtivo (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Do ponto de vista econômico, entende-se por custo toda e qualquer aplicação de recursos para a produção e distribuição de mercadorias (ou prestação de serviços), até o ponto em que se possa receber o preço convencionado. Ou seja, custo é tudo o que se gasta para se obter um bem ou um serviço (BIASIO, 2012). É importante diferenciar as terminologias: custo e despesa. Ambos caracterizam gastos (Figura 18), no entanto, o custo consiste no gasto usado na produção, enquanto despesa é o gasto usado direta ou indiretamente para a obtenção de receitas e manutenção dos negócios da empresa (DIAS, 2007).

A utilização da análise de custos dentro das empresas está no escopo gerencial, onde os usuários internos e os administradores necessitam de informações que auxiliem no processo geral de tomada de decisão. Sob este aspecto, a contabilidade de custos não está presa a nenhuma regra contábil específica, gerando informação útil para a contabilidade societária, tributária e gerencial (MARTINS, 2003). Portanto, o importante é que cada empresa elabore os modelos de decisão segundo sua própria visão conceitual a partir do entendimento profundo da formação do custo de todos os recursos (PADOVEZE, 2006).

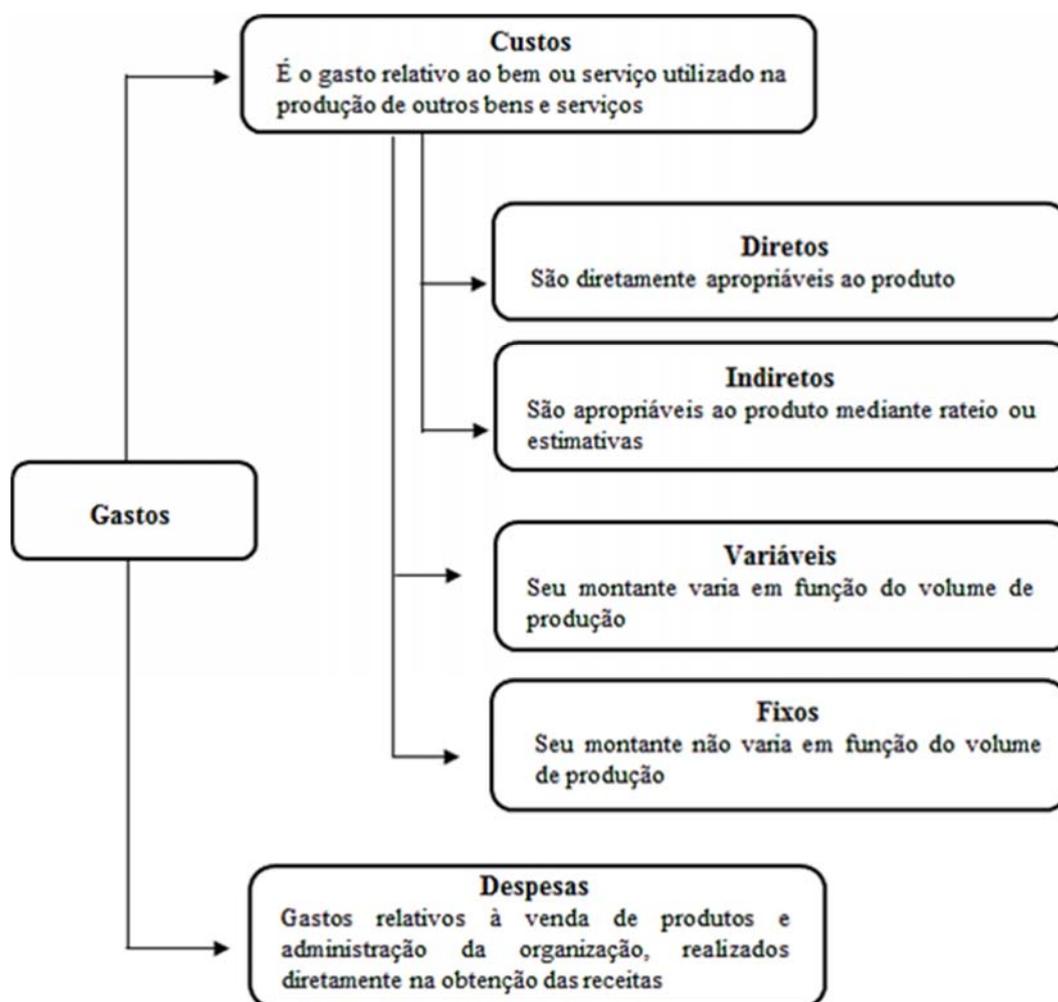


Figura 18: Classificação dos gastos industriais. Adaptado de: DIAS e PADOVEZE (2007).

Atualmente, vários métodos de custeio são utilizados pelas empresas para a apuração de custos dos produtos e / ou serviços: o custeio por absorção; o custeio variável; o custeio baseado em atividades (ABC); o custeio padrão e o custeio meta. No custeio variável, só são alocados aos produtos os custos variáveis, ficando os fixos separados e considerados como despesas do período. Esse método busca um custo unitário do produto ou serviço sem nenhuma dúvida em termos de mensuração monetária, já que, ao utilizar apenas elementos variáveis e, portanto, com valor unitário para cada unidade de produto perfeitamente definido, não usa nenhum conceito de cálculo médio. Essa característica torna esse método cientificamente recomendável para todos os propósitos de previsões e tomada de decisão. No entanto, a principal desvantagem é que este sistema não atende aos princípios contábeis geralmente estabelecidos pelas autoridades fiscais, o que torna a sua utilização limitada às decisões internas da empresa (MARTINS, 2003; CARARETO *et al.*, 2006; ABBAS *et al.*, 2012).

No método de custeio por absorção são enquadrados indistintamente todos os custos (ou despesas), sejam eles diretos ou indiretos; fixos ou variáveis, para apuração do custo unitário dos produtos e serviços finais. É o método que absorve todos os custos de produção aos bens elaborados, e não só os de produção; todos os gastos relativos ao esforço de produção são distribuídos para todos os produtos ou serviços feitos (MARTINS, 2003). Para a sua utilização é necessário estabelecer procedimentos de distribuição desses gastos aos produtos, por meio de algum critério a ser definido, já que são utilizados os gastos indiretos fixos, que, por sua característica básica, não são claramente associados aos produtos e serviços finais. Este método atende aos princípios fundamentais da contabilidade e não considera as despesas integrantes dos estoques dos bens e dos serviços, mas todos os custos aplicados em sua obtenção, possibilitando assim, a apuração dos resultados, cálculos dos impostos e dividendos a distribuir, uma vez que todos os custos de produção (variáveis, fixos, diretos e indiretos) agregam o custo dos produtos para fins de valorização dos estoques. A principal desvantagem é que apresenta poucas informações para fins gerenciais, servindo basicamente para a valorização dos estoques, visto que considera a

alocação de todos os custos aos bens, o que torna as informações de custos deficientes nas análises para tomada de decisão (CARARETO *et al.*, 2006; ABBAS *et al.*, 2012).

O Custeio Baseado em Atividades, conhecido como ABC (“Activity Based Costing”), é uma metodologia desenvolvida para facilitar a análise estratégica de custos relacionados com as atividades que mais impactam o consumo de recursos de uma empresa. Baseia-se na identificação, análise e controle dos custos, atribuindo aos produtos individualmente, a parcela dos custos indiretos consumida por cada um deles. Com o avanço tecnológico e a crescente complexidade dos sistemas de produção, os custos indiretos vêm aumentando continuamente, tanto em valores absolutos quanto em termos relativos, comparativamente aos custos diretos (dentre os quais, o item mão-de-obra direta é o que mais vem decrescendo). Além disso, a grande diversidade de produtos e modelos fabricados na mesma planta produtiva, principalmente em alguns setores industriais exige a melhor alocação dos custos indiretos. No contexto de visão gerencial e de atendimento à legislação, a metodologia apresenta custos por produtos com o mínimo de arbitrariedade no tratamento dos custos indiretos. As informações gerenciais são mais fidedignas em função da redução do rateio além da metodologia atender aos princípios fundamentais de contabilidade (assim como o custeio por absorção). Outras vantagens são a de proporcionar melhor visualização dos fluxos dos processos, além de ajudar na eliminação ou redução das atividades que não agregam valor ao produto. Como desvantagens referentes à metodologia estão a necessidade de investimento financeiro relativamente elevado, além de requerer a reorganização da empresa antes de sua implantação (MARTINS, 2003; CARARETO *et al.*, 2006).

O custeio-padrão pode ser definido por custo de produção estabelecido antes do início do processo produtivo. Este método apresenta-se como um recurso de controle aos gestores da organização, tendo em vista que a sua elaboração considera um cenário de bom desempenho operacional, que leva em conta as deficiências existentes nos materiais e insumos de produção. Como vantagens dessa metodologia, cita-se o fato de se enquadrar como uma ferramenta de controle sobre as atividades produtivas, capaz de eliminar falhas nos processos produtivos com base nos estudos e análises das condições de produção

dentro de um nível aceito da eficiência da mão-de-obra, da matéria-prima e da utilização das máquinas e equipamentos. Além de proporcionar rapidez na emissão de relatórios conclusivos é extremamente eficiente no que diz respeito ao direcionamento na tomada de providências para regularização de problemas observados. Destaca-se como desvantagem da utilização deste método, a grande ocorrência de variações entre os padrões definidos e os dados reais, gerando um aumento considerável dos lançamentos contábeis para o registro dos fatos ocorridos (MARTINS, 2003; CARARETO *et al.*, 2006).

O custeio-alvo ou custeio meta é um processo de planejamento de lucros, preços e custos que parte do preço de venda para chegar ao custo, razão pela qual se diz que é o custo definido de fora para dentro. É obtido através da subtração do preço estimado de venda de um produto similar (ou preço de mercado) da margem de lucratividade almejada e objetiva atingir um custo de produção igualmente desejado ($\text{Custo meta} = \text{preço de venda} - \text{lucro desejado}$). O custo meta, apesar de ser um conceito simples, é também uma mentalidade de gerenciamento. Essa metodologia apresenta como principais vantagens a possibilidade do planejamento estratégico dos lucros, agregando informações de marketing, engenharia e produção, além de reforçar a integração departamental da empresa, visto que tem como princípio básico a colaboração entre estes departamentos. Uma característica fundamental da utilização deste método, que pode ser apresentada como negativa está ligada à forma de produção empregada pela organização, uma vez que o custo meta não é totalmente adequado à produção em massa, visto que tem maior eficácia quando aplicado na produção de grande variedade de produtos e baixo volume de produção (MARTINS, 2003; CARARETO *et al.*, 2006).

O cenário competitivo atual tem direcionado as empresas, inclusive as de biotecnologia, a examinarem e aperfeiçoarem, constantemente, seus mecanismos de produção e custeio, com o objetivo de aumentar a eficiência com redução de custos. A capacidade de compreender as implicações da análise de custos durante todos os estágios de desenvolvimento de um novo produto tem importância estratégica tanto no que diz respeito ao processo produtivo como para as decisões gerenciais. Neste sentido, a utilização de modelos eficazes que possibilitem entender e minimizar os custos de produção além de

otimizar suas operações de fabricação, favoreçam o desenvolvimento de processos produtivos economicamente viáveis (LEVINE e LATHAM, 2012).

Cabe ressaltar que este trabalho de tese descreve um processo industrial da nova vacina meningocócica C conjugada, portanto, algumas informações, como por exemplo, os volumes reacionais; o corte molecular das membranas de ultrafiltração; os valores de concentração dos produtos e os valores em Reais referentes ao custo de cada processo não serão informados, por se tratarem de segredo industrial.

4 METODOLOGIA

Em função das adequações de processo propostas neste trabalho e como forma de avaliar as modificações químicas realizadas nos componentes a serem conjugados (o polissacarídeo meningocócico C e a proteína tetânica, ambos ativados), bem como do próprio glicoconjugado e suas respectivas etapas de purificação, foram utilizados métodos de controle químicos, físicos e físico-químicos para o monitoramento de todas as etapas de produção. Os resultados foram analisados comparativamente com aqueles obtidos na escala piloto a fim de evidenciar a manutenção do padrão e/ou a melhoria alcançada a partir da modificação implementada com vistas ao escalonamento do processo.

Além disso, os métodos físico-químicos foram também utilizados para avaliar a estabilidade estrutural de três lotes de conjugado obtidos na escala industrial, após serem submetidos à incubação nas temperaturas de 4° C, 37° C e 55° C, com base nas condições experimentais descritas por Ho *et al.* (2002). Como forma de conhecer o perfil de estabilidade térmica da molécula conjugada, realizou-se o monitoramento do teor de ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico - NANA) e de proteína no conjugado, bem como o pH de cada amostra durante o período de incubação de cinco semanas. Além disso, o efeito da exposição a várias temperaturas de armazenamento na integridade molecular, teor de sacarídeo livre e na conformação da proteína carreadora também foram monitoradas por cromatografia líquida acelerada de exclusão molecular (HPLC-SEC), eletroforese capilar de zona (CZE), espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular (CD) e de ressonância magnética nuclear (RMN). O comprometimento da atividade biológica em função das eventuais alterações físico-químicas observadas nos conjugados tratados foi determinado através da avaliação da atividade bactericida do soro (“Serum bactericidal antibody assay” - SBA) e também pela determinação do título de anticorpos totais (IgG) utilizando o ensaio imunoenzimático “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA).

O estudo do escalonamento da produção da nova vacina meningocócica C conjugada, foi avaliado sob a ótica da análise comparativa entre os custos do processo de obtenção nas escalas piloto e industrial, com o objetivo de avaliar a viabilidade econômica da

transposição de escalas produtivas. A análise foi realizada a partir de duas perspectivas: a otimização do processo de purificação por filtração de fluxo tangencial (TFF) e o aumento dos volumes das reações de obtenção dos produtos intermediários (MPCO e MATT) além do MPCT final (Figura 19) com base nos conceitos teóricos de contabilidade de custos (MARTINS, 2003).

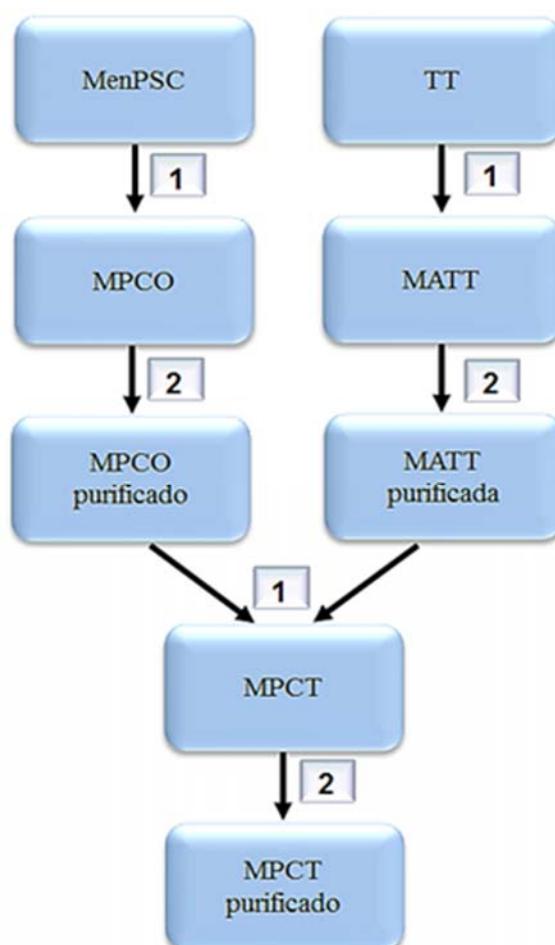


Figura 19: Fluxo de obtenção dos produtos intermediários (MPCO e MATT) e do MPCT final com a indicação das etapas consideradas na análise comparativa de custos: 1 – o custo médio com pessoal necessário para o escalonamento das reações químicas envolvidas no processo e 2 - o custo médio com insumos necessários para a otimização do processo de purificação por TFF. Legenda: MenPSC – polissacarídeo meningocócico C; MPCO – polissacarídeo meningocócico C oxidado; TT – anatoxina tetânica; MATT – proteína tetânica ativada; MPCT – Glicoconjugado.

4.1 OBTENÇÃO DOS COMPONENTES

4.1.1 Polissacarídeo meningocócico C nativo

O polissacarídeo meningocócico C nativo (MenPSC) foi obtido a partir da cepa oriunda do Instituto Mérieux (IM 2135), com caracterização genotípica de C:2a:P1.5,2 (Instituto Adolfo Lutz/SP), no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro segundo os Requerimentos da OMS (WHO, 1981).

4.1.2 Anatoxina Tetânica

A anatoxina tetânica (TT) isolada, purificada e submetida a testes de controle de qualidade seguindo os procedimentos descritos nos Requerimentos da OMS (WHO, 1990) foi obtida do Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar).

4.2 REAÇÕES QUÍMICAS

4.2.1 Reação de oxidação do MenPSC

O MenPSC foi oxidado através de uma reação com *m*-periodato de sódio (NaIO₄) (SILVEIRA *et al.*, 2007) denominada reação de clivagem oxidativa, para a obtenção do polissacarídeo C oxidado (MPCO) (Figura 20). Para este trabalho foram consideradas quatorze reações de oxidação em escala piloto – em bécher de vidro e seis reações em escala industrial – em reator. Para ambas as escalas foram preparadas soluções aquosas de MenPSC na concentração de 10 mg mL⁻¹, em termos de NANA. A estas soluções foi adicionado o reagente NaIO₄, de modo a atingir a concentração final de 23,4 mM. No caso da reação em escala piloto, a solução aquosa contendo o polissacarídeo dissolvido foi mantida na câmara fria até que a temperatura estivesse estabilizada, antes do início da reação, que ocorreu a 4 °C por 17 horas, ao abrigo da luz, sob agitação constante, mantida por um agitador magnético. A temperatura reacional foi monitorada com o auxílio de um termômetro no início e no término do tempo de reação.

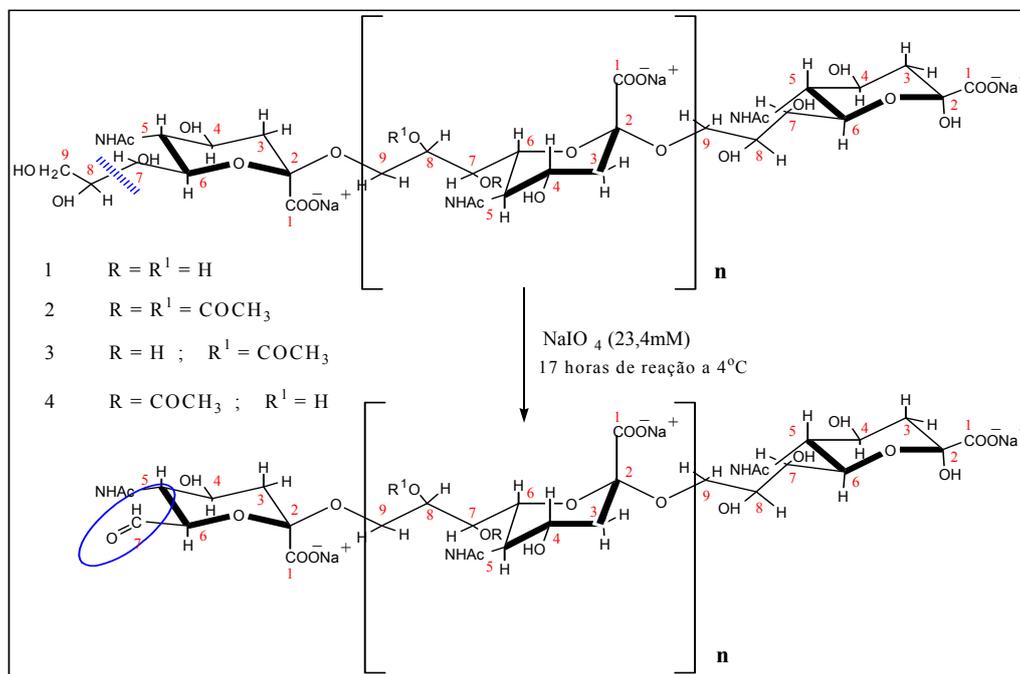


Figura 20: Reação de clivagem oxidativa da ligação entre carbonos com hidroxilas vicinas, presentes na molécula do polissacarídeo C através de uma reação de oxidação branda com o reagente m-periodato de sódio (NaIO₄). Como resultado, são gerados grupos aldeído na molécula do glicídio. Adaptado de SILVEIRA *et al.* (2007)

Os lotes de MPCO foram obtidos em BPF na escala industrial com o aumento do volume reacional em 5,8 vezes em relação à escala piloto, respeitando-se as proporções dos reagentes usados (SILVEIRA *et al.*, 2007). A reação em escala industrial foi realizada em reator cilíndrico constituído em borossilicato e acessórios em aço inox, composto por haste de agitação com aletas propulsoras reguláveis, vedada por selo mecânico; “baffles” fixados na tampa onde são localizadas entradas para adição de reagentes; sensor de temperatura e pescador para retirada de amostras. O reator é encamisado com entrada e saída para fluido térmico, o que possibilitou manter a temperatura reacional constante igual a 4 °C, através da recirculação de água refrigerada. Assim, foi possível realizar o monitoramento constante da temperatura reacional e também da velocidade de agitação. Durante as 17 h de reação, o reator foi mantido ao abrigo da luz e com agitação mecânica constante de 410 rpm (Figura

21). Para o término da reação de oxidação, tanto na escala piloto, como na escala industrial, adicionou-se volume de solução de glicerol equivalente a 48 % do volume reacional.

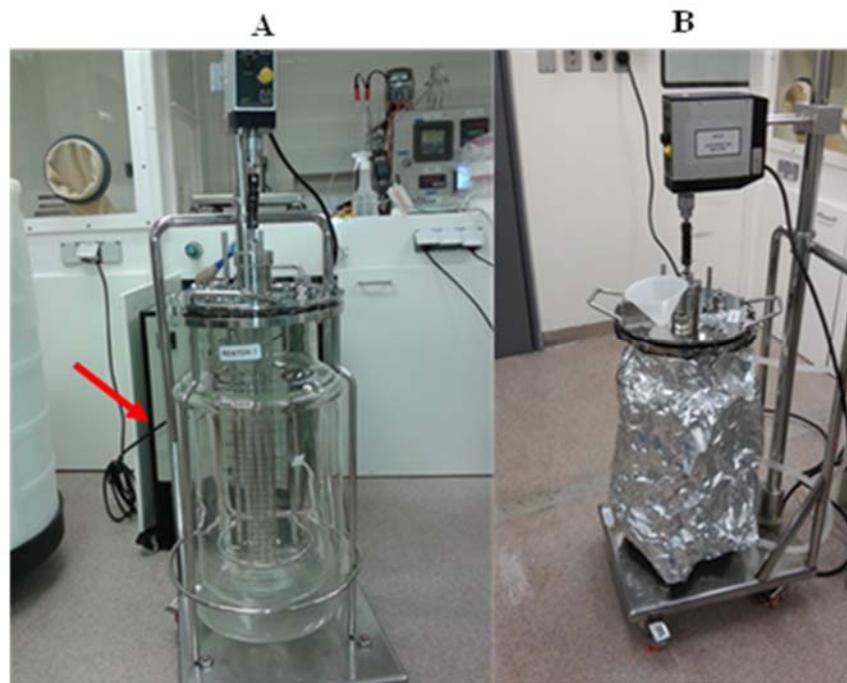


Figura 21: Reator de vidro utilizado na reação de obtenção do MPCO na escala industrial. Painel A: Reator vazio conectado ao sistema de refrigeração (indicado pela seta). Painel B: Reator contendo a mistura reacional ao abrigo da luz.

4.2.2 Reação de ativação da anatoxina tetânica

A ativação da TT foi feita por reação com cloridrato de hidrazina em presença de EDAC (SILVEIRA *et al.*, 2007), o que resultou na derivatização dos resíduos ácidos de aminoácidos para a obtenção da proteína tetânica ativada (MATT) (Figura 22). A reação ocorreu em condição ligeiramente ácida, a 20° C, por 1,5 h e sob agitação constante. Neste trabalho foram obtidos oito lotes de MATT na escala piloto e também na escala industrial, em BPF.

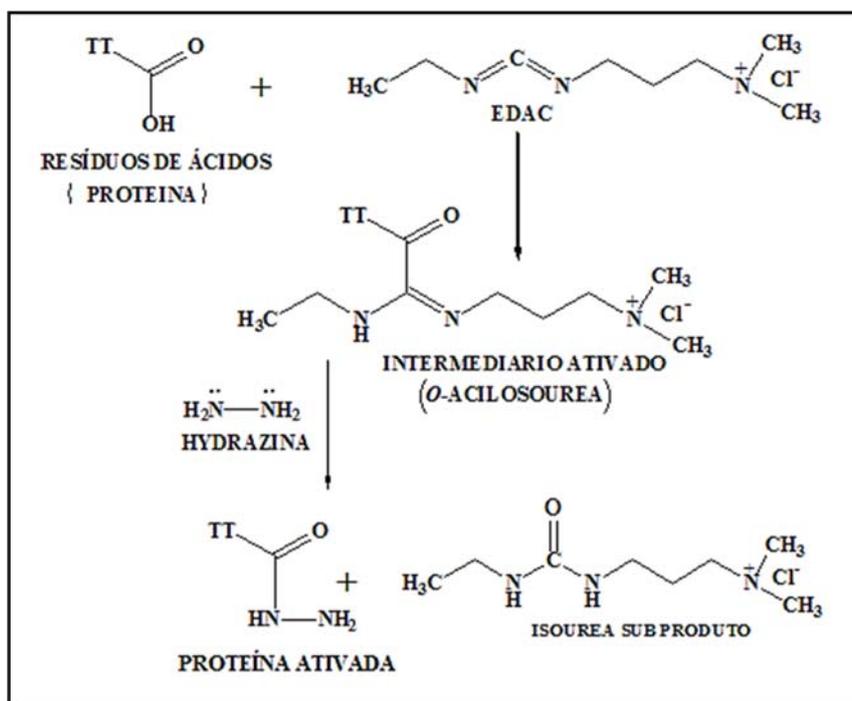


Figura 22: Reação de derivatização seletiva dos aminoácidos ácidos presentes na anatoxina tetânica (Aspártico e Glutâmico) com Cloridrato de hidrazina ($\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$) em presença de EDAC para a obtenção da MATT. Adaptado de HERMANSON (2008).

Para a reação de ativação, a solução de TT foi diluída até concentração proteica final de $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Adicionou-se solução de cloridrato de hidrazina e massa de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDAC).

A produção dos lotes na escala industrial foi realizada após o aumento do volume reacional de 2,5 vezes em relação à escala piloto, respeitando-se as proporções dos reagentes usados (Figura 23).

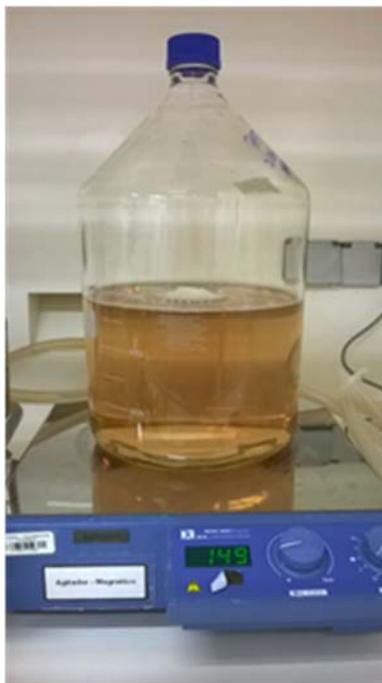


Figura 23: Reação de ativação da anatoxina tetânica na escala industrial. O frasco contendo a mistura reacional é mantido à temperatura ambiente sob agitação constante em agitador magnético.

4.2.3 Reação de conjugação entre MPCO e MATT

A reação de conjugação entre o polissacarídeo C oxidado e a proteína tetânica ativada para a obtenção do glicoconjugado (MPCT) foi feita pelo método de aaminação reductiva (Figura 24). Nesta reação foram utilizados os lotes de MPCO e de MATT, obtidos tanto em escala piloto como na escala industrial, previamente purificados e concentrados por UF em sistema de filtração tangencial, conforme descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2 abaixo (SILVEIRA *et al.*, 2007). Para a realização deste trabalho foram obtidos quatro lotes de conjugado em escala piloto e seis lotes, em escala industrial.

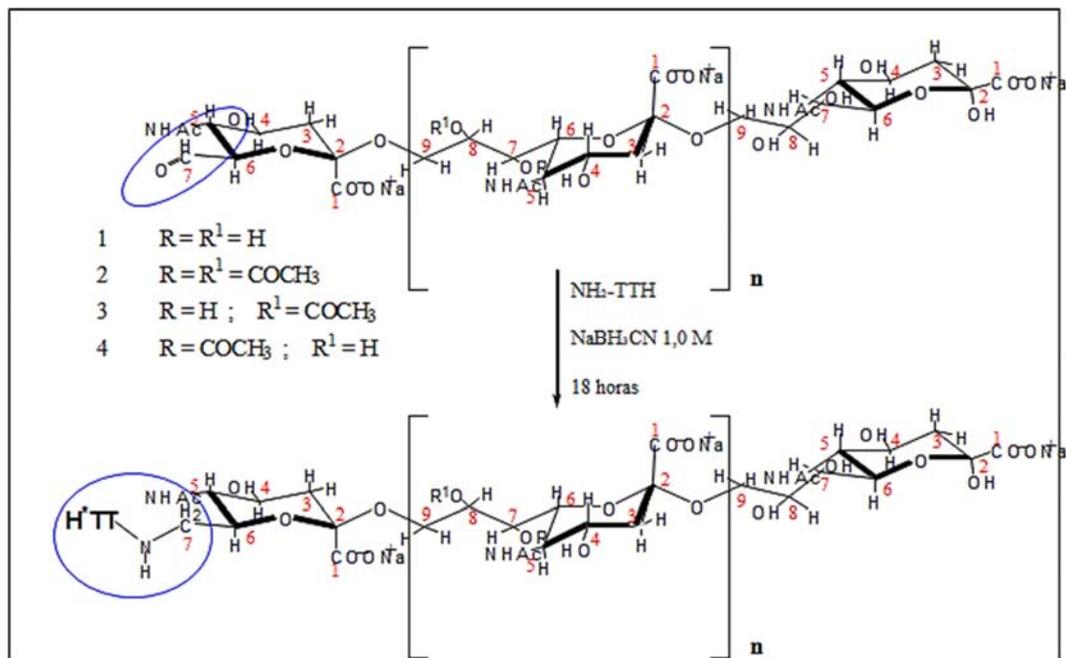


Figura 24: Reação de conjugação entre MPCO e MATT, através do método de aminação redutiva. Adaptado de SILVEIRA *et al.* (2007).

A reação de conjugação na escala piloto ocorreu após mistura das soluções concentradas de MATT e de MPCO em pH ligeiramente ácido. Em seguida, adicionou-se solução aquosa de cianoboridreto de sódio ($NaBH_3CN$) 1,0 M. A mistura reacional, contida em frasco de polipropileno foi mantida sob agitação constante de um agitador magnético durante 18 h. Ao término do tempo reacional, foram adicionadas soluções de di-hidrazida do ácido adípico (ADH) (0,5 M) e $NaBH_3CN$ (1,0 M). Essa mistura foi mantida por mais três horas, sob agitação.

A produção dos conjugados na escala industrial foi realizada em BPF, após o aumento de cinco vezes no volume reacional em relação à escala piloto, respeitando-se as proporções dos reagentes usados (Figura 25).

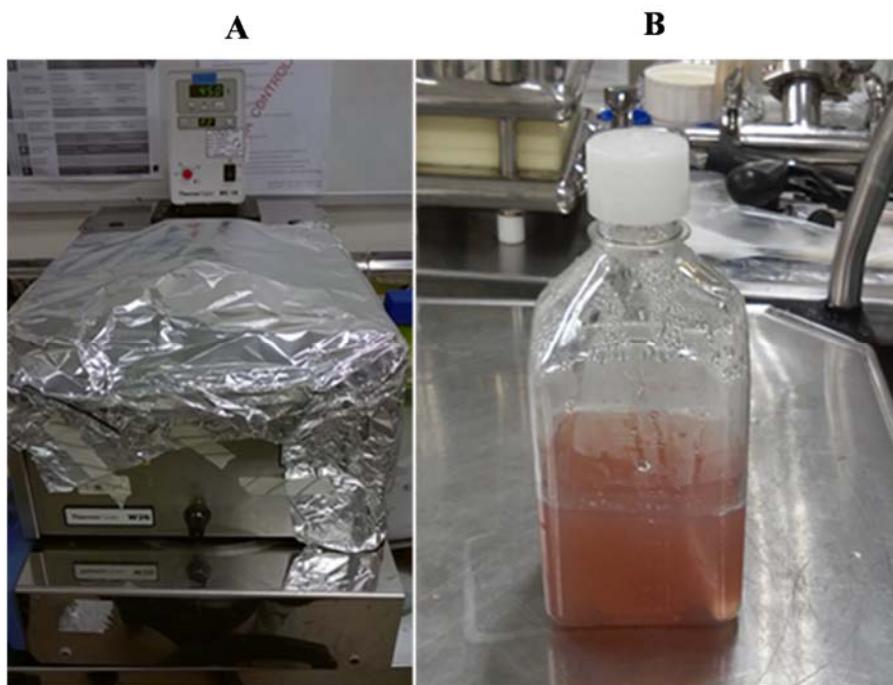


Figura 25: Reação de conjugação entre MPCO e MATT na escala industrial. Painel A: Banho-Maria contendo o frasco onde ocorre a reação, mantido sob agitação constante em agitador magnético. Painel B: Frasco contendo o conjugado (MPCT) ao término da reação.

4.3 PROCESSO DE PURIFICAÇÃO

4.3.1 Purificação do MPCO

4.3.1.1. Concentração e Purificação na escala piloto

Após o término da reação de oxidação do polissacarídeo C, o produto obtido foi purificado por UF em sistema de filtração tangencial, utilizando membranas de polietersulfona modificada.

O processo na escala piloto foi realizado em sistema de filtração tangencial Centramate (Pall Corporation) com três membranas com $0,09 \text{ m}^2$ de área filtrante útil cada, totalizando uma superfície total de $0,27 \text{ m}^2$ para a UF. Antes de iniciar a UF propriamente dita, foi realizado o condicionamento prévio das membranas de UF e a clarificação do volume reacional. A clarificação foi realizada por filtração convencional em filtro Millipack[®]

(Millipore) com tamanho médio de poro de 0,22 μm e superfície filtrante de 1000 cm^2 . Assim, todo o volume de produto a ser clarificado foi bombeado através da cápsula de filtração, com o auxílio de uma bomba peristáltica, e o material clarificado foi coletado em um frasco. O condicionamento das membranas de UF foi feito, inicialmente, a partir da recirculação de água para injetáveis (“water for injection” – WFI), seguida da recirculação do produto por 5 minutos, mantendo fechada a tubulação de saída do permeado e com TMP constante. A pressão máxima a que as membranas poderiam estar sujeitas durante o processo de filtração convencional e de UF foram informadas pelos respectivos fabricantes, sendo que a pressão ideal de filtração depende da porosidade da membrana utilizada, ou seja, quanto menor o poro de fracionamento, maior a velocidade da bomba e maiores as pressões ideais. Este controle foi feito através de manipulação das velocidades na bomba peristáltica. Neste trabalho utilizou-se uma bomba peristáltica Masterflex (Modelo 77601-00; Cole-Parmer). Após a clarificação, iniciou-se a purificação em sistema de filtração tangencial, num primeiro momento (etapa de concentração), visando reduzir o volume do produto, de forma a minimizar o consumo de WFI na segunda etapa do processo (diafiltração), conforme estabelecido em estudos prévios (SILVA, 2009). Assim, durante a “concentração” a recirculação do produto no sistema de filtração tangencial ocorreu com manutenção de TMP e ΔP , parâmetro que descreve a diferença entre as pressões de alimentação (P_a) e do retido (P_r), constantes em 12 psi e 8 psi, respectivamente, até que houvesse uma redução de cerca de 12 vezes no volume total. A manutenção da TMP foi possível através de ajustes da velocidade da bomba peristáltica e também nas válvulas dos manômetros da alimentação e do filtrado, no sistema de filtração tangencial. Para a etapa de diafiltração, realizada com os mesmos parâmetros de TMP e ΔP , procedeu-se a adição de WFI sobre o produto concentrado, com o auxílio de uma segunda bomba peristáltica. A velocidade de adição de WFI foi igual à de remoção do filtrado, de modo que o volume do produto foi mantido constante. O consumo de WFI foi igual a 10 vezes o volume do produto concentrado. Ao final da etapa de DF, procedeu-se nova etapa de concentração pela permeação do solvente, com a retenção do soluto. Assim, o volume do produto purificado foi reduzido até atingir um fator de concentração de cerca de 20 vezes em relação ao volume inicial.

Antes do escalonamento do processo de purificação do polissacarídeo C oxidado, realizou-se um estudo de otimização visando reduzir o tempo necessário para concluir todo o processo, no qual foram estabelecidas novas condições de TMP e ΔP , utilizando o produto a ser processado, procedimento descrito como “curva do produto”. Para isso, foi obtido um lote reacional de MPCO em escala piloto. Após a clarificação, a purificação foi realizada em sistema de filtração tangencial Centramate (Pall Corporation), com três membranas com $0,09 \text{ m}^2$ cada, totalizando uma superfície de $0,27 \text{ m}^2$ para a UF.

Inicialmente, foi construída a curva que determina a relação entre o fluxo do filtrado, dado em $\text{L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$, em função da TMP aplicada, mantendo-se fixa a ΔP , dada em psi, denominada curva de produto. Para o condicionamento do sistema, as tubulações de alimentação, retido e filtrado foram mantidas juntas no frasco contendo o produto, que ficou sob recirculação a uma TMP de 5 psi e ΔP de 4 psi, por cerca de cinco minutos. Em seguida, foram computados os valores de fluxo de concentrado e de filtrado (mL min^{-1}) obtidos a partir do aumento da TMP, com o auxílio de um cronômetro e de uma proveta graduada. Assim, foram coletados os dados referentes ao fluxo do filtrado ($\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) e à vazão do retido (mL min^{-1}) em valores de TMP variando de 5 a 38 psi, sendo que, a cada aumento da TMP o sistema foi mantido com recirculação do produto por cerca de cinco minutos, para a sua estabilização. Considerando-se que nos processos de TFF o fluxo de filtrado tende a um valor constante, denominado fluxo limite à medida que há o aumento da pressão de operação em função da camada gel polarizada, a TMP escolhida foi aquela em que não se observou a manutenção da constância do fluxo do filtrado, ou seja, quando não havia formação da camada gel. Após a coleta das informações sobre os fluxos de filtrado e de retido, os volumes coletados foram transferidos da proveta para o frasco original do produto.

Após a otimização da TMP, foi realizado o teste com variação de ΔP , para a construção da curva que descreve a relação entre o *Fluxo do filtrado* ($\text{L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$) e a ΔP , dada em psi. Em função da limitação da bomba peristáltica utilizada no processo, foi possível determinar o comportamento do sistema, somente, nas ΔP de 4 psi e 5 psi.

Com o estabelecimento das novas condições de TMP e ΔP , o processo de purificação foi conduzido conforme descrito anteriormente, sendo o primeiro passo a concentração do produto, seguida de 10 diafiltrações com água WFI e, finalizando, com a etapa de concentração final, em que o volume do produto atingiu um valor cerca de 28 vezes inferior ao volume inicial.

4.3.1.2. Concentração e Purificação na escala industrial.

Na escala industrial, a clarificação do produto de reação foi realizada por filtração convencional em cápsula filtrante Sartobran[®] P (Sartorius) com superfície filtrante de 0,5 m², composta por um pré-filtro de 0,45 μm e membrana com tamanho médio de poro de 0,65 μm (Figura 26).



Figura 26: Etapa de clarificação do MPCO na escala industrial. O produto é bombeado do reator através da cápsula filtrante com o auxílio da bomba peristáltica e o material clarificado é coletado diretamente em um frasco.

O produto clarificado foi purificado em sistema de filtração tangencial Centrassette (Pall Corporation) - utilizando três cassetes de membranas de polietersulfona modificada com $0,5 \text{ m}^2$ de área filtrante útil cada, totalizando uma superfície de $1,5 \text{ m}^2$ para a UF. Neste sentido, primeiramente houve a redução do volume do produto reacional em cerca de 20 vezes, seguida da diafiltração, onde foi consumido volume de água igual a 10 vezes o volume do produto concentrado (Figura 27). Por fim, foi feita a concentração final do produto. Em todas as etapas a TMP utilizada foi de 25 psi e ΔP de 4 psi. O produto purificado foi estocado na temperatura de -20°C até o momento do uso.



Figura 27: Etapa de diafiltração do MPCO na escala industrial realizada em sistema de filtração tangencial Centrassette com três membranas de polietersulfona com $0,5 \text{ m}^2$ de área filtrante (indicado pela seta).

As etapas envolvendo a reação de oxidação do polissacarídeo C, o isolamento e a purificação do produto MPCO são mostradas na Figura 28. Nesta figura estão descritas as principais diferenças operacionais entre os processos em escala piloto e escala industrial, bem como os objetivos pretendidos em cada etapa do processo.

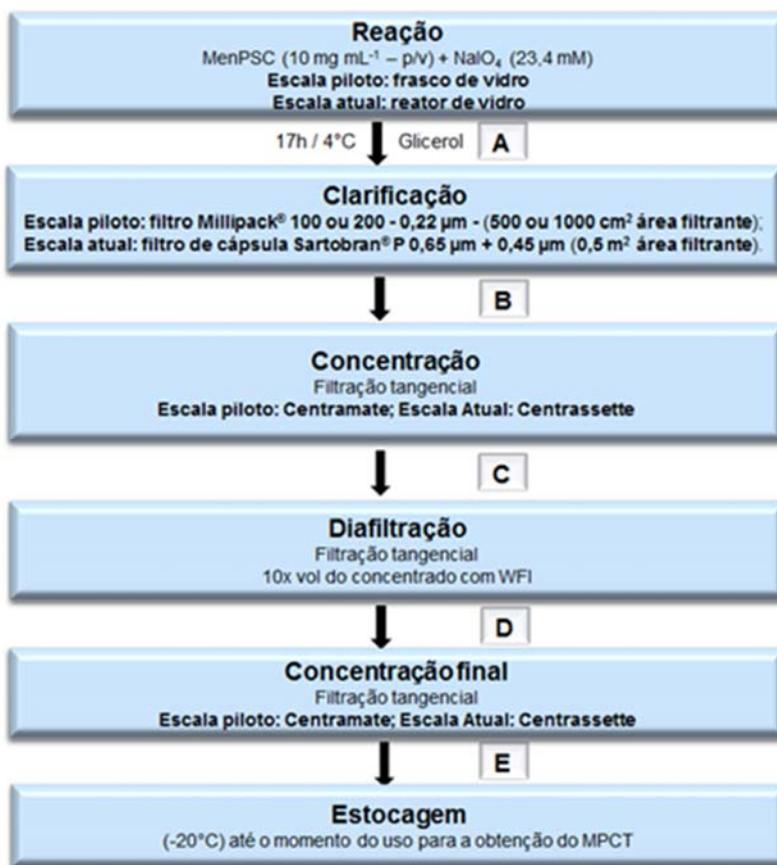


Figura 28: Etapas de obtenção do MPCO envolvendo a escala piloto e a escala industrial. Ressaltam-se as diferenças operacionais entre ambas as escalas e os objetivos pretendidos em cada etapa do processo: A – Parar a aeração; B - Remoção de partículas suspensas visando diminuir a possibilidade de entupimento das membranas de filtração tangencial; C - Redução do volume para o processamento por filtração tangencial (etapa de diafiltração); D - Remoção do glicerol excedente e de subprodutos da reação; D - Atingir a concentração mínima necessária para a reação de conjugação.

4.3.2 Purificação da MATT

4.3.2.1. Concentração e purificação na escala piloto.

Após o término da reação de ativação da TT, o produto obtido foi purificado por UF em sistema de filtração tangencial, utilizando membranas de polietersulfona modificada. Para a purificação na escala piloto foram utilizadas três membranas com 0,09 m² de área filtrante

útil cada, totalizando uma superfície de 0,27 m² para a UF, em sistema de filtração tangencial Centramate (Pall Corporation). A primeira etapa do processo foi a concentração do produto, conforme estabelecido em estudos anteriores (SILVA, 2009). Nesta etapa o produto foi mantido circulando no sistema de filtração tangencial com TMP constante, igual a 10 psi até que houvesse uma redução de cerca de 25 vezes no seu volume. A manutenção da TMP foi possibilitada por meio de ajustes da velocidade da bomba peristáltica e também nas válvulas dos manômetros da alimentação e do filtrado, no sistema de filtração tangencial.

Para a diafiltração, realizada com TMP constante igual a 10 psi, procedeu-se a adição de solução tampão fosfato (PBS) 0,02 M, pH 7,3, através da utilização de bomba peristáltica, com velocidade de alimentação igual à de remoção do filtrado, de modo que o volume do produto fosse mantido constante. O consumo de PBS 0,02 M, pH 7,3 foi igual a 10 vezes o volume do produto concentrado. Ao final da diafiltração, realizou-se nova etapa de concentração pela permeação do solvente, com a manutenção do soluto. Assim, o volume do produto purificado foi reduzido cerca de 30 vezes em relação ao seu volume inicial. O produto foi mantido sob refrigeração até o momento do uso na reação de conjugação com o MPCO, realizada no mesmo dia.

4.3.2.2. Concentração e purificação em escala industrial.

Para a purificação na escala industrial optou-se por utilizar uma única membrana com 0,5 m² em sistema Centrassette (Pall Corporation) para execução das etapas de concentração inicial e de DF, uma vez que o volume morto do sistema não afetaria as características desejadas do produto final. A etapa de concentração final foi realizada no sistema Centramate com apenas uma membrana com 0,09 m² de área, uma vez que o volume morto deste sistema é cerca de 5 vezes menor que o do sistema Centrassette. Assim, foi possível atingir a concentração final estipulada para o produto.

O processo também foi conduzido em três etapas, sendo a primeira etapa a redução do volume do produto em cerca de 28 vezes, seguida da diafiltração, onde foi consumido volume de PBS 0,02 M, pH 7,3, igual a 20 vezes o volume do produto concentrado. Por

fim, a concentração final do produto, foi realizada em sistema de filtração tangencial Centramate (Pall Corporation) com apenas uma membrana com 0,09 m² de área. Nesta etapa o volume do produto purificado foi reduzido cerca de 40 vezes em relação ao volume inicial processado. Em todas as etapas a TMP utilizada foi de 10 psi. O produto purificado foi armazenado sob refrigeração por algumas horas, até o momento do uso na conjugação com o MPCO, realizada no mesmo dia.

4.3.2.3. Otimização da etapa de concentração e purificação em escala industrial.

Os processos de concentração e purificação da MATT foram reavaliados visando a obtenção de melhores resultados, principalmente no que diz respeito ao tempo e custos do processo na escala industrial, em relação à escala piloto. Para isso, ao invés de realizar as etapas do processo com apenas uma membrana com 0,5 m² em sistema Centrassette (Pall Corporation), utilizou-se três membranas com 0,09 m² de área filtrante útil cada, totalizando uma superfície de 0,27 m² para a UF, em sistema de filtração tangencial Centramate (Pall Corporation) tanto para as etapas de concentração inicial (Figura 29 A) e de DF (Figura 29 B), como também para a etapa de concentração final, conforme descrito para o processo na escala piloto. Sendo assim, mesmo com o escalonamento do volume reacional de 2,5 vezes na escala industrial, o processo de purificação foi realizado nas mesmas condições descritas para a escala piloto, sendo o número de diafiltrações com PBS 0,02 M, pH 7,3, igual a 20 vezes o volume do produto concentrado.

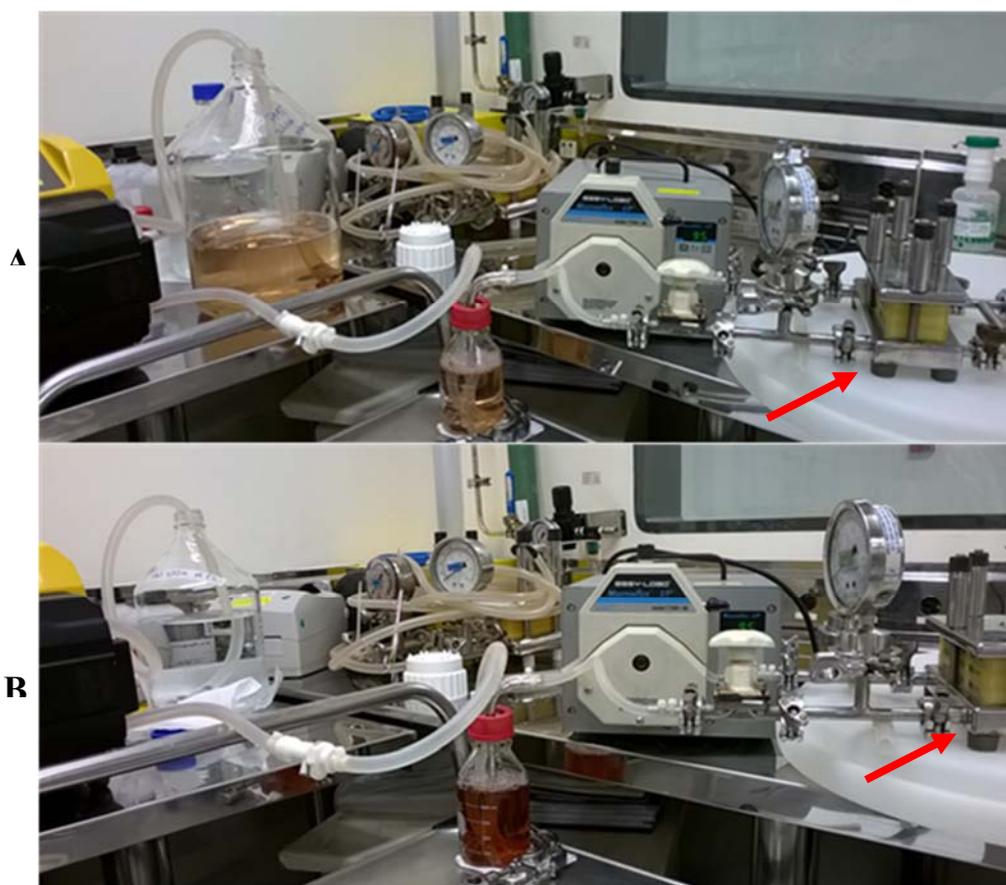


Figura 29: Processo de purificação da MATT em escala industrial. Painel A: Etapa de concentração inicial da MATT. Painel B: Etapa de diafiltração da MATT. Com a otimização do processo de purificação por filtração tangencial em escala industrial, utilizou-se o sistema Centramate (indicado pela seta) com três membranas de $0,09 \text{ m}^2$ de área filtrante.

As etapas envolvidas na reação de ativação da anatoxina tetânica com a hidrazina, o isolamento e a purificação do produto (MATT) são mostradas na Figura 30. Nesta figura, estão descritas as diferenças operacionais entre os processos em escala piloto e em escala industrial, bem como os objetivos pretendidos em cada etapa do processo.

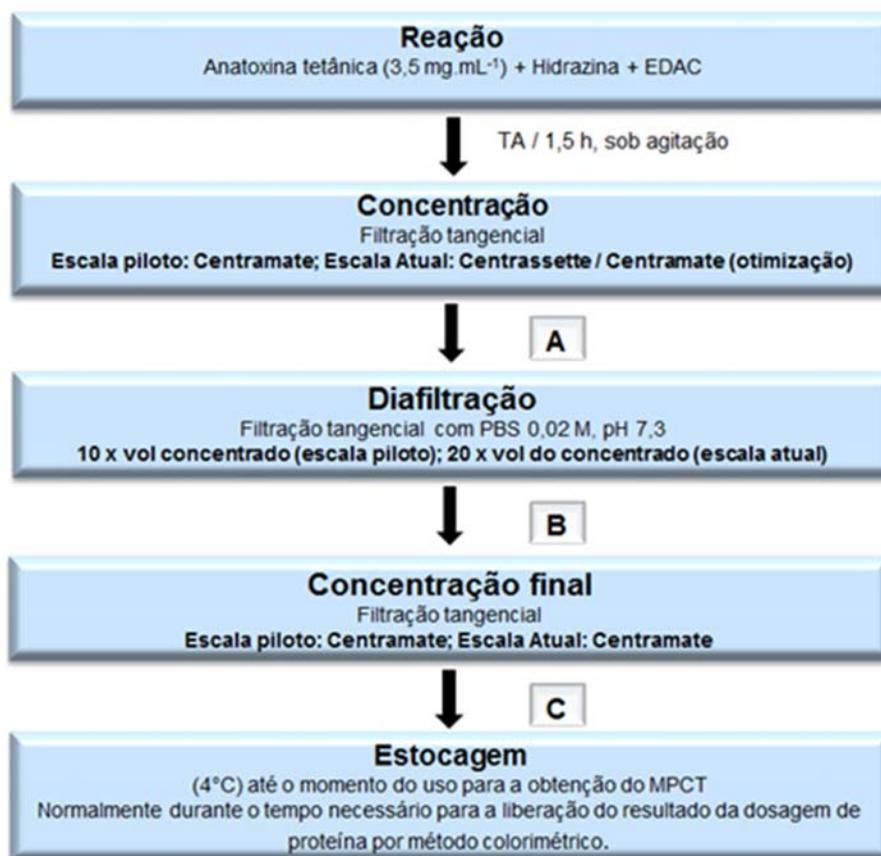


Figura 30: Etapas de obtenção da MATT envolvendo a escala piloto e a escala industrial. Ressaltam-se as diferenças operacionais entre ambas as escalas e os objetivos pretendidos em cada etapa do processo: A - Redução do volume para o processamento (etapa de diafiltração); B - Remoção da hidrazina excedente e de subprodutos da reação; C - atingir a concentração mínima necessária para a reação de conjugação.

4.3.3 Purificação do MPCT

4.3.3.1. Purificação e concentração na escala piloto.

Após o término da reação de conjugação entre MATT e MPCO, o produto obtido foi purificado por UF em sistema de filtração tangencial, utilizando membranas de polietersulfona modificada. O processo de purificação foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, cuja finalidade era minimizar o teor de cianeto e eliminar subprodutos de

reação, foi utilizada solução fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4) 10 mM, pH 10,5. Para a segunda etapa, utilizou-se PBS 1,0 mM, pH 7,0 a fim de eliminar subprodutos de reação e ajustar o pH final do produto.

Para a purificação na escala piloto foram utilizadas três membranas com 0,09 m² de área filtrante útil cada, totalizando uma superfície de 0,27 m² para a UF, em sistema de filtração tangencial Centramate (Pall Corporation). Antes de iniciar a UF propriamente dita, foi realizada a diluição da mistura reacional com solução fosfato monobásico de sódio (Na_2HPO_4) 10 mM, pH 10,5 até atingir volume 20 vezes superior ao volume de reação. Para a diafiltração, realizada com TMP constante igual a 12 psi, estabelecida em estudos anteriores a partir da determinação da curva do produto (SILVA, 2009), procedeu-se a adição de solução Na_2HPO_4 10 mM, pH 10,5, utilizando bomba peristáltica, de forma que a velocidade de alimentação fosse igual à de remoção do filtrado, mantendo, portanto, o volume do produto constante. Ajustes na velocidade da bomba peristáltica e também nas válvulas dos manômetros da alimentação e do filtrado, no sistema de filtração tangencial possibilitaram a manutenção da TMP constante. O consumo da solução Na_2HPO_4 10 mM, pH 10,5 foi igual a 20 vezes o volume do produto (ou 400 vezes o volume reacional). Ao término da diafiltração, o produto foi mantido circulando no sistema de filtração tangencial, com TMP constante igual a 12 psi, até que houvesse a redução de cerca de 10 vezes no volume. Para dar início à segunda etapa do processo de purificação, o produto resultante da primeira etapa (primeira diafiltração) foi diluído 10 vezes através da adição de PBS 1,0 mM, pH 7,0. Para esta segunda diafiltração, procedeu-se a adição de PBS 1,0 mM, pH 7,0, com TMP constante de 12 psi e velocidade de alimentação igual à de remoção do filtrado, de modo que o volume do produto fosse mantido constante. O consumo de PBS 1,0 mM, pH 7,0 foi igual a 15 vezes o volume do produto. Ao final da segunda diafiltração, procedeu-se a uma nova etapa de concentração pela permeação do solvente, com a retenção do soluto. Assim, o volume do produto purificado foi reduzido duas vezes em relação ao volume no início da etapa de diafiltração, de acordo com o estabelecido em estudos prévios (SILVA, 2009).

4.3.3.2. Purificação e concentração em escala industrial.

Para a purificação na escala industrial utilizou-se três membranas com $0,5 \text{ m}^2$ de área filtrante útil cada, totalizando uma superfície de $1,5 \text{ m}^2$ para a UF, em sistema de filtração tangencial Centrassette (Pall Corporation). O processo foi realizado conforme descrito para o procedimento na escala piloto, com duas diafiltrações, a primeira delas com solução Na_2HPO_4 10 mM, pH 10,5 (Figura 31) e a segunda com PBS 1,0 mM, pH 7,0.



Figura 31: Purificação do conjugado na escala industrial. Primeira diafiltração com solução Na_2HPO_4 10 mM, pH 10,5 realizada em sistema Centrassette com três membranas com $0,5 \text{ m}^2$ de área (indicado pela seta).

Os estudos de otimização do processo de purificação, possibilitaram estabelecer que, na escala industrial, o consumo da solução Na_2HPO_4 10 mM, pH 10,5 deveria ser igual a 15 vezes o volume do produto (ou 300 vezes o volume reacional), e não mais de 20 vezes o volume do produto (o que equivaleria a 400 vezes o volume reacional), como estava estabelecido para a escala piloto. Da mesma forma, para a segunda etapa do processo de purificação do conjugado, foi definido que durante a DF, o consumo de PBS 1,0 mM,

pH 7,0 poderia ser igual a 12 vezes o volume do produto, e não mais 15 vezes, como na escala piloto.

Assim, ao término da DF com solução Na_2HPO_4 10 mM, pH 10,5, o produto foi mantido circulando no sistema de filtração tangencial com TMP constante, igual a 12 psi até que houvesse uma redução de cerca de 10 vezes no volume. Para dar início à segunda etapa do processo de purificação, o produto resultante da primeira etapa foi avolumado cerca de 10 vezes através da adição de PBS 1,0 mM, pH 7,0 (Figura 32). Para a diafiltração, procedeu-se a adição de PBS 1,0 mM, pH 7,0, com TMP constante de 12 psi e velocidade de alimentação igual à de remoção do filtrado, de modo que o volume do produto fosse mantido constante. Ao final da diafiltração, procedeu-se a uma nova etapa de concentração da solução em duas vezes.



Figura 32: Purificação do conjugado na escala industrial. Segunda diafiltração com solução PBS 1,0 mM, pH 7,0 realizada em sistema Centrassette com três membranas de $0,5 \text{ m}^2$ de área (indicado pela seta).

As etapas envolvidas na obtenção do MPCT, incluindo a reação de conjugação entre o polissacarídeo oxidado (MPCO) e a proteína ativada (MATT) bem como a purificação e a filtração estéril do produto (MPCT) são apresentadas na Figura 33. Ainda nesta figura, as principais diferenças operacionais entre os processos na escala piloto e na escala industrial, bem como os objetivos pretendidos em cada etapa do processo são evidenciados.

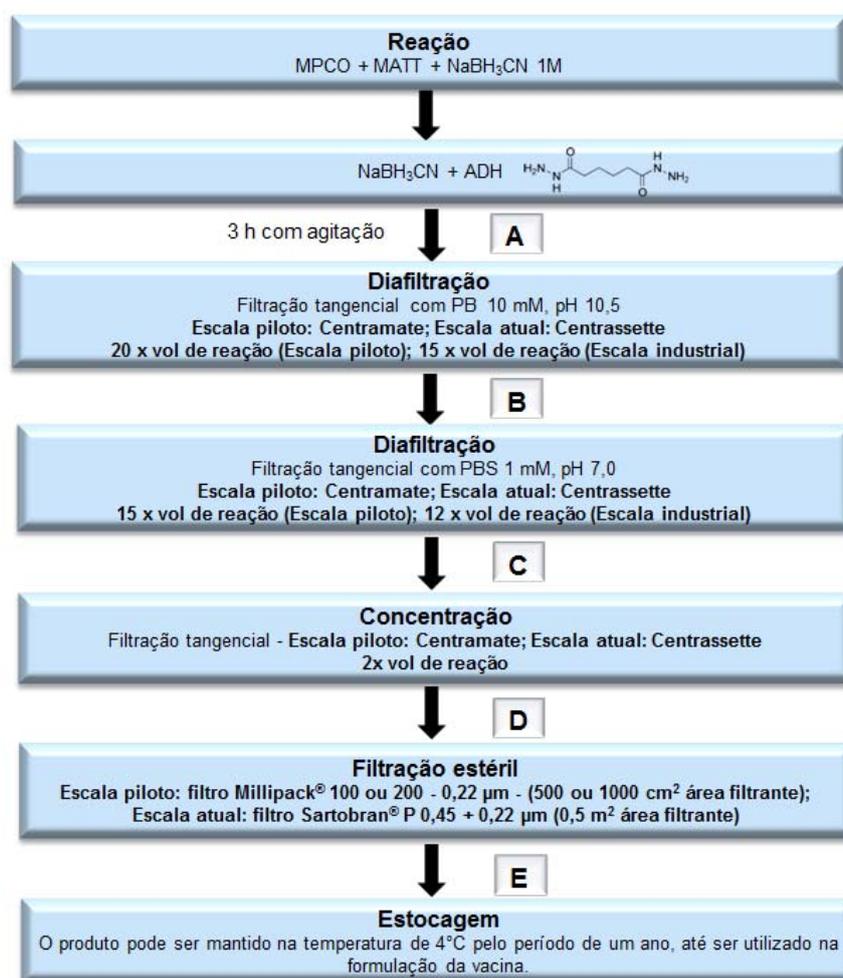


Figura 33: Etapas de obtenção do MPCT envolvendo a escala piloto e a escala industrial. Ressaltam-se as diferenças operacionais entre ambas as escalas e os objetivos pretendidos em cada etapa do processo: A - Parar a reação; B - Minimizar o teor de cianeto e eliminar os sub-produtos de reação; C - Ajustar o pH do produto; D - Atingir o volume e a concentração adequada do produto final; E – Garantir a esterilidade do produto final.

4.4 ANÁLISES QUÍMICAS

4.4.1 Determinação da concentração de ácido *N*-acetilneuramínico (NANA)

A quantificação do NANA em amostras de MenPSC, de MPCO e de MPCT obtidas nas escalas piloto e industrial, foi realizada através de método espectrofotométrico (SVENNERHOLM, 1957), utilizando como referência, o NANA comercial (Sigma).

4.4.2 Determinação da concentração de proteína

A quantificação de proteína das amostras de TT, de MATT e de MPCT obtidas nas escalas piloto e industrial foi realizada através do método de Lowry, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como referência (LOWRY *et al.*, 1951).

4.4.3 Cálculo da razão PS/Ptn

A relação entre as concentrações de polissacarídeo e proteína (PS/Ptn) da molécula conjugada fornece uma medida indireta da extensão da conjugação. Para a determinação desta razão foi utilizada a fórmula descrita abaixo:

$$\frac{PS}{Ptn} = \frac{\text{Concentração de MPCO no conjugado (mg mL}^{-1}\text{)}}{\text{Concentração de MATT no conjugado (mg mL}^{-1}\text{)}}$$

4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.5.1 Cromatografia de exclusão e filtração molecular - SEC

A cromatografia de exclusão e filtração molecular acoplada a um sistema de detecção da absorvância na região do ultravioleta (206 nm, 254 nm e 280 nm) foi utilizada para verificar o perfil de eluição característico das moléculas: MPCO, MATT e MPCT. Além disso, através da metodologia foi possível monitorar o conjugado obtido no sentido de identificar a presença de polissacarídeo oxidado e de proteína ativada não conjugados, bem como

avaliar, comparativamente, as moléculas obtidas na escala piloto e na escala industrial. Para tais análises, realizadas em coluna cromatográfica TSK G[®] 4000PW_{XL} (TOSOH Bioscience) (14,3 mL) usou-se como eluente NaCl 0,2 M, com um fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Foi aplicado na coluna o volume de 0,1 mL das amostras (MPCO, MATT e MPCT). A caracterização das amostras foi realizada através da determinação do Kav pela fórmula:

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

Onde: V_e = Volume de eluição da amostra

V_0 = Volume de eluição do blue dextran

V_t = Volume de eluição da acetona

4.5.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio - ¹H-RMN 1-D

Amostras de MenPSC, de MPCO e de MPCT foram analisadas por ¹H-RMN 1-D no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Far-Manguinhos (Fiocruz), em espectrômetro Bruker Avance, 400 MHz (Bruker BioSpin, Germany). Para isso, as amostras foram liofilizadas para a obtenção de massa seca. Em seguida, foram solubilizadas em água deuterada (D₂O) (D, 99,9% + 0,01% DMSO-D₆ (w/w) + 0,01% DSS-D₆, Cambridge Isotope Laboratories Inc.), para a obtenção de soluções contendo 10 mg mL⁻¹ (p/v). As análises por RMN foram realizadas à temperatura ambiente (25°C).

4.5.3 Eletroforese capilar de zona - CZE

Para a quantificação do polissacarídeo (PS) livre presente no MPCT utilizou-se a técnica de CZE, conforme descrito por Souza *et al.*, (2013), que permite a separação do PS livre com base nas características de tamanho e carga da molécula. O equipamento utilizado (HP 3D CE) possui detector de arranjo de diodos equipado com controle de temperatura por ar forçado e eletrodos de platina. As amostras foram detectadas no comprimento de onda de 200 nm, em capilar de sílica fundida recoberto com poliimida, com 112,5 cm de comprimento (tamanho efetivo de 104 cm), e 50µm de diâmetro interno (Agilent Technologies, EUA). O *Software* G1601A *ChemStation* foi utilizado para o controle do

instrumento e para a análise dos dados. As análises foram realizadas utilizando solução tampão tetraborato de sódio 50 mM, pH 10,0, com tensão de 30 kV, na temperatura de 40°C. O teor de PS livre foi determinado utilizando a equação da reta que descreve a relação linear entre os valores de área obtidos para concentrações crescentes do analito na presença da matriz da amostra, pelo método de adição padrão.

4.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS LOTES PRODUZIDOS NA ESCALA PILOTO E NA ESCALA INDUSTRIAL

A análise comparativa entre os lotes de MPCO, MATT e MPCT obtidos nas escalas piloto e industrial de produção foi realizada com base na avaliação de alguns parâmetros, tais como: volume reacional, expresso em litros (L); concentração final, expressa em mg mL^{-1} ; volume final do produto obtido, em mililitros (mL); tempo do processo, expresso em horas (h) e recuperação percentual (%) observada nos processos de purificação por UF em sistema de filtração tangencial em ambas as escalas. Os resultados referentes aos parâmetros de processo avaliados nas duas escalas de produção foram representados de forma gráfica, considerando unidades arbitrárias, com o objetivo de facilitar a análise comparativa. Além destes parâmetros, os resultados das análises físico-químicas, tais como SEC, $^1\text{H-RMN 1-D}$ e CZE também foram utilizados para a comparação dos lotes obtidos.

Para a análise estatística dos dados referentes aos parâmetros de processo, optou-se por utilizar o teste não paramétrico Mann-Whitney, em função do pequeno número de lotes produzidos na escala industrial. Os resultados foram obtidos no programa estatístico GraphPad Prism[®] versão 6.01 e expressos pela mediana, com nível de significância de 0,05. Cabe ressaltar que os valores calculados para a mediana de cada parâmetro avaliado foram tomados como base para a comparação de ambas as escalas de produção.

4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE TÉRMICA DOS LOTES DE MPCT OBTIDOS NA ESCALA INDUSTRIAL

4.7.1 Obtenção do Ingrediente Farmacêutico Ativo - IFA

Os IFAs de três diferentes lotes industriais de MPCT foram obtidos através do método de aaminação redutiva (SILVEIRA *et al.*, 2007; BASTOS *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2013; JESSOUROUN, *et al.*, 2015; BASTOS *et al.*, 2015), conforme descrito no item 4.2.3. A etapa de purificação foi realizada por TFF, conforme descrito no item 4.3.3 e, após a etapa de filtração estéril, os conjugados foram mantidos na temperatura de 4 °C em PBS 1,0 mM, pH 7,0.

4.7.2 Desenho do estudo

Alíquotas de 2,0 mL de cada lote de MPCT foram transferidas, assepticamente, em triplicata para tubos estéreis que foram mantidos nas temperaturas de 4 °C, 37 °C e 55 °C por cinco semanas (HO *et al.*, 2002). Após o tempo de incubação, as alíquotas foram acondicionadas na temperatura de 4 °C até o momento das análises.

4.7.3 Determinação da concentração de polissacarídeo e proteína

A concentração de polissacarídeo e proteína nos lotes de MPCT incubados nas temperaturas de 4 °C, 37 °C e 55 °C foi determinada ao final do tempo de incubação, através de métodos espectrofotométricos, conforme descrito nos itens 4.4.1 e 4.4.2, respectivamente.

4.7.4 Determinação do pH

Para a determinação do pH, foram preparados 45 tubos contendo 2,0 mL de cada um dos lotes de MPCT. Antes da verificação do pH o equipamento foi calibrado utilizando soluções tampão de pH 4,0; 7,0 e 10,0 (Merck Millipore) e as amostras foram mantidas à temperatura ambiente, por aproximadamente 15 minutos. O pH das amostras foi verificado em triplicata para cada lote, ao final de cada semana de incubação, sendo que os frascos foram descartados, posteriormente à determinação do valor de pH.

4.7.5 Espectroscopia de fluorescência e Dicroísmo circular

Para as determinações de espectros de intensidade de fluorescência e de Dicroísmo Circular, as amostras de MPCT foram diluídas em PBS 0,02 M, pH 7,0 em uma concentração final de 1 mg mL⁻¹ em relação à proteína.

As medições de dicroísmo circular foram realizadas em espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Corp., Tóquio, Japão) utilizando cubeta de quartzo com caminho ótico de 2,0 mm. Os espectros obtidos no ultravioleta distante (Far UV) foram determinados a 20 ± 1 °C com monitoramento entre 200 e 260 nm. Os resultados referem-se à média de três varreduras a uma velocidade de 50 nm min⁻¹, obtidos em intervalos de 1,0 nm. A estrutura de α -hélice foi monitorada pelo pico de elipticidade máxima a 220 nm. As linhas de base de tampão foram subtraídas dos respectivos espectros de amostra.

Os espectros de emissão de fluorescência do triptofano (Trp) foram obtidos em espectrofluorímetro Jasco FP-6500 (Jasco Corporation, Tóquio, Japão) com o ajuste do comprimento de onda de excitação a 280 nm. O espectro de emissão foi registrado entre 295 – 415 nm. A intensidade da fluorescência do Trp foi determinada na forma de área espectral e as mudanças espectrais foram quantificadas em função de alterações na média de energia de emissão (centro de massa espectral $\langle \nu \rangle$) de acordo com a equação:

$$\langle \nu \rangle = \sum \nu_i \times F_i / \sum F_i$$

em que F_i é a emissão de fluorescência no número de onda ν_i , e o somatório é realizado entre o valores obtidos para F . Os experimentos para verificar o espalhamento de luz (“Light scattering” - LS) foram realizados com comprimento de onda de excitação de 320 nm, e a emissão foi obtida entre os comprimentos de onda de 300 a 340 nm.

4.7.6 Análises físico-químicas: SEC; ¹H-RMN 1-D e CZE

A caracterização do perfil de eluição pela técnica de cromatografia de exclusão e filtração molecular, a determinação das características estruturais, através da espectrometria de ressonância magnética nuclear de próton e a quantificação do polissacarídeo livre pela

técnica de eletroforese capilar de zona nas amostras de MPCT submetidas à estocagem nas diferentes temperaturas foram realizadas conforme descrito nos itens 4.5.1; 4.5.2 e 4.5.3, respectivamente.

4.7.7 Ensaios imunológicos

4.7.7.1. Imunização dos animais

Os lotes de MPCT foram diluídos em condições assépticas com o diluente estéril, composto de Hidróxido de Alumínio utilizado como adjuvante (Alhydrogel; Brenntag; 350 µg de Al³⁺/dose) e soro fisiológico, pH ~ 5,6). Injetou-se o equivalente a 1/10 da dose humana (1,0 µg de polissacarídeo conjugado em 200 µL) dos conjugados diluídos, previamente armazenados nas temperaturas de 4 °C, 37 °C e 55 °C, por via intramuscular em camundongos suíços (12 – 17 g) organizados em grupos de cinco, totalizando 20 animais por lote de conjugado, por temperatura estudada. Os procedimentos realizados com os animais foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ número: LW65/14). As injeções (total de três) foram realizadas em intervalos de 15 dias e o sangue coletado no 45º dia (15 dias após a terceira dose) foi centrifugado (centrífuga IEC Centra CL2; Therme Electron Corporation) por 10 minutos (1080 xg) para a obtenção dos soros, que foram mantidos na temperatura de -20 °C até o momento do uso. Os soros foram testados para verificar a presença de anticorpos contra o polissacarídeo meningocócico C através do ensaio de ELISA e também para verificar a funcionalidade dos anticorpos produzidos através do ensaio bactericida do soro (SBA).

4.7.7.2. Ensaio de ELISA

A determinação dos níveis de anticorpo (IgG) contra o MenPSC no soro dos animais imunizados foi realizada através do ensaio de ELISA, conforme descrito previamente por GHEESLING, *et al.* (1994). Resumidamente, as placas (Imm lux REF 1010; Dynex) foram revestidas durante a noite a 4 °C com 100 µL de solução de MenPSC (5 µg mL⁻¹) em PBS 10 mM, pH 7,4 contendo albumina de soro humano metilada (5 µg mL⁻¹). Para a etapa de bloqueio das placas foi utilizada solução Tris salina tamponada (TBS) (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, Tween 20 a 0,02 % p/v) contendo 5 % de soro fetal bovino e incubação por 60

min à temperatura ambiente (TA). Após quatro lavagens com 200 μL de tampão de lavagem (TBS contendo Tween 20 a 0,05 % p/v), adicionou-se em cada poço da placa, as amostras de soro a serem testados e também de soro padrão diluídos em série (fator de diluição 2) a partir da diluição 1/1000 (v/v). Para a detecção da ligação do anticorpo, as placas foram incubadas com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich A-3688) diluído 1/3000 (v/v) durante 120 min à TA. Todos os soros foram titulados em duplicata e os títulos foram determinados pela leitura da absorvância a 405 nm no leitor de microplacas VERSAmax (Molecular Devices). Os títulos de ELISA foram calculados usando unidade arbitrária de ELISA em relação a um soro padrão (1000 EU mL^{-1}) e expressa por valores transformados para logaritmo neperiano (ln) ($\ln \text{ U mL}^{-1}$).

4.7.7.3. Ensaio bactericida

Para a realização do ensaio bactericida, utilizou-se a cepa padrão C11 (genótipo C:16:P1.7-1,1) de *N. meningitidis* grupo C, gentilmente cedida pelo “Health Protection Agency” da Inglaterra. O cultivo da bactéria foi realizado em placa contendo agar Columbia, “overnight” na temperatura de 37 °C em atmosfera contendo 5 % de dióxido de carbono (CO_2). No dia seguinte, cerca de 10 – 20 colônias bacterianas foram transferidas para uma nova placa contendo agar Columbia e incubadas por 4 horas na temperatura de 37 °C em atmosfera com 5 % de CO_2 . Ao término do período de incubação, as células foram ressuspensas em meio de cultivo específico, e a concentração celular foi ajustada para conter $1,5 \times 10^4$ unidades formadoras de colônias (UFC). O ensaio propriamente dito foi realizado pela adição de 10 μL da suspensão bacteriana e 10 μL de complemento do soro humano desprovido de atividade bactericida em cada poço de uma placa de 96 cavidades com fundo em “U”. Essas placas continham 20 μL de diluições seriadas dos soros dos animais imunizados a serem analisados, que foram previamente inativados (56 °C por 30 minutos) a fim de eliminar a atividade do complemento. As placas foram incubadas por 60 minutos na temperatura de 37 °C e ao término do período de incubação transferiu-se 10 μL do volume contido em cada poço da placa de 96 cavidades para placas de Petri contendo Agar Columbia, que foram incubadas “overnight” na temperatura de 37 °C em atmosfera

contendo 5 % de CO₂. Ao término do tempo de incubação realizou-se a contagem do número de UFC observado em cada placa. Os títulos de SBA foram expressos como a recíproca da diluição de soro em que ≥ 50 % das células sofreram lise, em comparação com o número de células observadas no poço da placa em que não foi adicionado o soro teste ou o complemento de soro humano (ZOLLINGER e MANDRELL, 1983). Foram utilizados soros controle positivo e negativo em cada ensaio. Dados de Goldschneider *et al.* (apud BORROW, 2005) estabeleceram que o título de anticorpos bactericidas ≥ 4 utilizando complemento de soro humano é capaz de conferir proteção contra a doença causada pelo meningococo do grupo C (BORROW *et al.*, 2005).

4.7.8 Análise estatística

Os dados deste estudo não apresentaram distribuição normal. Assim, para a análise estatística, os títulos de IgG e de anticorpos bactericida foram transformados logaritmicamente (Ln para os títulos obtidos no ensaio de ELISA e Log para os títulos de SBA). No caso dos títulos bactericidas, os valores foram obtidos na forma de título médio (t_m), através da fórmula:

$$t_m = (\log t_p + \log t_r)/2$$

Onde $\log t_p$ é o logaritmo do título padrão e $\log t_r$ é o logaritmo da recíproca da diluição imediatamente superior àquela diluição referente ao título padrão (NAUTA, 2011) e descritos como média geométrica dos valores calculados. A significância das diferenças nos níveis de IgG e dos títulos SBA entre os soros de camundongo imunizados foi avaliada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para a comparação das temperaturas elevadas em relação à temperatura controle (4 °C). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para a análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Prism[®] versão 6.01.

4.8 ANÁLISE COMPARATIVA DE CUSTOS DE PRODUÇÃO DE LOTES NAS ESCALAS PILOTO E INDUSTRIAL

Para a análise de custos dos processos de obtenção dos produtos intermediários (MPCO e MATT), bem como o conjugado final (MPCT), utilizou-se o método de custeio variável. Como o presente estudo foi realizado em Bio-Manguinhos, optou-se por replicar os métodos e modelos adotados pela empresa, que por sua vez mensura os custos com insumos e mão-de-obra em cada processo industrial. Assim, a análise de custo realizada no processo de otimização da TFF considerou o custo médio dos insumos utilizados nos processos, como as membranas de TFF, os filtros de cartucho e o consumo de WFI, de acordo com as normas contábeis vigentes. O custo médio com mão-de-obra, incluindo os custos salariais e encargos trabalhistas, foi considerado para a análise de custo relacionada com o aumento dos volumes reacionais.

A fim de normalizar os dados de produtividade utilizou-se como base a massa, em gramas (g), de cada um dos produtos: MPCO; MATT e MPCT obtidos nos respectivos processos produtivos nas escalas piloto e industrial, ou seja, para a realização dos cálculos foram considerados os custos necessários para a obtenção de um grama de cada um desses produtos. Dessa forma, por exemplo, para a determinação dos custos de produção referentes ao escalonamento das reações químicas, considerou-se o custo com os funcionários alocados para a função, o tempo gasto no processo e a massa em gramas de cada produto obtido. Com isso, os custos com pessoal que, em teoria seriam considerados custos fixos, foram transformados em custo variável, a partir da contabilização do custo homem-hora referente a cada nível de processo produtivo.

Para a avaliação dos custos com a otimização do processo de purificação por TFF, levou-se em conta os custos com as membranas de TFF, cápsulas filtrantes utilizadas nas etapas de clarificação do MPCO e de filtração estéril do MPCT, bem como o consumo de água WFI e a quantidade, em massa (g), de cada produto obtido, ou seja, custos com a matéria-prima que, normalmente variam proporcionalmente ao nível de produção industrial.

O escalonamento da produção do MPCT foi realizado segundo as BPF, tanto nas fases de obtenção da MATT, do MPCO e do MPCT, como na etapa de purificação desses

compostos. Para a reação de obtenção do MPCO, o aumento de escala foi de cerca de 5 vezes, não só para o volume de reação, como também na área superficial disponível para a purificação por ultrafiltração de fluxo tangencial. Para obtenção da MATT o aumento de escala foi de 2,5 vezes nos passos de reação e purificação, enquanto que na conjugação, a mudança de escala foi de 5 vezes. Os dados relativos aos custos com pessoal e matérias-primas a partir de quatorze lotes de MPCO, oito lotes de MATT e quatro lotes de MPCT obtidos em escala piloto foram comparados com os mesmos parâmetros em relação a seis lotes de MPCO, oito lotes de MATT e seis lotes de MPCT na escala industrial.

Após a primeira análise referente ao processo de obtenção da MATT, verificou-se a necessidade de implementar ações para a sua otimização não só em relação aos parâmetros de processo, principalmente: tempo do processo, dado em horas (h) e recuperação percentual (%), como também aos custos de produção, que na escala industrial mostraram-se superiores aos da escala piloto. Assim, os dados de custo de produção deste produto intermediário foram revistos, e a análise comparativa entre os processos em ambas as escalas produtivas foi realizada considerando a obtenção de três lotes deste produto intermediário na escala industrial, após a otimização do processo, em comparação com os oito lotes obtidos na escala piloto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento da metodologia para obtenção do IFA constituinte da nova vacina meningocócica C conjugada em escala industrial foi realizado a partir de dados da escala piloto, incluindo as etapas de reação e purificação por filtração tangencial dos processos de oxidação do polissacarídeo C, ativação da anatoxina tetânica e conjugação entre o polissacarídeo C oxidado e a proteína tetânica ativada.

5.1 Obtenção do MPCO

Inicialmente serão apresentados os resultados referentes ao estudo de otimização da etapa de purificação do MPCO, que possibilitou o estabelecimento dos parâmetros do processo realizado na escala industrial. Os resultados da análise comparativa entre a etapa de purificação do referido produto nas escalas piloto e industrial serão apresentados na forma de tabelas contendo os dados referentes a alguns parâmetros do processo de purificação nas duas escalas produtivas, além dos valores das medianas utilizadas para a análise estatística.

Na Tabela 5 são mostrados os parâmetros de filtração tangencial relacionados à etapa de purificação de um único lote de MPCO obtido na escala piloto, que serviu de base para o escalonamento do processo ao nível industrial.

Os valores observados para o fluxo do filtrado foram avaliados graficamente, em relação às diferentes pressões transmembrana utilizadas. Conforme mostrado na Figura 34 é possível notar uma relação praticamente linear entre a TMP e o fluxo do filtrado. Como não foi observada constância nos valores de “fluxo do filtrado”, considera-se que não houve a formação da camada gel polarizada. Entretanto, apesar dos resultados mostrarem a possibilidade de trabalho na TMP de até 38 psi, o processo foi conduzido na TMP de 25 psi, devido a algumas limitações operacionais, como por exemplo, aquela imposta pela bomba peristáltica utilizada e pela tubulação do sistema de TFF (Tygon[®] Chemical), cuja pressão máxima de trabalho segundo os fabricantes, é de 25 psi.

Tabela 5: Valores obtidos para o fluxo de filtrado em função do aumento da TMP durante o experimento de otimização do processo de purificação do MPCO no sistema de filtração tangencial Centramate (Pall Corporation).

Pa (psi)	Pr (psi)	TMP (psi)	ΔP (psi)	Vazão de filtrado (mL min ⁻¹)	Vazão de concentrado (mL min ⁻¹)	Temp (°C)	Fluxo do filtrado LMH (L h ⁻¹ m ⁻²)
0	0	0	0	0,0	0	20,0	0,0
7	3	5	4	4,3	350	20,0	1,0
10	6	8	4	8,2	500	21,0	1,8
14	10	12	4	13,8	640	21,0	3,1
20	16	18	4	21,0	800	21,5	4,7
24	20	22	4	28,0	910	22,0	6,2
28	24	26	4	32,0	1000	22,0	7,1
32	28	30	4	38,0	1160	22,5	8,4
36	32	34	4	42,0	900	23,0	9,3
40	36	38	4	47,0	1000	23,0	10,4

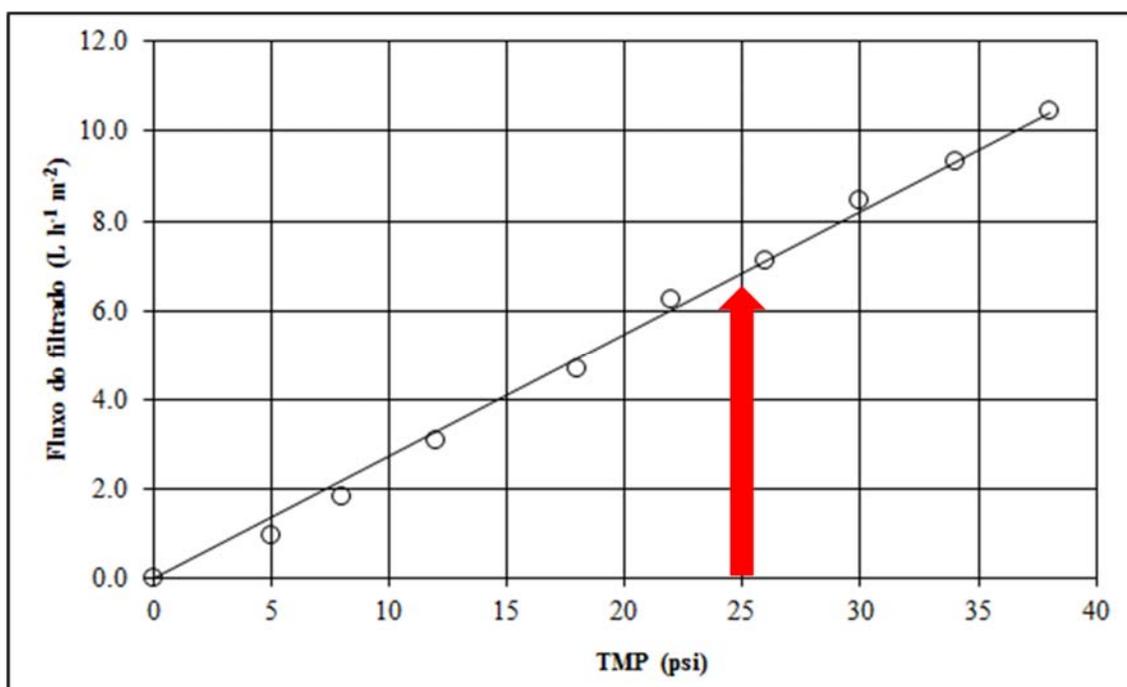


Figura 34: Fluxo do filtrado em função da TMP. A seta mostra a TMP utilizada no processo de filtração tangencial.

As Tabelas 6 e 7 mostram, respectivamente, os dados referentes à concentração final (mg mL^{-1}), ao tempo total do processo (h) e à recuperação (%) do produto para quatorze lotes de MPCO produzidos na escala piloto e cinco lotes do referido produto obtidos na escala industrial. Da mesma forma, também são apresentados os valores das medianas calculadas para cada um dos parâmetros citados acima, considerando-se os quatorze lotes da escala piloto ($n = 14$) e os cinco lotes ($n = 6$) da escala industrial.

Tabela 6: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo de produção do MPCO na escala piloto.

Lote Piloto	Concentração final NANA (mg mL^{-1})	Recuperação (%)	Tempo de processo (h)
PSCoxi 03/12	119,0	56,5	9,50
PSCoxi 05/12	109,4	46,5	6,63
PSCoxi 07/12	106,0	47,7	9,42
PSCoxi 09/12	82,5	25,4	3,50
PSCoxi 10/12	57,3	28,7	5,90
PSCoxi 11/12	66,5	35,5	6,73
PSCoxi 12/12	89,1	35,6	4,50
PSCoxi 13/12	111,1	46,2	12,5
PSCoxi 14/12	109,1	52,7	7,15
PSCoxi 16/12	109,2	56,4	8,93
PSCoxi 17/12	95,0	39,6	12,8
PSCoxi 18/12	113,6	57,6	8,50
MPCO 01/12	88,4	51,5	2,70
MPCO 03/12	100,8	52,9	5,92
Mediana (n = 14)	103,4	47,1	7,00

Tabela 7: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo de produção do MPCO na escala industrial.

Lote Industrial	Concentração final NANA (mg mL⁻¹)	Recuperação (%)	Tempo de processo (h)
PSCoxiESC 04/12	85,34	70,7	4,83
PSCoxiESC 05/12	145,1	44,6	9,48
MPCO 04/12	85,71	47,0	3,32
MPCO 05/12	80,36	63,0	4,33
MPCO 06/12	101,6	83,0	9,53
MPCO Esc 01/16	80,00	40,6	3,33
Mediana (n = 6)	85,5	55,0	4,58

O aumento de 5,8 vezes do volume reacional da escala industrial em relação à escala piloto resultou ao final do processo em um volume aproximadamente oito vezes maior na escala industrial comparado à escala piloto. Os valores das medianas da concentração dos produtos finais relacionados às escalas piloto (103,4 mg mL⁻¹) e industrial (85,50 mg mL⁻¹) foram considerados suficientemente próximos ($p = 0,387$).

Como uma tentativa de diminuir o tempo global de processo na escala industrial, a pressão operacional de 12 psi, utilizada anteriormente na escala piloto foi aumentada em cerca de duas vezes, para o valor de 25 psi. Com isso, houve aumento do fluxo de filtrado na escala industrial (1,8 L m⁻² h⁻¹) quando comparado com o processo em escala piloto (0,4 L m⁻² h⁻¹).

A recuperação do processo foi maior para a escala industrial (55,0 %), em comparação com a escala piloto (47,1 %) ($p = 0,1736$) e tal fato pode ser associado, provavelmente, ao ajuste eficiente na carga da membrana, em termos de massa de material processado, durante o aumento de escala.

O tempo gasto no processo de purificação por filtração tangencial foi de 4,5 h na escala industrial, e de 7,0 h na escala piloto. Ainda que não seja uma diferença estatisticamente

significativa ($p = 0,264$), considera-se que houve um ganho no processo, já que o volume de trabalho na escala industrial foi aproximadamente seis vezes maior do que o volume da escala piloto, o que levou à obtenção de produto (MPCO) com volume final total suficiente para a realização de dois lotes de reação de conjugação. Isto representa uma economia real no tempo de processo global para a produção do conjugado, sendo uma característica desejável, para a produção em escala industrial.

No que diz respeito às melhorias realizadas no processo de obtenção do MPCO na escala industrial, a utilização do reator, proporcionou o monitoramento constante dos parâmetros: temperatura e agitação da reação, o que conseqüentemente, possibilitará uma maior rastreabilidade do processo. O emprego da cápsula filtrante constituída de diferentes porosidades, além de maior área disponível para a clarificação do produto previamente ao processo de filtração tangencial, praticamente eliminou os problemas de entupimento da membrana clarificante observados na escala piloto, o que certamente, influenciou no tempo e nos custos do processo em maior escala. Com base na avaliação da influência da TMP no tempo de processo e nas características do produto foi possível estabelecer a TMP de trabalho, aproximadamente duas vezes maior (25 psi) para a escala industrial, sem alteração das características do produto. Tal melhoria promoveu a redução não significativa do tempo total do processo de produção do MPCO, muito embora esta tenha sido considerada uma economia real no tempo global do processo de produção do conjugado na escala industrial.

A análise comparativa entre alguns parâmetros do processo (volume reacional, concentração final, recuperação, tempo de processo e volume final) de ambas as escalas (piloto e industrial) de obtenção do MPCO, considerando unidades arbitrárias, é indicada na Figura 35.

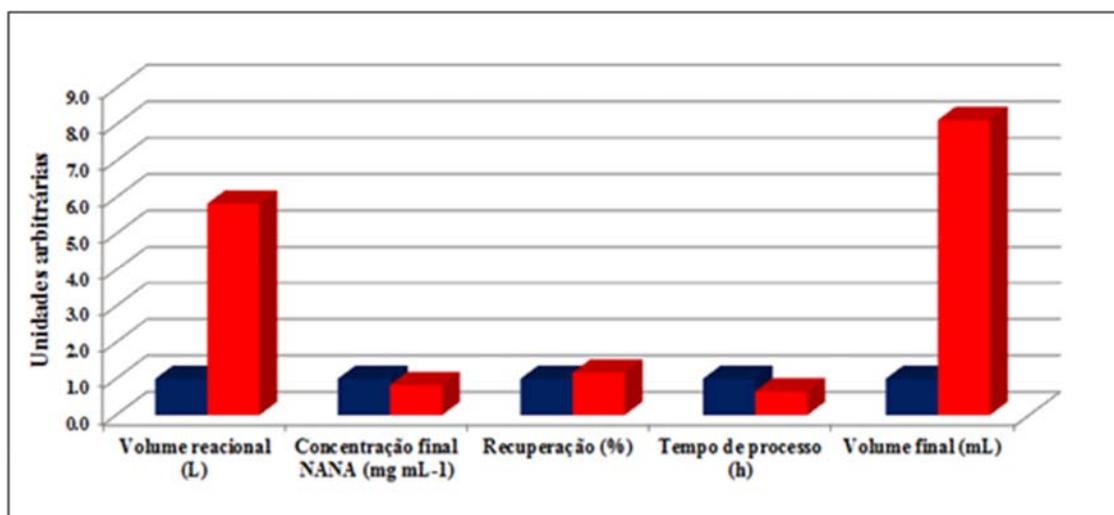


Figura 35: Parâmetros observados no processo de obtenção do MPCO nas escalas piloto (azul) e industrial (vermelho).

5.2 Obtenção da MATT

Os resultados referentes à análise comparativa entre a etapa de purificação da MATT nas duas escalas produtivas, bem como os dados referentes ao estudo para o melhoramento do processo de purificação na escala industrial, a partir da utilização do sistema Centramate serão apresentados na forma de tabelas contendo os dados referentes a alguns parâmetros do processo de purificação nas escalas piloto e industrial, além dos valores das medianas utilizadas para a análise estatística.

As Tabelas 8 e 9 mostram os dados referentes à concentração final (mg mL^{-1}), ao tempo gasto no processo de purificação por filtração tangencial (h) e à recuperação (%) do produto para oito lotes de MATT produzidos nas escalas piloto e industrial. Também são apresentados os valores das medianas calculadas para cada um dos parâmetros citados acima, considerando-se o mesmo número ($n = 8$) de amostras avaliadas em ambas escalas.

Tabela 8: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo de produção da MATT na escala piloto.

Lote Piloto	Concentração final (mg mL⁻¹)	Recuperação (%)	Tempo de processo (h)
TTH 01/12	91,1	61,0	0,70
TTH 02/12	115,9	64,8	1,17
TTH 03/12	88,3	87,6	2,83
TTH 07/12	117,7	94,3	0,28
TTH 08/12	118,8	100,0	0,35
TTH 09/12	91,2	78,6	0,50
TTH 10/12	71,8	55,7	0,58
MATT 01/12	103,6	83,4	0,33
Mediana (n = 8)	97,4	81,0	0,55

Tabela 9: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo de produção da MATT na escala industrial.

Lote Industrial	Concentração final (mg mL⁻¹)	Recuperação (%)	Tempo de processo (h)
TTHESC 02/12	114,4	85,1	1,48
TTHESC 03/12	126,8	89,9	1,55
TTHESC 04/12	114,7	88,7	1,50
TTHESC 05/12	123,9	95,8	2,05
MATT 03/12	105,9	81,7	1,40
MATT 04/12	85,5	60,6	1,23
MATT 05/12	85,8	58,9	1,28
MATT 06/12	80,6	61,7	2,00
Mediana (n = 8)	110,2	83,4	1,50

Os valores das medianas calculadas a partir das concentrações dos produtos finais relacionados às escalas piloto ($97,40 \text{ mg mL}^{-1}$) e industrial ($110,2 \text{ mg mL}^{-1}$) foram muito próximos ($p = 0,879$), assim como os valores das medianas calculadas a partir da recuperação dos produtos finais: 81,0 % para a escala piloto; 83,4 % para a escala industrial ($p = 1,000$). Entretanto, os tempos gastos em ambos os processos piloto (0,55 h) e industrial (1,50 h) foram significativamente diferentes ($P = 0,0156$). Tal constatação pode ter sido decorrente da operacionalidade do processo de filtração tangencial na escala industrial que, diferentemente do processo em menor escala, foi executado com ambos os sistemas: Centrassette - para as etapas de concentração inicial e diafiltração e Centramate - para a etapa de concentração final. Como consequência, a superfície filtrante utilizada na escala industrial foi apenas 1,85 vezes maior ($0,5 \text{ m}^2$) que a utilizada na escala piloto ($0,27 \text{ m}^2$), quando deveria ser 2,5 vezes maior ($0,675 \text{ m}^2$) no processo escalonado, uma vez que o volume reacional foi 2,5 vezes maior que o da escala piloto, de modo a possibilitar a manutenção da carga da membrana (VAN REIS *et al.*, 1997). Assim, constatou-se a necessidade do melhoramento do processo em escala industrial, de modo a tentar reduzir o tempo de operação para a aplicação na rotina de produção.

Conforme verificado em estudos anteriores, a proteína ativada tem sua estabilidade garantida por, no máximo, 48 horas (SILVA, 2009), sendo que a partir deste período de tempo observa-se uma tendência à agregação do material, provavelmente em função da formação de ligações intramoleculares que promovem a polimerização da molécula. Por este motivo, o aumento da escala de produção da MATT foi estabelecido em 2,5 vezes, para que todo o volume obtido pudesse ser imediatamente utilizado na reação de conjugação.

Considerando a necessidade de melhoramento do processo na escala industrial, tendo em vista que o tempo gasto no processo realizado nesta escala foi significativamente superior, quando comparado à escala piloto, adotou-se a estratégia de manter as condições de processamento utilizadas na escala piloto mesmo com o escalonamento do volume reacional de 2,5 vezes. Assim, foram utilizadas três membranas com $0,09 \text{ m}^2$ de área filtrante útil cada, totalizando uma superfície de $0,27 \text{ m}^2$ para a UF, em sistema de filtração

tangencial Centramate (Pall Corporation) tanto para as etapas de concentração inicial e de DF como também para a etapa de concentração final, que foram realizadas com TMP constante igual a 10 psi. Os resultados referentes à concentração final (mg mL^{-1}), ao tempo gasto no processo de purificação por filtração tangencial (h) e à recuperação (%) do produto para os três lotes de MATT obtidos nessas condições são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo produção da MATT na escala industrial utilizando o sistema de filtração tangencial Centramate (Pall Corporation).

Lote Industrial	Concentração final (mg mL^{-1})	Recuperação (%)	Tempo de processo (h)
TTH Esc 01/15	185,2	64,6	0,78
TTH Esc 02/15	118,5	88,0	0,98
MATT Esc 01/16	195,7	78,3	1,28
Mediana (n = 3)	185,2	78,3	0,98

Verificou-se que ao utilizar o sistema de filtração tangencial Centramate para a purificação da MATT na escala industrial o tempo gasto no processo piloto (0,55 h) e industrial (0,98 h) não diferiram significativamente ($P = 0,1836$), assim como os valores das medianas calculadas a partir da recuperação dos produtos finais: 81,0 % para a escala piloto; 78,3 % para a escala industrial ($p = 0,9212$). Por outro lado, os valores das medianas calculadas a partir da concentração final dos produtos relacionados à escala piloto ($97,40 \text{ mg mL}^{-1}$) e à escala industrial ($185,2 \text{ mg mL}^{-1}$) foram significativamente diferentes ($p = 0,0242$), sendo que a concentração do produto final obtido na escala industrial mostrou-se superior àquela obtida na escala piloto. Considerando que a recuperação do produto em ambos os processos foi muito semelhante, é possível descartar a possibilidade de uma eventual transferência de massa para o permeado, durante o processamento na escala piloto, ser a causa do valor inferior observado para a concentração final do produto. Com o escalonamento da reação de ativação houve, necessariamente o aumento da massa processada que culminou,

consequentemente, na maior concentração final do produto. Cabe ressaltar que a reação de conjugação entre a proteína ativada e o polissacarídeo oxidado permite uma flexibilidade para a utilização dos reagentes, de modo que sejam realizados ajustes nos volumes utilizados em função da concentração final obtida após a respectiva etapa de purificação. Assim, nos processos em que os produtos finais apresentam maior concentração, utiliza-se menos volume e vice-versa. Desta forma, considera-se que a diferença observada não foi crítica para o processo.

A Figura 36 mostra a análise comparativa, levando-se em conta alguns parâmetros de processo (volume reacional, concentração final, recuperação, tempo de processo e volume final), entre as escalas piloto e industrial de obtenção da MATT, considerando-se unidades arbitrárias.

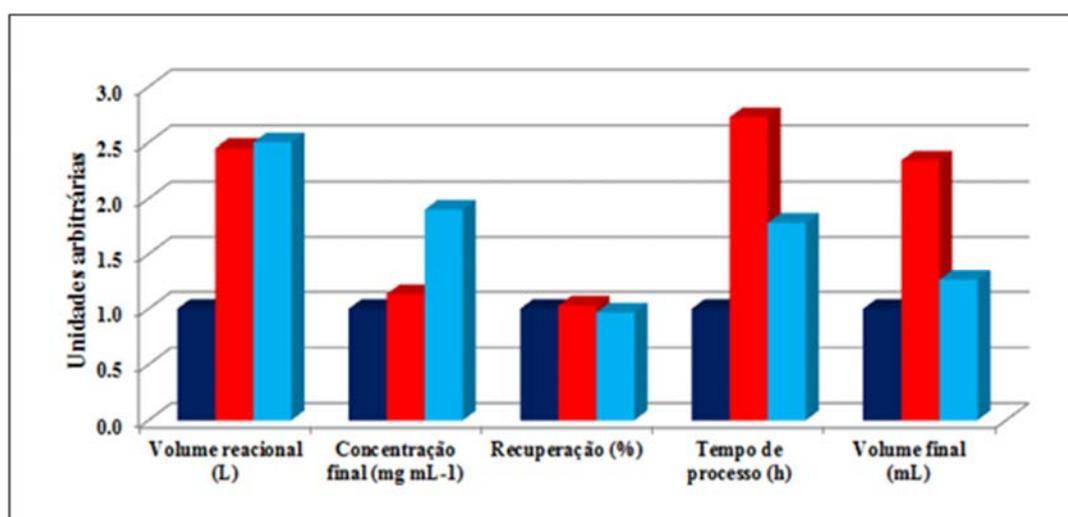


Figura 36: Parâmetros observados no processo de obtenção da MATT nas escalas piloto (azul), industrial (vermelho) e industrial após o melhoramento (azul claro).

5.3 Obtenção do MPCT

Os resultados referentes à análise comparativa entre a etapa de purificação do MPCT nas escalas piloto e industrial, serão apresentados na forma de tabelas contendo os dados

referentes a alguns parâmetros do processo de purificação nas duas escalas produtivas, além dos valores das medianas utilizadas para a análise estatística.

Os dados obtidos para os parâmetros tempo de processo (h), relação entre as concentrações do glicídio e da proteína (PS/Ptn) no produto final e também a recuperação (%) do polissacarídeo e da proteína no glicoconjugado são mostrados nas Tabelas 11 e 12 tanto para a escala piloto como para a escala industrial, respectivamente. As tabelas também mostram os valores das medianas calculadas para cada um dos referidos parâmetros, considerando-se os números de amostras avaliadas na escala piloto ($n = 4$) e na escala industrial ($n = 6$).

Tabela 11: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo de produção do MPCT na escala piloto.

Lotes Piloto	Recuperação PS (%)	Recuperação Ptn (%)	PS/Ptn	Tempo de processo (h)
Conj 22/12	18,6	82,0	0,45	7,00
Conj 23/12	24,8	79,6	0,62	1,40
MPCT 01/12	25,4	91,6	0,55	1,50
MPCT 02/12	25,6	90,0	0,57	2,60
Mediana ($n = 4$)	25,1	86,0	0,56	1,55

A comparação dos dados referentes às Tabelas 11 e 12 mostrou que a recuperação da proteína no produto final foi similar em ambas as escalas ($p = 0,257$), assim como a recuperação final do glicídio ($p = 0,257$). Da mesma forma, o produto obtido apresentou razão PS/Ptn sem diferença significativa entre ambas as escalas, sendo o valor de 0,56 para a escala piloto e de 0,52 para a escala industrial ($p = 0,762$).

Tabela 12: Valores obtidos para alguns parâmetros do processo de produção do MPCT na escala industrial.

Lotes Industriais	Recuperação PS (%)	Recuperação ptn (%)	PS/Ptn	Tempo de processo (h)
ConjESC 02/12	26,2	93,6	0,50	1,55
ConjESC 05/12	21,8	86,0	0,51	1,75
MPCT 03/12	22,8	88,0	0,52	1,37
MPCT 04/12	26,0	85,6	0,60	2,22
MPCT 05/12	29,6	100,0	0,59	1,50
MPCT ESC 01/16	26,0	99,2	0,52	1,30
Mediana (n = 6)	26,0	90,8	0,52	1,53

Mesmo com o aumento de cinco vezes do volume reacional da escala industrial em relação à escala piloto não foi observada diferença significativa entre os tempos totais de processo que em termos de mediana foram de 1,55 h para a escala piloto e de 1,53 h para a escala industrial ($p = 0,669$), indiferente ao tempo de sete horas gastos no processamento de um dos quatro lotes de conjugado obtidos na escala piloto (Tabela 10). No caso, para a obtenção do referido lote, foi utilizado um conjunto de membranas já empregado em processos anteriores, cuja recuperação, após a limpeza, ficou próxima ao limite mínimo de 80 %, considerado satisfatório (LUTZ e RAGHUNATH, 2007). Apesar disto, foi consumido um tempo bem maior em relação àqueles verificados (1 – 2 h) para os demais processos desenvolvidos em escala piloto.

Para o processo em escala industrial, a área disponível para a UF foi 5,6 vezes maior que aquela usada na escala piloto, o que resultou na redução de 81 % na carga da membrana do processo industrial em comparação com o processo na escala piloto. Cabe ressaltar que a escolha da área adequada com base na manutenção da carga constante direciona para um escalonamento correto (VAN REIS *et al.*, 1997).

A Figura 37 mostra a análise comparativa entre alguns parâmetros de processo - volume reacional, recuperação do glicídio (NANA) e da proteína no glicoconjugado, relação entre as concentrações do glicídio e da proteína (PS/Ptn) no produto final e tempo gasto na obtenção do MPCT, todos referentes a ambas as escalas de produção, considerando-se unidades arbitrárias.

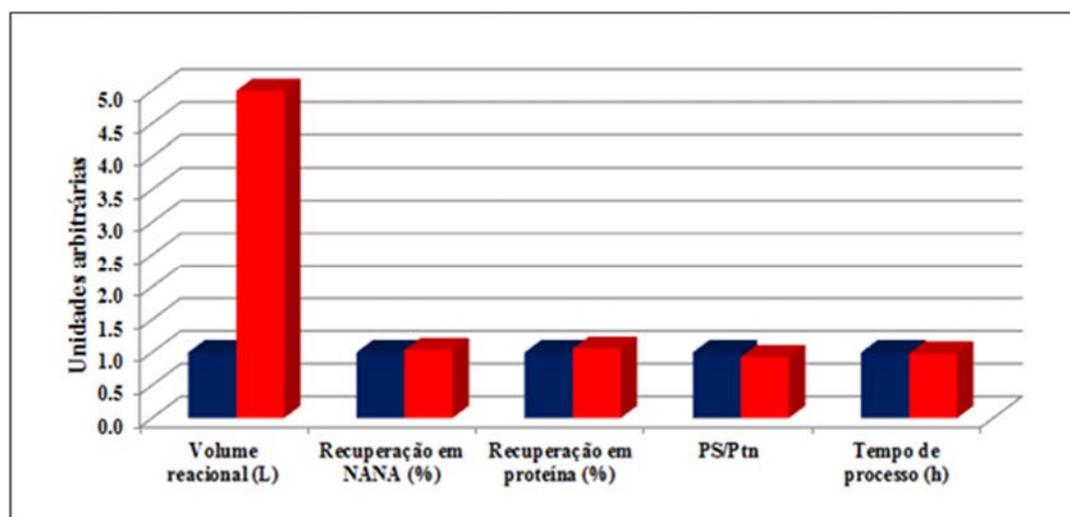


Figura 37: Parâmetros observados no processo de obtenção do MPCT nas escalas piloto (azul) e industrial (vermelho).

A ideia de usar os cassetes Centrasette, de maior área superficial, para o processamento por filtração tangencial na escala industrial teve por base o fato de que as aplicações desenvolvidas na escala piloto em um cassete de menores dimensões Centramate podem ser facilmente escalonadas, em função da manutenção não só da geometria do cassete, como também da trajetória e formato do canal do filtrado. Sabe-se que a concepção de membrana no formato de folha plana fornece uma geometria adequada para o escalonamento linear, porque o comprimento do caminho de fluxo é mantido constante, porém o número total de canais disponíveis por área de membrana para a operação em grande escala é maior (VAN REIS *et al.*, 1997). A dinâmica de fluidos nos canais de membrana foi preservada, durante o escalonamento, por causa da semelhança geométrica dos cassetes utilizados em ambas as escalas, e também como consequência da adequação dos volumes e vazões de fluido.

Portanto, os parâmetros que influenciam o desempenho do processo como, por exemplo, a pressão transmembrana (TMP) e a distância que o fluido percorre à medida que flui transversalmente à membrana foram mantidos, conforme requerido para os estudos de escalonamento em que se salienta a importância de se manter esses parâmetros constantes desde a pequena escala até a produção em grande escala (BALL, 2010).

Os resultados apresentados até aqui indicam a eficácia do processo de purificação por TFF no que diz respeito à remoção dos subprodutos de reação de conjugação e do glicídio não conjugado. Uma abordagem semelhante de purificação por TFF foi utilizada para a produção de uma vacina conjugada contra *Salmonella enterica*, em que o escalonamento do processo foi satisfatório (MICOLI *et al.*, 2012). Todos os processos de produção e purificação mostraram-se eficientes, pois foram observadas recuperações semelhantes para ambas escalas de produção. Além disso, apesar do aumento de escala, o processo de obtenção do conjugado pode ser considerado rápido, relativamente simples e passível de ser concluído em uma semana de trabalho.

5.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

5.4.1 Cromatografia de exclusão e filtração molecular – SEC

A cromatografia de exclusão e filtração molecular é uma das técnicas de análise recomendada para o monitoramento da distribuição de macromoléculas de volumes moleculares (peso molecular e forma) diferentes, tais como o glicoconjugado e os componentes - proteína e glicídio - que lhe deu origem (WHO, 2004; FRASCH, 2009). Neste sentido, esta técnica serviu para identificar e caracterizar o conjugado isolado (MPCT), o glicídio (MPCO) e a proteína (MATT) que foram usados na sua síntese. Esta metodologia possibilitou verificar também que tanto o excesso de reagentes como os subprodutos das reações químicas de oxidação, ativação e conjugação foram completamente removidos após a purificação em sistema de filtração tangencial. O perfil cromatográfico tanto da preparação purificada de MPCO, como de MATT e de MPCT apresentou, em cada caso, um único pico (Figura 38) demonstrando a eficiência da UF. Nesta mesma figura é mostrada a sobreposição dos perfis cromatográficos dos produtos

(MPCT, MATT e MPCO) obtidos em ambas as escalas. O conjugado apresenta pico com menor volume de eluição (V_e), e, conseqüentemente, maior peso molecular, em comparação com MATT e MPCO, sendo que este último tem como característica o maior V_e , portanto, considerado de menor peso molecular.

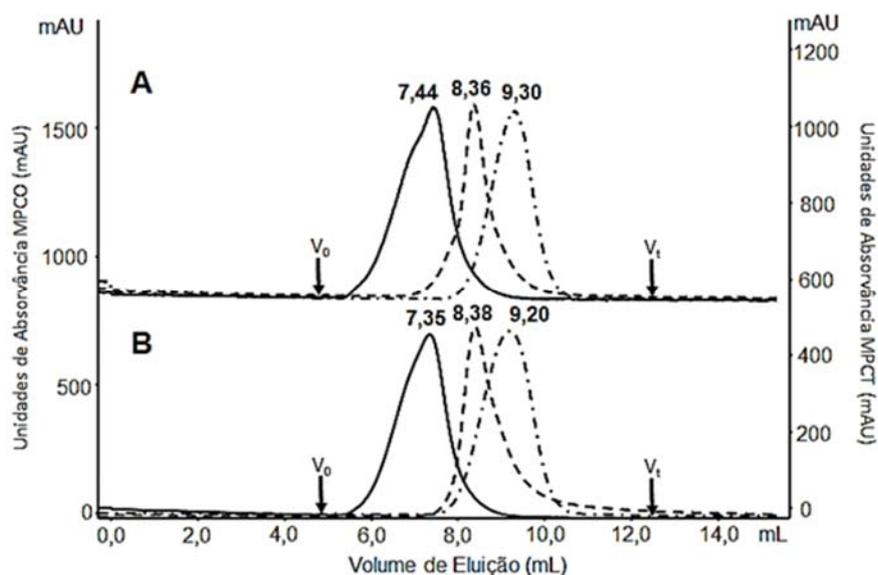


Figura 38: Perfis cromatográficos de um lote representativo do MPCO (linha com traço e ponto), MATT (linha tracejada) e MPCT (linha sólida) obtido nas escalas piloto (A) e industrial (B). A eluição isocrática da coluna cromatográfica TSK G[®] 4000 PWxl foi feita com uma solução 0,2 M de NaCl (0,5 mL min⁻¹) e o monitoramento da absorvância no comprimento de onda de 206 nm.

A Tabela 13 mostra os valores de K_{av} calculados para os três lotes de cada uma das duas escalas de produção apresentados anteriormente, na Figura 38. A comparação entre os perfis cromatográficos de MPCO, MATT e MPCT mostrou não só, que as moléculas obtidas em ambas escalas são quimicamente equivalentes, como também, sugere a eficiência do escalonamento do processo de purificação por UF.

Tabela 13: Valores de Kav calculados para os lotes de MPCO, MATT e MPCT mostrados na Figura 38.

Produtos	Escala Piloto	Escala Industrial
MPCO	0,53	0,54
MATT	0,40	0,41
MPCT	0,26	0,26

5.4.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio - ¹H-RMN 1-D

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN 1-D) é um dos métodos de análise recomendados para a confirmação da identidade e integridade da molécula glicídica antes e após a conjugação (WHO, 2004; FRASCH, 2009). A Figura 39 mostra os espectros de ¹H-RMN 1-D obtidos para o MPCO produzido nas escalas piloto e industrial, onde se observa um pico em 9,5 ppm, referente ao grupamento aldeído gerado na molécula. Além disso, na mesma figura são observados os deslocamentos químicos característicos da molécula glicídica, que indicam a manutenção da sua integridade estrutural após a reação de oxidação.

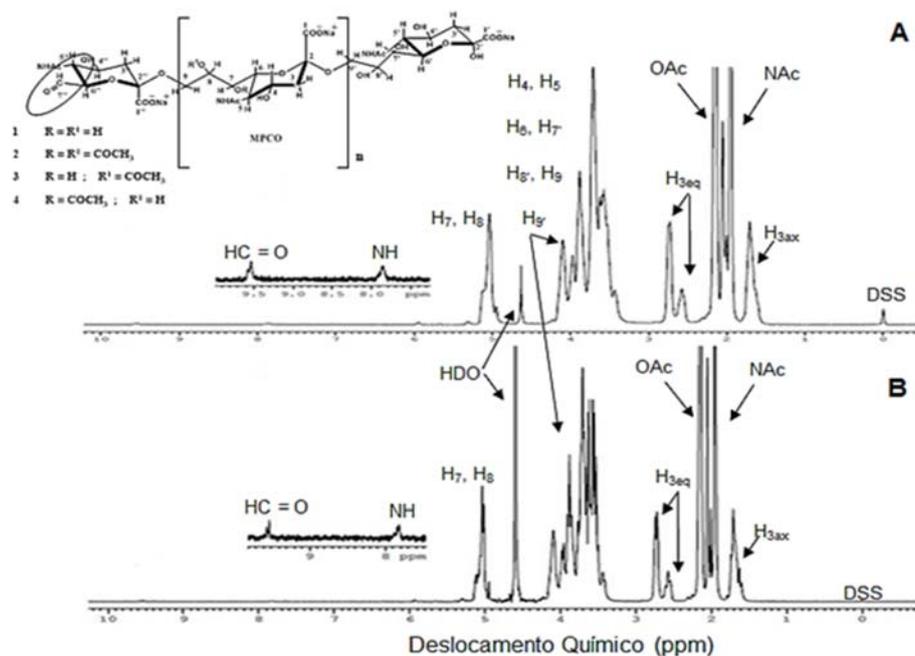


Figura 39: Comparação entre os espectros de ^1H -RMN de um lote representativo do MPCO obtido na escala industrial (A) e na escala piloto (B). A análise foi realizada em espectrômetro Bruker Avance, 400 MHz (Bruker BioSpin, Germany).

A formação do conjugado foi demonstrada pelo desaparecimento do pico referente ao aldeído, em 9,5 ppm e pelo surgimento de assinalamentos referentes à presença da proteína na molécula conjugada: os picos entre 6,5 e 7,5 ppm referentes aos prótons dos grupamentos aromáticos e picos entre 0,3 e 1,6 ppm referentes aos prótons dos grupamentos alifáticos. Tais características foram observadas para o MPCT obtido em ambas as escalas de produção, conforme pode ser observado na Figura 40. A análise comparativa dos espectros de ^1H RMN permitiu também verificar a eficiência do escalonamento, tanto das reações de obtenção, como dos processos de purificação por filtração tangencial do MPCO e do MPCT.

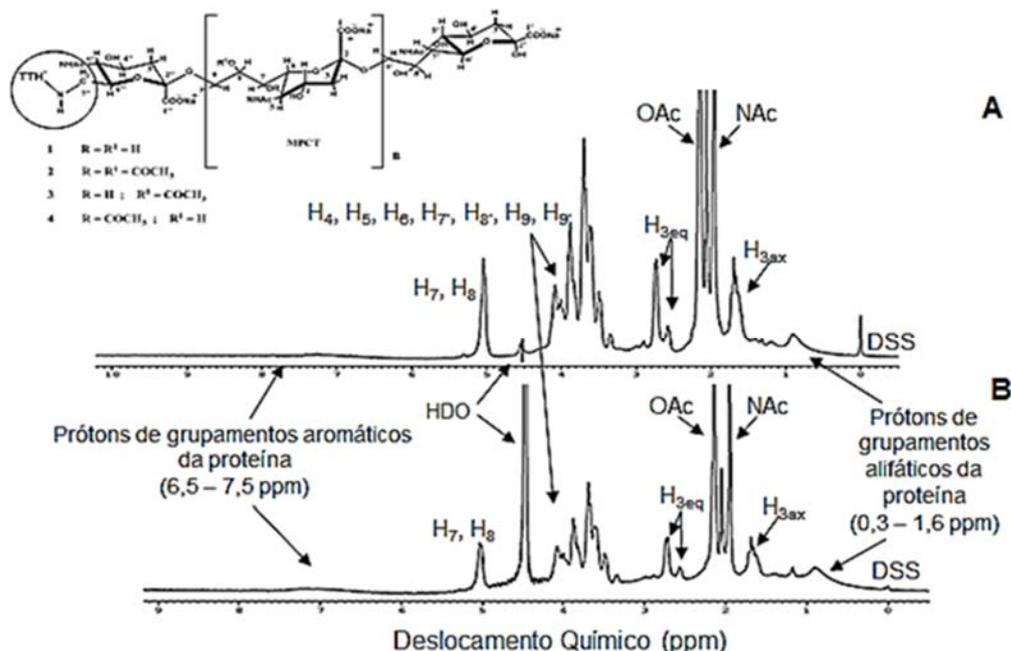


Figura 40: Comparação entre os espectros de ¹H-RMN de um lote representativo do MPCT obtido na escala industrial (A) e na escala piloto (B). A análise foi realizada em espectrômetro Bruker Avance, 400 MHz (Bruker BioSpin, Germany).

5.4.3 Eletroforese capilar de zona - CZE

A eletroforese capilar de zona tem sido utilizada no controle de qualidade de vacinas conjugadas, para a determinação dos componentes não conjugados. Como vantagens desta técnica analítica, cita-se o fato de que, além de não haver a necessidade de preparo prévio da amostra, a técnica apresenta elevado poder de resolução e o resultado é obtido em curto espaço de tempo, com a utilização de pequena quantidade de amostra (SOUZA *et al.*, 2013). Neste trabalho, foi possível observar, através da análise por CZE, que todos os lotes de conjugados obtidos tanto na escala piloto, como na escala industrial, apresentaram teor de glicídio livre inferior a 10 %. A Tabela 14 mostra os resultados referentes ao teor de MPCO não conjugado, observado para alguns lotes de MPCT obtidos em ambas as escalas. No que diz respeito à especificação em relação ao teor de glicídio livre para o MPCT (< 20%), como ainda não existe descrição, nos compêndios oficiais, sobre o limite máximo preconizado para a vacina meningocócica C conjugada, foi utilizada a especificação

adotada para vacinas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b, que empregam a anatoxina tetânica como proteína carreadora, conforme descrito na Farmacopeia Europeia (2013) e por CUERVO *et al.* (2007). Portanto, de acordo com os resultados obtidos através da análise por CZE os lotes de MPCT obtidos em ambas as escalas apresentaram teor de glicídio livre abaixo da especificação.

O perfil característico do conjugado, cujo tempo de migração é de aproximadamente 19 minutos é mostrado na Figura 41. Nas condições de análise, o MPCO não conjugado apresenta-se completamente separado do MPCT, com tempo de migração de 22 minutos. Os resultados sugerem que os conjugados obtidos em ambas as escalas de produção apresentam características similares.

Tabela 14: Teor de MPCO livre determinado pela análise por CZE de alguns lotes de MPCT obtidos na escala piloto e na escala industrial

Amostras	Lotes	Teor de MPCO livre (%)
Escala piloto	A	0,51
	B	6,11
	C	3,08
Escala industrial	D	2,59
	E	2,16
	F	0,59

Condições de análise: capilar de sílica fundida recoberto com poliimida, com 112,5 cm de comprimento (tamanho efetivo de 104 cm), e 50µm de diâmetro interno (Agilent Technologies, EUA); solução tampão tetraborato de sódio 50 mM, pH 10,0, 30 kV, 40 °C e 200 nm.

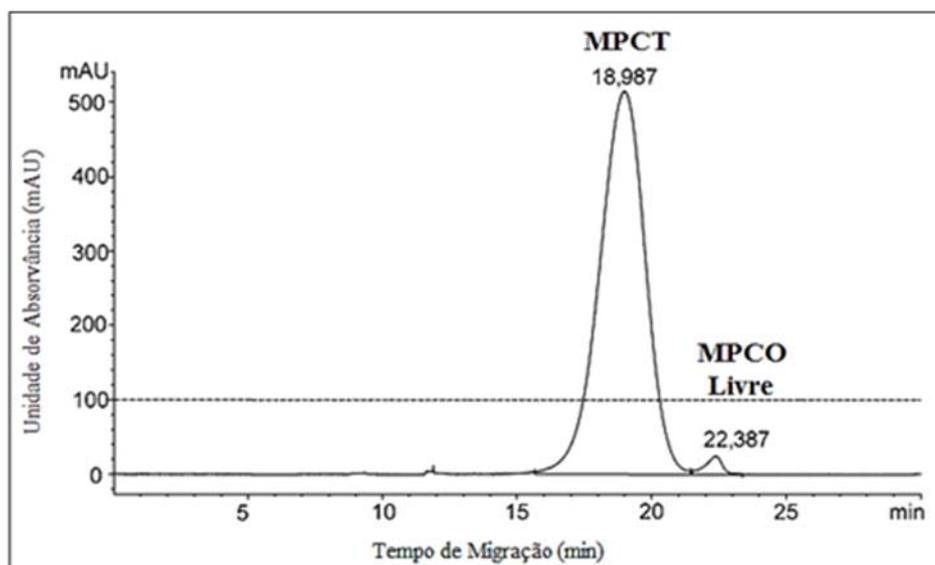


Figura 41: Eletroferograma (CZE) do MPCT. A figura mostra o perfil de migração do MPCT e do MPCO livre (não conjugado).

Os critérios analíticos estabelecidos durante o desenvolvimento de novos produtos são utilizados, não só para a avaliação da consistência de obtenção dos lotes produzidos (VAN REIS *et al.*, 1997), como também devem ser capazes de demonstrar, a partir da análise dos produtos intermediário e final, que o processo escalonado é comparável com aquele obtido na escala piloto, ou seja, que o produto obtido a partir do processo escalonado, segundo as BPF, está de acordo com as especificações estabelecidas (BAART *et al.*, 2007). Neste contexto, os métodos analíticos utilizados neste trabalho tais como SEC, ^1H RMN 1D e CZE, métodos recomendados pela OMS (LEMERCINIER e JONES, 1996; WHO, 2004; SILVEIRA *et al.* 2007; GUDLAVALLETI *et al.*, 2007; MICOLI *et al.*, 2012;) mostraram-se ferramentas valiosas que possibilitaram a comparação dos processos de obtenção do MPCO, MATT e MPCT em ambas as escalas.

Os perfis cromatográficos indicaram, não só, a eficácia do processo de purificação de MPCO, MATT e MPCT, como também que os produtos obtidos em ambas as escalas são similares, sugerindo a eficiência do escalonamento e do processo de purificação. A espectroscopia de RMN, um dos métodos recomendados para confirmar a identidade e a

integridade do glicídio, antes e após a conjugação (WHO, 2004; FRASCH, 2009), foi utilizada neste trabalho para caracterizar a modificação química realizada no polissacarídeo antes da reação de conjugação, através da identificação da presença do grupo aldeído na molécula, e também para demonstrar a eficácia da reação de conjugação em ambas as escalas de produção.

Neste trabalho de tese, a eletroforese capilar mostrou que todos os lotes de MPCT obtidos tanto na escala piloto como na escala industrial, apresentam conteúdo de MPCO livre (não conjugado) inferior a 10 %, que está abaixo do valor especificado de 20%, demonstrando que os conjugados obtidos apresentam o mesmo atributo de qualidade (HIRVE *et al.*, 2011).

Em relação ao produto final (MPCT), os resultados obtidos até aqui mostram as mesmas características referentes à qualidade - escala piloto versus escala industrial, sugerindo a eficácia do escalonamento do processo de produção da nova vacina meningocócica C conjugada. A análise dos dados referentes à etapa de purificação assinalou que o tempo de processo e a extensão da conjugação, determinada pela razão PS/Ptn, foram praticamente os mesmos em ambas as escalas e também, que o escalonamento não levou a perdas significativas de processo. Os resultados sugerem a equivalência entre os parâmetros de processo para ambas as escalas produtivas, como por exemplo, o tempo de processo e a recuperação percentual do glicídio e da proteína no glicoconjugado, indicando o sucesso do escalonamento.

Em função das modificações estabelecidas no processo de produção da nova vacina meningocócica C conjugada, um dos lotes do conjugado obtido em escala industrial, conforme descrito neste trabalho, foi submetido a um novo estudo clínico de Fase I. Os resultados demonstraram que a vacina apresentou um perfil de segurança aceitável, com eventos adversos na sua maioria de leve intensidade, ocorridos nas primeiras 24 a 48 horas após a vacinação, de resolução espontânea e ausência de eventos adversos graves. Além disso, foi possível observar que a vacina desenvolvida em Bio-Manguinhos mostrou similaridade com a vacina comercial utilizada como comparador (Neisvac-C[®]) em relação à

resposta de anticorpos bactericidas contra o meningococo, embora com maior resposta ao componente tetânico. Assim, dando continuidade ao processo de desenvolvimento da vacina, a metodologia descrita neste estudo será empregada para a obtenção dos lotes industriais para a realização dos estudos clínicos de Fase II/III, com um número maior de voluntários na faixa etária entre lactentes e 19 anos.

5.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE TÉRMICA DOS LOTES DE MPCT OBTIDOS NA ESCALA INDUSTRIAL

Sabe-se que o principal fator ambiental capaz de impactar significativamente a atividade e as características de todas as vacinas ao longo do tempo é a temperatura (WHO, 2006). Mesmo as vacinas conjugadas sendo consideradas relativamente mais estáveis em comparação com os demais tipos de vacinas, tendem a sofrer degradação por hidrólise da cadeia polissacarídica e dissociação da ligação entre o polissacarídeo e a proteína carreadora (LEE *et al.*, 2007). Além disso, o aumento da temperatura pode causar instabilidades físicas, tais como a alteração da estrutura terciária e a agregação da proteína. Sendo assim, quando submetidas a condições capazes de afetar a estabilidade da molécula conjugada, pode haver diminuição da potência da vacina devido à redução da quantidade, acessibilidade e solubilidade do glicídio e da proteína carreadora, interferindo conseqüentemente, na sua eficácia (HO *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 2014). As alterações citadas podem ser detectadas quando são realizados estudos sob estresse térmico (CHEN e KRISTENSEN, 2009; HASIJA *et al.*, 2013), a partir da utilização de métodos físico-químicos de análise amplamente utilizados no controle de qualidade destas vacinas (HO *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 2014).

5.5.1 Avaliação do pH, teor de PS e Ptn

Apesar da utilização de solução salina tamponada como solvente do MPCT, verificou-se a possível influência da incubação em diferentes temperaturas no pH das amostras. A manutenção do pH de uma vacina conjugada é importante, uma vez que alterações nesse parâmetro podem desencadear a despolimerização das cadeias glicídicas. A diminuição do pH pode ocorrer, por exemplo, em consequência do processo de desacetilação (GAO *et al.*,

2014). Os resultados analíticos obtidos mostraram que, além do pH, o teor de polissacarídeo e a concentração de proteína das amostras não apresentaram variação expressiva após o tempo de armazenamento nas temperaturas utilizadas neste estudo (Tabela 15), sugerindo a inexistência de alteração significativa na molécula conjugada.

Tabela 15: Valores médios de pH, concentração de PS e Ptn obtidos para todos os lotes de conjugado mantidos nas diferentes temperaturas de incubação.

Parâmetro	Temperatura	MPCT		
		Lote #1	Lote #2	Lote #3
pH		6,98 ± 0,04	6,96 ± 0,04	6,95 ± 0,03
PS (mg mL ⁻¹)	4°C	1,00 ± 0,03	1,22 ± 0,01	1,32 ± 0,02
Ptn (mg mL ⁻¹)		1,92 ± 0,01	2,07 ± 0,05	2,49 ± 0,04
pH		6,90 ± 0,04	6,86 ± 0,02	6,95 ± 0,05
PS (mg mL ⁻¹)	37°C	0,98 ± 0,01	1,25 ± 0,05	1,19 ± 0,17
Ptn (mg mL ⁻¹)		2,07 ± 0,06	2,39 ± 0,05	2,73 ± 0,14
pH		6,97 ± 0,09	6,92 ± 0,06	6,74 ± 0,06
PS (mg mL ⁻¹)	55°C	0,94 ± 0,02	1,22 ± 0,04	1,26 ± 0,02
Ptn (mg mL ⁻¹)		2,18 ± 0,11	2,34 ± 0,10	3,05 ± 0,03

5.5.2 Espectroscopia de fluorescência e de dicroísmo circular

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica utilizada para detectar a estabilidade conformacional de moléculas proteicas (HASIJA *et al.*, 2013) e tem sido empregada para caracterizar o toxóide tetânico conjugado devido às características espectrais de cadeias laterais dos seus aminoácidos aromáticos (HO *et al.*, 2002; LOCKYER *et al.*, 2015). Utilizando o comprimento de onda de excitação de 280 nm ($\lambda_{ex} = 280\text{nm}$) é possível obter o espectro de emissão característico de maior exposição ao solvente por parte da cadeia lateral do triptofano (Trp) e, em menor extensão, da tirosina (Tyr). Normalmente o Trp

encontra-se localizado no interior da estrutura nativa da proteína, enquanto no estado parcialmente ou totalmente desnaturado da proteína, o aminoácido fica exposto ao solvente. Neste sentido, as mudanças na conformação de uma proteína resultante da exposição da cadeia lateral de Trp ao solvente podem ser monitoradas pelo deslocamento do comprimento de onda de emissão de fluorescência para o vermelho (“red-shift”), ou seja, para comprimentos de ondas maiores, em função da desnaturação da proteína e exposição das cadeias laterais ao solvente ou pelo deslocamento do comprimento de onda de emissão de fluorescência para o azul (“blue-shift”), ou seja, para comprimentos de onda menores, em função da internalização desse resíduo. Em um ambiente hidrofóbico (no interior da proteína) o Trp tem alta intensidade de fluorescência. No entanto, quando em um ambiente hidrofílico (exposto ao solvente), a intensidade de fluorescência diminui (LOCKYER *et al.*, 2015; LAKOWICZ, 2006).

Observou-se que a emissão de fluorescência dos conjugados estocados a 4 °C e 37 °C foi similar, com fluorescência máxima (F_{max}) em 324 nm, característico do estado nativo da proteína. Os conjugados estocados a 55 °C mostraram redução da intensidade de fluorescência e deslocamento de F_{max} para 328 nm (“red-shift”), o que sugere uma desnaturação parcial da proteína carreadora. Um estudo anterior referente à avaliação da estabilidade térmica de uma vacina meningocócica conjugada onde o oligossacarídeo C encontra-se desacetilado mostrou que ocorreu a desnaturação da proteína carreadora (toxóide tetânico) quando a temperatura de incubação foi igual ou superior a 37 °C (HO *et al.*, 2002). Considerando-se que não foi observada a desnaturação da proteína carreadora do MPCT na temperatura de 37 °C há um indicativo de que a molécula conjugada, objeto de estudo desta tese, apresenta maior estabilidade térmica do que aquela avaliada pelos referidos autores.

Sabe-se que a reação química entre o formaldeído e a toxina tetânica, que ocorre no processo de destoxificação da molécula, não é capaz de provocar alterações conformacionais significativas (ROBINSON *et al.*, 1975; METZ *et al.*, 2013). Da mesma forma, alguns autores relatam que há pouca diferença em relação ao valor de F_{max} observado para o toxóide tetânico antes e depois da conjugação química com o

polissacarídeo, o que é um indicativo de que a reação provoca pouca alteração conformacional na molécula proteica. Esta estabilidade estrutural tem sido atribuída à existência de ligações cruzadas formadas durante o processo de destoxificação da proteína (HO *et al.*, 2002 LOCKYER *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos para a análise por espectroscopia de fluorescência podem ser visualizados no gráfico que relaciona a área espectral dos conjugados e a temperatura na qual foi armazenado (Figura 42). Observa-se a similaridade dos valores de área espectral obtidos para os conjugados estocados nas temperaturas de 4 °C e 37 °C e a redução da área espectral para os conjugados estocados a 55 °C.

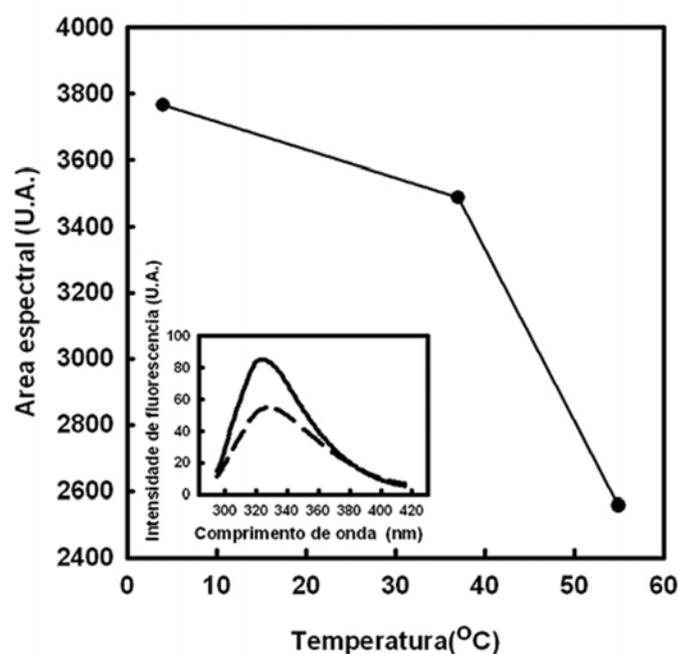


Figura 42: Área espectral de um lote representativo de MPCT estocado nas temperaturas de 4 °C, 37 °C e 55 °C. Observa-se a menor área espectral para a maior temperatura de incubação. No quadro menor observa-se o espectro de emissão de fluorescência do MPCT estocado na temperatura de 4°C (linha sólida) e 55°C (linha tracejada). São mostrados o deslocamento de Fmax (324 nm para 328 nm) e a redução da intensidade de fluorescência para o conjugado incubado a 55°C. As amostras foram excitadas a 280 nm e a emissão de fluorescência foi adquirida entre 295 e 415 nm a 25 °C.

A espectroscopia de dicroísmo circular tem sido utilizada para a obtenção de informações referentes a alterações na estrutura secundária de proteínas conjugadas em função da exposição a temperaturas elevadas (ROBINSON *et al.*, 1975; HO *et al.*, 2001, HO *et al.*, 2002; HASIJA *et al.*, 2013). O espectro de dicroísmo circular na região do ultravioleta (UV) distante (“Far UV”) mostrou um pico de elipticidade máxima em 220 nm para todos os conjugados incubados nas temperaturas do estudo. Além disso, observou-se uma tendência de diminuição do conteúdo de estrutura secundária da molécula estocada a 55 °C, em comparação com a temperatura de 4 °C identificada pela redução da elipticidade negativa nesta temperatura (Figura 43).

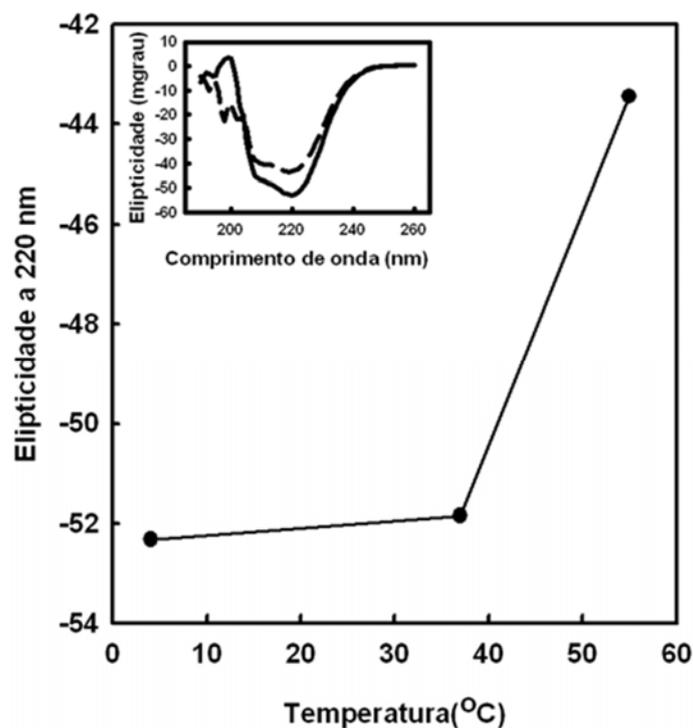


Figura 43: Elipticidade a 220 nm de um lote representativo de MPCT estocado nas temperaturas de 4 °C, 37 °C e 55 °C. No quadro menor observa-se o espectro de dicroísmo circular na região de UV distante referente à temperatura de 4 °C (linha sólida) e 55 °C (linha tracejada). A diminuição do conteúdo de estrutura secundária na temperatura mais elevada é indicada pela diminuição da elipticidade negativa. Os espectros foram obtidos na temperatura de 20 ± 1 °C.

O resultado obtido neste trabalho foi diferente daquele obtido por Ho *et al.* (2002), que não observaram alteração da estrutura secundária do toxóide tetânico presente no concentrado vacinal mantido em solução de cloreto de sódio 150 mM, pH 5 – 6, quando submetido a diferentes temperaturas de estocagem. Em um estudo anterior onde foi avaliada a estabilidade estrutural da proteína CRM 197 conjugada ao oligossacarídeo meningocócico C após ser submetida a diferentes temperaturas de estocagem, foi observado resultado semelhante, ou seja, no concentrado vacinal mantido em solução de cloreto de sódio a 0,9 % (p/v), em pH aproximadamente igual a 5,6, não foi observada alteração da estrutura secundária da proteína carreadora. No entanto, o concentrado vacinal contendo a CRM 197 conjugada ao oligossacarídeo meningocócico C mantido em solução tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,2, mostrou alteração significativa da estrutura secundária da proteína carreadora (HO *et al.*, 2001). A manutenção da conformação do toxóide tetânico utilizado como proteína carreadora em vacinas conjugadas é considerada um indicativo da qualidade dessas vacinas, embora não haja evidências de que a manutenção da conformação seja um requisito para a sua imunogenicidade e capacidade de conferir proteção (LOCKYER *et al.*, 2015). O toxóide tetânico mantém alto grau de homologia com relação às estruturas secundária e terciária, quando comparado com a toxina tetânica (COSTANTINO *et al.*, 1996). Além disso, é uma proteína que apresenta elevada estabilidade térmica, sendo capaz de reter tanto a estrutura conformacional, quanto a capacidade de ligação a anticorpos policlonais mesmo após ser mantida na temperatura de 37 °C por até dois meses (HO *et al.*, 2002). Esta reconhecida estabilidade estrutural da proteína poderia estar relacionada com o fato de não haver alteração estrutural da molécula de MPCT quando mantida na temperatura de 37 °C.

5.5.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio - ¹H-RMN 1-D

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio é uma metodologia normalmente utilizada para a caracterização e avaliação da consistência de produção de vacinas conjugadas, de acordo com as recomendações da OMS (WHO, 2004). A técnica foi utilizada para obter informações sobre eventuais alterações estruturais dos conjugados incubados nas diferentes temperaturas. O espectro de ¹H-RMN 1-D do MPCT mostra picos

com deslocamentos químicos de 1,5 a 5,4 ppm, referentes à porção glicídica da molécula conjugada, além de picos largos nas regiões de 0,3 – 1,6 ppm e 6,5 – 7,5 ppm, referentes às regiões de grupamentos alifáticos e aromáticos da proteína carreadora, respectivamente (LEMERCINIER e JONES, 1996; SILVEIRA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2013; JESSOUORUN, *et al.*, 2015; BASTOS *et al.*, 2015). Conforme descrito por outros autores, tais picos são mais largos devido à menor mobilidade da molécula proteica, em comparação com a porção glicídica (HO *et al.*, 2001; HO *et al.*, 2002).

Observou-se, nos espectros dos conjugados estocados principalmente na temperatura de 55 °C, o aumento da intensidade dos picos localizados nas regiões de grupamentos alifáticos e aromáticos, quando comparados com o espectro dos conjugados estocados na temperatura de 4 °C. O resultado sugere perda parcial da estrutura terciária da proteína em função da exposição à temperatura elevada (Figura 44).

Este resultado mostrou-se similar ao descrito anteriormente por Ho *et al.* (2001 e 2002), que observaram o aumento da intensidade relativa dos picos com deslocamento químico em 0,88 ppm e também aqueles entre 6,6 e 7,4 ppm no espectro de conjugados submetidos à temperatura de 55 °C. Os autores associaram o fenômeno observado ao aumento da mobilidade dos grupamentos alifáticos e aromáticos da proteína carreadora, em função da perda parcial da sua estrutura terciária (HO *et al.*, 2001; HO *et al.*, 2002).

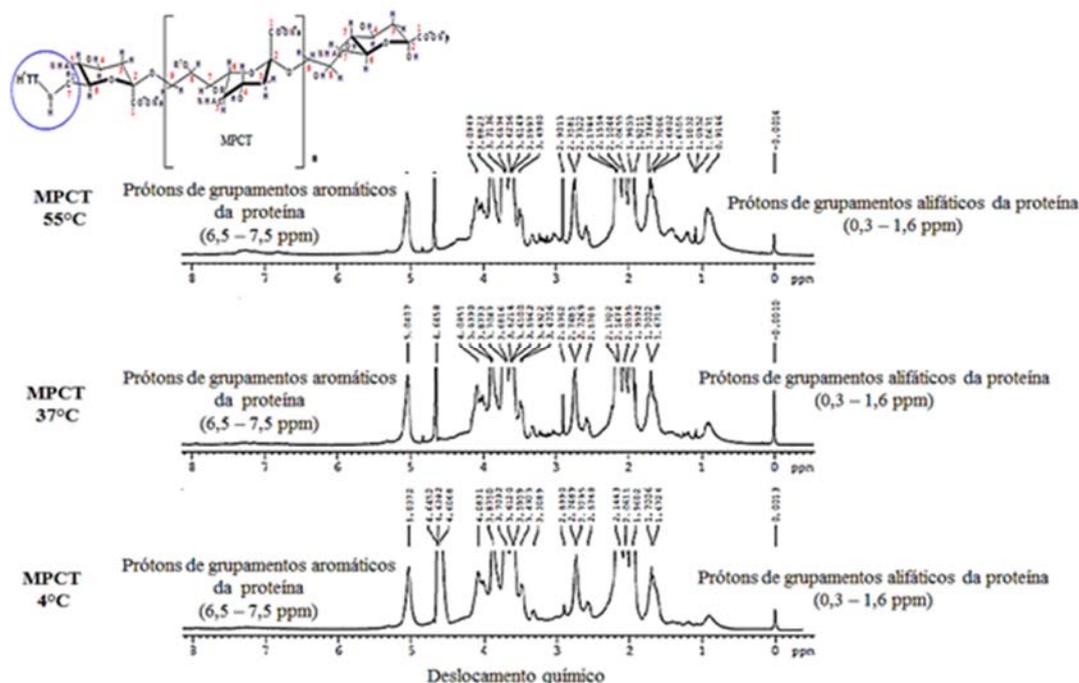


Figura 44: Espectros de ^1H RNM (400 MHz) de um lote representativo de MPCT estocado nas temperaturas de 4 °C, 37 °C e 55 °C. Observa-se o aumento da intensidade dos sinais nas regiões dos prótons de grupamentos alifáticos (entre 0,3 e 1,6 ppm) e aromáticos (entre 6,5 e 7,5 ppm) da proteína com o aumento da temperatura de incubação.

5.5.4 Cromatografia de exclusão e filtração molecular - SEC

A cromatografia de exclusão e filtração molecular foi utilizada para monitorar o volume molecular dos conjugados após incubação nas três temperaturas estudadas. Diferentemente das proteínas globulares, as moléculas conjugadas apresentam cadeias oligossacarídicas ligadas às moléculas proteicas sob a forma de ramificações (HO *et al.*, 2002; GAO *et al.*, 2014). Alguns autores propõem que a estrutura do toxóide tetânico apresente uma característica alongada, o que proporcionaria uma elevada área superficial disponível para a conjugação com os glicídios, em comparação com outras proteínas com características globulares (ABDELHAMEED *et al.*, 2012). Sendo assim, considerando a técnica de cromatografia de exclusão e filtração molecular, o volume de eluição das moléculas conjugadas mostra-se dependente não só do tamanho hidrodinâmico e da massa molecular,

como também de possíveis interações com cargas opostas presentes na matriz cromatográfica (GAO *et al.*, 2014).

Observou-se que as moléculas conjugadas apresentaram perfil cromatográfico de pico único com volume de eluição similar, independente da temperatura, além do alargamento da base do pico cromatográfico das amostras mantidas na temperatura de 55 °C (Figura 45). Tal comportamento foi também observado por outros autores que avaliaram o perfil cromatográfico de moléculas conjugadas sob a influência de diferentes temperaturas de estocagem (HO *et al.*, 2002). Os resultados sugerem que o aumento da temperatura não foi suficiente para alterar de forma significativa o tamanho hidrodinâmico da molécula de MPCT, de modo que os valores de K_{av} foram obtidos dentro da faixa estabelecida (entre 0,2 e 0,35) (BASTOS *et al.*, 2015). De acordo com BOLGIANO *et al.* (2001), mesmo em condições ideais de estocagem o componente glicídico da molécula conjugada sofre despolimerização cuja taxa pode variar em função do tipo de conjugado e é dependente da forma como a molécula é mantida, em solução ou liofilizada (BOLGIANO *et al.*, 2001). Assim, os resultados referentes à análise cromatográfica do MPCT submetido a diferentes temperaturas de estocagem sugerem que o alargamento da base do pico do conjugado mantido na temperatura de 55 °C deva estar relacionado com a maior exposição das cadeias sacarídicas resultante da alteração estrutural da proteína carreadora em função do aumento da temperatura. A dissociação dessas cadeias, que estaria relacionada com o aumento da heterogeneidade molecular pode também ser uma explicação possível para o fenômeno observado.

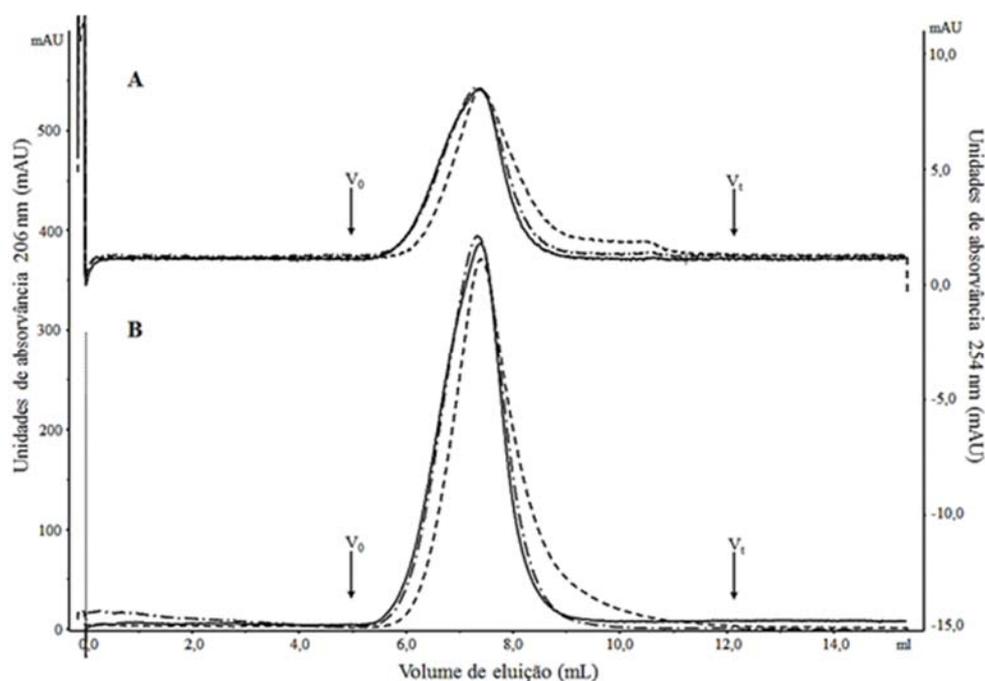


Figura 45: Perfis de eluição na coluna cromatográfica TSK G[®] 4000 PWx1 de um lote representativo do MPCT incubado nas temperaturas de 4 °C (linha sólida), 37 °C (linha com traço e ponto) e 55 °C (linha tracejada). A absorvância foi monitorada nos comprimentos de onda de 254 nm (A) e 206 nm (B).

5.5.5 Eletroforese capilar de zona - CZE

O percentual de glicídio livre nos conjugados mantidos nas temperaturas de 4 °C, 37 °C e 55 °C foi determinado através da técnica de eletroforese capilar de zona (CZE) (SOUZA *et al.*, 2013). Para os conjugados mantidos na temperatura de 4 °C, o teor de polissacarídeo livre foi 10,4 %, enquanto para as moléculas incubadas nas temperaturas de 37 °C e 55 °C, os valores foram de 21,0 % e 51,6 %, respectivamente, valores superiores ao limite especificado (20%) para o teor de sacarídeo livre no concentrado vacinal, indicando a instabilidade da molécula conjugada quando mantida em temperaturas mais elevadas. Um estudo anterior objetivando analisar a influência da temperatura de estocagem sobre a molécula de oligossacarídeo meningocócico C desacetilado conjugada ao toxóide tetânico, apresentou resultado similar. O teor de oligossacarídeo livre aumentou de 5 – 7 % para

20 %, quando as amostras foram mantidas na temperatura de 37 °C e para 70 % quando mantidas a 55 °C (HO *et al.*, 2002). Em outro estudo onde foi utilizada uma vacina conjugada combinada contra o *Haemophilus influenzae* tipo b e o meningococo C (Hib/MenC), em que ambos os polissacarídeos foram conjugados individualmente com o toxóide tetânico, os autores mostraram um pequeno aumento no teor de glicídio livre, que passou de 8 % para cerca de 11 – 12 % quando a vacina foi exposta a temperaturas elevadas (SAYDAM *et al.*, 2010). Além disso, em um estudo anterior, HO *et al.*, (2000) avaliaram a estabilidade térmica de duas vacinas onde o oligossacarídeo meningocócico C e a proteína CRM 197 foram conjugados através do método aminação reductiva, uma delas através de espaçador e a outra, pela ligação direta entre as moléculas. Os autores observaram que após serem mantidas por cinco semanas na temperatura de 55 °C, as moléculas conjugadas obtidas através de reação via espaçador entre o glicídio e a proteína apresentaram teor de oligossacarídeo livre igual a 14 %. Por outro lado, as moléculas em que o glicídio e a proteína encontravam-se ligados diretamente, sem o espaçador apresentaram teor de oligossacarídeo livre igual a 42 % (HO *et al.*, 2000). Os resultados citados sugerem que, embora de maneira geral seja observado o aumento no teor de glicídio livre quando a molécula conjugada é submetida a temperaturas elevadas, a sua estabilidade estrutural pode ser influenciada tanto pela química de conjugação como também pelo processo de obtenção (HO *et al.*, 2002).

Vale ressaltar que somente o polissacarídeo covalentemente ligado à proteína carreadora é capaz de conferir proteção contra a doença a qual a vacina se destina e que a presença de teores elevados de glicídio não conjugado pode resultar em hiporresponsividade imunológica (LEE *et al.*, 2007).

5.5.6 Ensaio imunológicos

A imunogenicidade dos conjugados submetidos a diferentes temperaturas de estocagem foi avaliada após imunização de camundongos com o objetivo de identificar o possível efeito das alterações estruturais desencadeadas pela temperatura na resposta imunológica dos animais. Observou-se que todos os lotes de MPCT induziram alto nível de anticorpos IgG,

de acordo com os resultados do ensaio de ELISA. Além disso, todos os conjugados induziram títulos de anticorpos bactericidas superiores a quatro, conforme resultados do ensaio SBA (Tabela 16), independentemente da temperatura em que foram estocados. Vale ressaltar que o ensaio bactericida é o único teste validado capaz de medir a proteção contra o meningococo C e o título de anticorpo bactericida ≥ 4 é indicativo de proteção contra a doença causada por essa bactéria, sendo o ensaio “in vitro” capaz de mensurar a capacidade dos anticorpos séricos promoverem a lise dos meningococos quando em presença de complemento humano (BORROW *et al.*, 2005; TAN *et al.*, 2010; VIPOND *et al.*, 2012). O ensaio de ELISA, por sua vez, é capaz de mensurar tanto o nível de anticorpos séricos totais como o título de algum isotipo específico, como por exemplo, IgG ou IgM (PERRET *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2014; BASH *et al.*, 2014).

A proteção contra a doença meningocócica depende não só da imunidade inata, particularmente de um sistema complemento plenamente funcional, como também da resposta imunológica humoral. De acordo com os resultados obtidos através da análise por CZE, foi observado que o teor de polissacarídeo livre na molécula conjugada submetida à temperatura de 55 °C foi de 51,6 %. Tal fato, no entanto, não resultou em diferença significativa nos títulos de IgG, quando comparados com os títulos obtidos a partir da imunização com os conjugados mantidos a 4 °C ($p = 0,1239$). Da mesma forma, não foi observada diferença significativa entre os títulos de IgG obtidos a partir da imunização com os conjugados estocados a 37 °C em relação àqueles estocados na temperatura controle (4 °C) ($p = 0,1082$). Com relação ao título de anticorpos bactericidas, também não houve diferença significativa quando comparados os títulos obtidos para os soros de animais imunizados com lotes de MPCT mantidos nas temperaturas de 4 °C e 37 °C ($p = 0,0646$) e nas temperaturas de 4 °C e 55 °C ($p = 0,9235$), conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16: Títulos de IgG total e anticorpos bactericidas (SBA) em soro de animais imunizados com os lotes de MPCT. Os níveis de anticorpos séricos obtidos após a imunização dos camundongos com os lotes de conjugados estocados na temperatura controle foram comparados com os títulos obtidos após a imunização com os lotes mantidos nas temperaturas elevadas (37 °C e 55 °C).

Temperatura	4 °C		37 °C		55 °C		
	IgG (Ln U mL ⁻¹)	SBA (MG) ^A	IgG (Ln U mL ⁻¹)	SBA (MG) ^A	IgG (Ln U mL ⁻¹)	SBA (MG) ^A	
Ensaio Imunológico							
Lotes de MPCT	#1	6,95 ± 0,13	5787,6	6,49 ± 0,06	5790,3	6,06 ± 0,13	3249,1
	#2	7,03 ± 0,04	5787,6	6,28 ± 0,10	5790,3	6,83 ± 0,35	8685,0
	#3	5,92 ± 0,14	1447,1	5,94 ± 0,09	5790,3	7,41 ± 0,13	2895,3

^AMG (média geométrica); A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância de 0,05. Não foi observada diferença significativa nos títulos de IgG induzidos pela imunização com os lotes de MPCT submetidos à estocagem na temperatura de 4 °C quando comparados com a temperatura de 37 °C (p = 0,1082) ou 55 °C (p = 0,1239). Com relação ao título de anticorpos bactericidas, também não houve diferença significativa quando comparados os títulos obtidos para os soros de animais imunizados com lotes de MPCT mantidos nas temperaturas de 4 °C e 37 °C (p = 0,0646). Da mesma forma, não foi observada diferença significativa para a análise comparativa entre os títulos obtidos para as temperaturas de 4 °C e 55 °C (p = 0,9235).

Tais constatações podem estar relacionadas com a natureza altamente imunogênica do toxóide tetânico que é capaz de induzir uma forte resposta imunológica primária, além do fato de ser uma proteína com considerável massa molecular (150 kDa), que possibilita a ligação de inúmeras cadeias oligossacarídicas por mol de molécula proteica (HO *et al.*, 2001). Alguns autores, estudando a acessibilidade de anticorpos monoclonais (AcMns) aos epitopos de moléculas de TT conjugadas, em que foram utilizados AcMns capazes de reconhecer epitopos lineares e também os epitopos conformacionais tanto da toxina tetânica como da anatoxina, verificaram que a TT conjugada apresenta capacidade de ligação aos AcMns inferior à da proteína não conjugada. Por outro lado, os AcMns capazes de reconhecer epitopos lineares apresentam maior afinidade de ligação por moléculas de TT

conjugadas com maior número de cadeias glicídicas, ou seja, aquelas que apresentam alto teor glicídico (LOCKYER *et al.*, 2015). Este comportamento foi observado também por Rana *et al.* (2015), que sugeriram a relação entre o tamanho da cadeia polissacarídica e a imunogenicidade dos conjugados. Esses autores mostraram que moléculas conjugadas em que as cadeias glicídicas apresentam menor tamanho são capazes de induzir títulos de anticorpos comparáveis ou até superiores àquelas constituídas por cadeias glicídicas maiores, o que seria um indicativo de que cadeias glicídicas de menor tamanho molecular são capazes de induzir resposta T-dependente de melhor qualidade, quando comparada com as de maior tamanho. Segundo os autores, tal fato estaria associado à taxa de glicosilação da molécula, ou seja, moléculas conjugadas constituídas por cadeias glicídicas menores são caracterizadas por uma maior taxa de glicosilação, em base molar. No entanto, a cadeia glicídica deve apresentar tamanho molecular que preserve os epitopos conformacionais da molécula nativa, de modo a induzir a resposta desejada (RANA *et al.*, 2015).

Neste trabalho de tese não foi observada diferença nos títulos de IgG e de anticorpos bactericidas em soros de animais imunizados com lotes de MPCT que foram estocados na temperatura de 55° C, cujo teor de glicídio livre estava em torno de 50 %. Desta forma, há um indicativo de que exista quantidade suficiente de polissacarídeo conjugado, capaz de induzir a resposta imunológica no modelo animal utilizado, conforme também foi observado por outros autores (HO *et al.*, 2002).

Sabe-se que as vacinas polissacarídicas induzem a produção de quantidades praticamente indetectáveis de IgG, quando se utiliza modelo murino, enquanto as vacinas conjugadas são muito imunogênicas, sendo capazes de induzir a produção não só de IgG, como também de IgM, após ser administrada uma única dose, muito embora a resposta em termos de IgG seja comparativamente superior à de IgM (HO *et al.*, 2000). Em um estudo realizado com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica de vacinas conjugadas contra o meningococo C (MenC-TT) e contra o Hib (Hib-TT), onde os respectivos oligossacarídeos encontravam-se conjugados ao toxóide tetânico, foi observada a redução dos títulos de IgG e IgM no soro de animais imunizados com a vacina MenC-TT que fora previamente submetida à estocagem em temperatura elevada (56°C), no entanto, o resultado não mostrou

significância estatística. Por outro lado, os autores observaram o aumento na resposta contra o polissacarídeo de Hib quando a vacina Hib-TT foi submetida à temperatura elevada de estocagem utilizada no estudo (56°C) que, novamente, não foi estatisticamente significativo (HO *et al.*, 2002). Além disso, outro estudo de estabilidade térmica envolvendo uma vacina onde o oligossacarídeo meningocócico C foi conjugado à CRM 197 através do método de aminação reductiva, mostrou redução não significativa na resposta primária (título de IgG) de camundongos imunizados com o IFA previamente exposto à temperatura elevada (55 °C). No entanto, foi observada redução significativa no título de IgM, quando comparado com a resposta induzida após a imunização dos animais com o IFA mantido na temperatura de controle do estudo (4 °C) (HO *et al.*, 2000). No caso do estudo de estabilidade térmica da vacina combinada contra Hib e meningococo C, em que a proteína carreadora é o TT, o aumento da temperatura de estocagem para 37 °C ou para 56 °C provocou redução não significativa dos títulos de IgG contra o meningococo C em 31 % e 19 %, respectivamente (SAYDAM *et al.*, 2010). A redução da resposta imunológica dos animais foi relacionada com o aumento do teor de glicídio livre nas amostras avaliadas e a ausência de significância estatística foi atribuída à variabilidade intrínseca da resposta imunológica dos animais, fato igualmente relatado por outros autores (RANA *et al.*, 2015).

Entretanto, FRASCH *et al.* (2015) estudaram a interferência da adição de quantidades entre 100 e 400% do polissacarídeo meningocócico grupo A ou da TT não conjugados à formulação vacinal contendo um conjugado, obtido a partir da mesma metodologia utilizada para a produção do MPCT. Os autores verificaram pouca diferença nos títulos de anticorpos bactericidas no soro dos camundongos imunizados, em comparação com os títulos obtidos com o antígeno nas concentrações de 0,1 e 1µg/dose. Esses resultados sugerem que o modelo murino não é sensível para detectar uma redução significativa da resposta imunológica contra o polissacarídeo, mesmo em presença de quantidade excessiva dos componentes não conjugados.

As alterações físico-químicas observadas na avaliação da estabilidade térmica do MPCT podem estar relacionadas com mudanças conformacionais da proteína carreadora que não foram capazes de afetar os epitopos reconhecidos pelas células T, provavelmente por serem

dependentes da sequência de aminoácidos (BOLGIANO *et al.*, 2001). No caso do MPCT, a proteína conjugada mostrou-se estruturalmente estável quando mantida em temperaturas até 37 °C. A temperatura de 55 °C causou alterações conformacionais, como a redução do conteúdo de estrutura secundária, indicada pelo deslocamento para o vermelho (“red shift”) e a diminuição de Fmax, sugerindo o aumento da mobilidade das cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos e a maior exposição ao solvente, em função da exposição à temperatura elevada. Os dados obtidos pelas técnicas de espectroscopia de fluorescência e de dicroísmo circular mostraram alterações conformacionais da proteína carreadora quando mantida na temperatura de 55 °C, podendo ser utilizados como parâmetros de estabilidade da molécula conjugada.

De maneira geral, as vacinas conjugadas contra o meningococo C apresentam estabilidade satisfatória em uma ampla faixa de temperatura. A avaliação da exposição dessas vacinas a diferentes temperaturas pelo curto período de cinco semanas tem demonstrado que a estabilidade estrutural, tanto do polissacarídeo como da proteína carreadora, é variável entre as vacinas estudadas (LEE *et al.*, 2007). Da mesma forma, o estudo de estabilidade em tempo real de uma vacina meningocócica conjugada disponível comercialmente (Neisvac-C[®]) demonstrou robustez na estabilidade térmica tanto quando mantida sob refrigeração por 42 meses, como quando mantida à temperatura ambiente, por 9 meses. Geralmente, o prazo de validade dessas vacinas é de dois anos, se mantidas em ambiente refrigerado (LEE *et al.*, 2007; CHEN e KRISTENSEN, 2009).

O estudo de termoestabilidade da nova vacina meningocócica C conjugada mostrou que, de maneira geral, os métodos físico-químicos por si não podem ser utilizados para prever a sua atividade biológica sem que haja uma intensa validação confrontando os dados imunológicos. Entretanto, a análise físico-química proporciona um meio sensível para a detecção de alterações induzidas pela exposição a condições ambientais adversas que podem, potencialmente, influenciar as propriedades imunológicas do conjugado.

5.6 ANÁLISE COMPARATIVA DE CUSTOS DE PRODUÇÃO

O principal desafio de um processo produtivo é utilizar os recursos disponíveis de modo a atender à demanda com custo mínimo. Por definição, economias de escala são reduções no custo médio, isto é, a diminuição do custo por unidade produzida, geradas pelo aumento da escala de produção, sendo o cálculo deste custo total médio baseado na soma dos custos totais fixos e dos custos totais variáveis para certa quantidade de produção (ESBERARD *et al.*, 2009). O custo médio para a comercialização de produtos biotecnológicos é alto e isso tem exigido a utilização da análise econômica, por parte das empresas, como uma ferramenta durante o desenvolvimento do processo, capaz de auxiliar na tomada de decisões que privilegiem a execução de processos otimizados, robustos e com custos econômicos reduzidos (RATHORE *et al.*, 2006; ERICKSON *et al.*, 2012). Neste sentido, para fins gerenciais, o importante é que cada empresa tenha um entendimento profundo da formação do custo de todos os recursos e sua relação com as atividades e/ou produtos e serviços finais (PADOVEZE, 2006).

Para a análise de custos dos processos de obtenção dos produtos intermediários (MPCO e MATT), bem como o conjugado final (MPCT), optou-se por replicar os métodos e modelos adotados por Bio-Manguinhos onde são mensurados os custos com insumos e mão-de-obra em cada processo industrial. Desta forma, utilizou-se o método de custeio variável, que considera somente os custos variáveis referentes ao processo, ficando os fixos separados e considerados como despesas do período (MARTINS, 2003; CARARETO *et al.*, 2006; ABBAS *et al.*, 2012).

A análise comparativa dos custos para a produção de um grama dos produtos intermediários (MPCO e MATT) e do conjugado final (MPCT) é apresentada em unidades percentuais na Figura 43, assumindo a escala piloto como 100%.

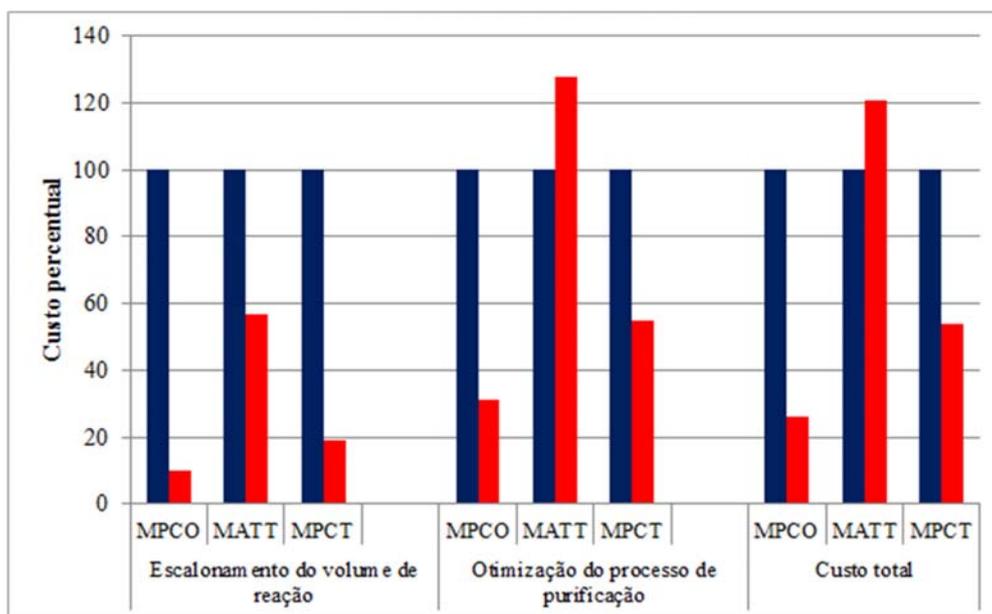


Figura 46: Análise comparativa de custos de obtenção dos produtos intermediários (MPCO e MATT) e do conjugado final (MPCT) nas escalas piloto (azul) e industrial (vermelho) apresentada em unidades percentuais considerando os dados da escala piloto como 100%. As análises foram realizadas levando em conta os custos com pessoal (custo homem-hora) para a avaliação do escalonamento dos volumes reacionais e os custos com os insumos para a avaliação da otimização dos processos de purificação. A avaliação do custo total considerou o somatório dos valores obtidos nas análises anteriores.

A Figura 46 mostra que a partir da análise comparativa dos custos do processo, sob o ponto de vista do escalonamento dos volumes reacionais para a obtenção de MPCO, MATT e MPCT, considerando os valores de gastos com pessoal, houve redução de custos para a obtenção de um grama de cada produto na escala industrial. Sob o ponto de vista da otimização dos processos de purificação por membranas, no entanto, a redução de custo foi verificada somente para a obtenção do MPCO e MPCT.

Foi possível observar o aumento do custo de obtenção da MATT na escala industrial, provavelmente, em função da operacionalidade do processo de filtração tangencial nessa escala que foi executado com ambos os sistemas: Centrassette - para as etapas de concentração inicial e diafiltração e Centramate - para a etapa de concentração final, diferentemente do processo na escala piloto, realizado apenas no sistema Centramate. Com

isso, o custo para a produção de massa 2,5 vezes maior de MATT foi cerca de 3 vezes superior na escala industrial, em relação à escala piloto. A avaliação de custo total confirma que houve a redução dos custos de produção de MPCO e MPCT na escala industrial. O aumento do custo para a obtenção da MATT nesta escala mostrou a grande contribuição dos gastos com insumos para a obtenção do produto já que, a redução do custo homem-hora não foi suficiente para promover diminuição global dos custos de produção da proteína ativada.

Traduzindo em valores, a análise feita com base na relação entre a produtividade e os custos com pessoal (Figura 47) mostrou que o aumento de cinco vezes na escala da reação de obtenção de MPCO e MPCT resultou em 90 % e 81 % de redução dos custos, respectivamente, enquanto que o aumento de 2,5 vezes no volume da reação de obtenção da MATT levou a uma redução de 42 % nos custos de produção.

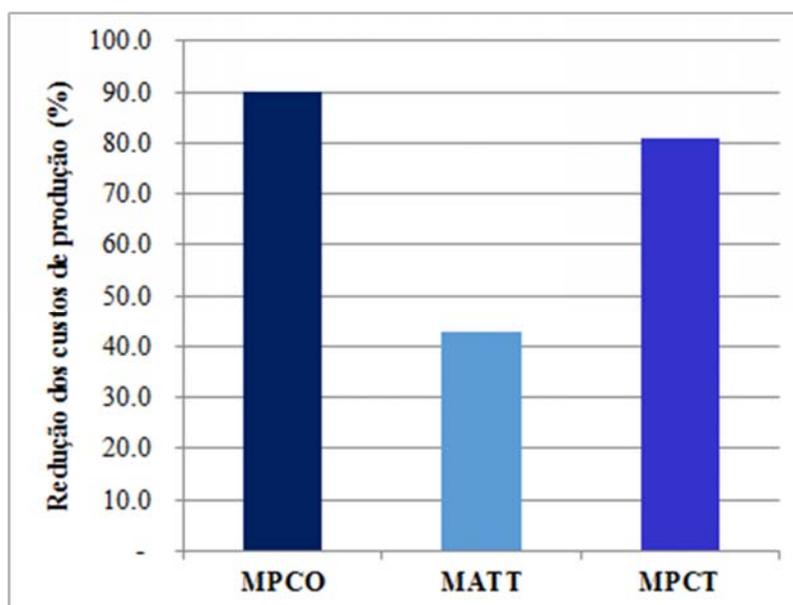


Figura 47: Redução percentual dos custos de produção de MPCO, MATT e MPCT na escala industrial, em relação à escala piloto, considerando gastos com pessoal para o aumento dos volumes reacionais.

Considerando a otimização da etapa de purificação, por TFF, de MPCO e MPCT, a análise de custo mostrou uma redução de 69 % e 45 % nos gastos, respectivamente, enquanto que a etapa de purificação da MATT em escala industrial levou a um aumento de 28 % dos custos (Figura 48).

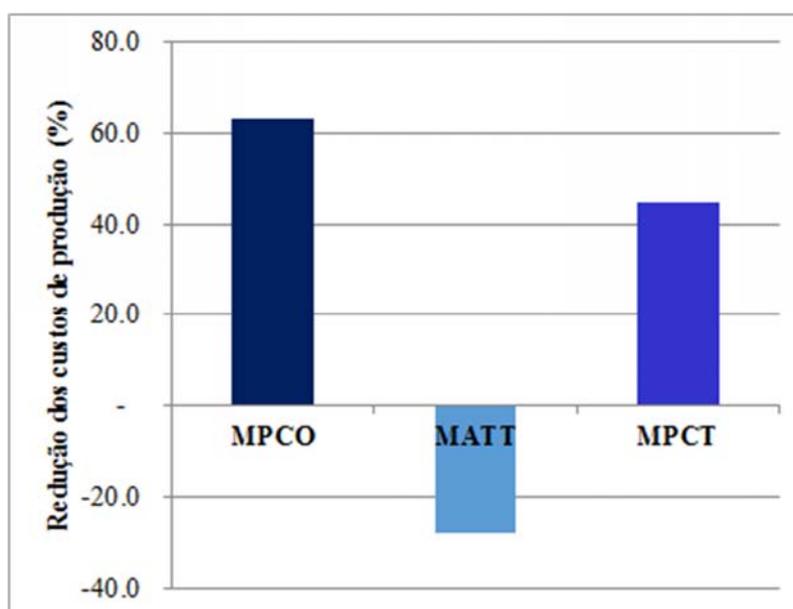


Figura 48: Redução percentual dos custos de produção de MPCO, MATT e MPCT na escala industrial, em relação à escala piloto, considerando gastos com insumos para a otimização do processo de TFF.

Os custos com pessoal e com insumos para a produção do MPCO em escala industrial resultou numa diminuição de 74 % nos custos, enquanto que a obtenção do MPCT na mesma escala foi 46 % menos custosa. Usando a mesma abordagem, verificou-se que o escalonamento da produção da MATT resultou em um aumento de 23 % nos custos (Figura 49).

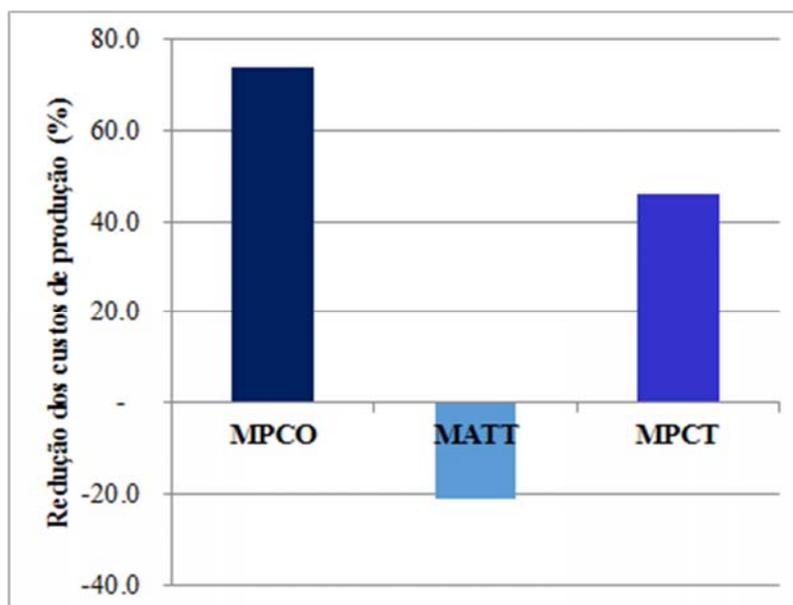


Figura 49: Redução percentual dos custos de produção de MPCO, MATT e MPCT na escala industrial, em relação à escala piloto, considerando gastos com pessoal e com insumos.

O melhoramento do processo de obtenção da MATT na escala industrial, com a utilização de três cassetes de filtração tangencial do sistema Centramate resultou na redução de 55 % nos custos de produção, quando o parâmetro avaliado foi o gasto com pessoal (custo homem-hora) e de 6 % quando o parâmetro avaliado foi o custo dos insumos necessários para o processo de purificação por filtração tangencial. A análise global mostrou redução de 10 % nos custos de produção da proteína ativada na escala industrial após os melhoramentos introduzidos (Figura 50).

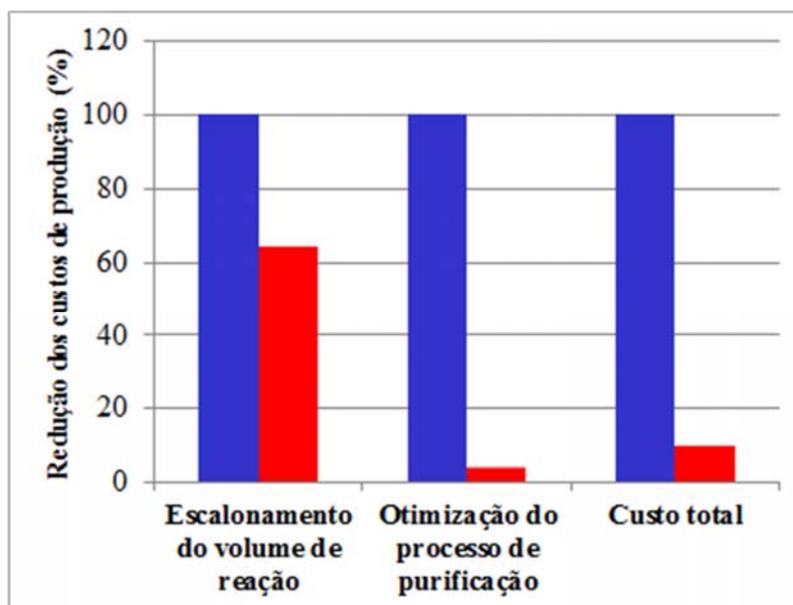


Figura 50: Análise comparativa da redução percentual dos custos de obtenção de MATT nas escalas piloto e industrial após a otimização do processo de purificação por filtração tangencial. Os dados são apresentados em unidades percentuais fixando os dados da escala piloto como 100%. As análises foram realizadas considerando os gastos com pessoal (custo homem-hora) para a avaliação do escalonamento dos volumes reacionais. Os custos com os insumos foram utilizados na avaliação da otimização dos processos de purificação. Para a análise do custo total o processo, considerou-se o somatório dos valores anteriores.

De maneira geral, a análise de custos não é vista como prioridade durante o desenvolvimento de processos produtivos, sendo as atenções voltadas principalmente para a obtenção de produtos com elevada qualidade, em conformidade com os requerimentos de agências regulatórias e cuja disponibilidade para o uso clínico seja o mais breve possível. No entanto, na medida em que se observa o amadurecimento das indústrias, no que diz respeito ao aumento de sua carteira de produtos comercializados e também em função da competição acirrada pela conquista do mercado, torna-se maior a percepção de que as escolhas feitas durante o desenvolvimento do processo afetam diretamente os custos finais,

além da importância da implementação de um modelo de custos bem estruturado (SINCLAIR e MONGE, 2010 C).

Sabe-se que os custos atribuídos ao processo de produção, na indústria farmacêutica, são uma parte importante das despesas totais da empresa (BASU *et al.*, 2008). Neste sentido, atualmente há uma percepção clara que, para maximizar a oportunidade de desenvolver processos robustos de baixo custo é necessário considerar a importância, não só da caracterização (química; físico-química e / ou imunológica) e dos estudos de degradação forçada dos produtos, como também da avaliação criteriosa dos custos do processo produtivo (SINCLAIR e MONGE, 2010 B). No entanto, as empresas não disponibilizam, de forma discriminada, os custos que compõem os preços de seus produtos (BASU *et al.*, 2008; SINCLAIR e MONGE, 2010 A).

Basu *et al.* (2008) realizaram uma análise comparativa entre os fatores que contribuem tanto para as despesas, como para a receita de empresas do ramo farmacêutico. Os dados foram coletados a partir da consulta aos relatórios anuais publicados por três categorias de indústrias farmacêuticas: as indústrias líderes de mercado; as indústrias de medicamentos genéricos e as indústrias biotecnológicas. Embora os autores ressaltem que a falta de informação no que diz respeito à exposição dos dados financeiros de forma discriminada por produto, impossibilite a associação entre o custo observado e o respectivo produto ou processo, suas análises mostraram que os custos com o processo produtivo consomem, aproximadamente, 50% da receita no caso da indústria de genéricos, e 27%, no caso das indústrias líderes. Com relação às indústrias biotecnológicas, entretanto, os custos de processo foram inferiores, correspondendo a cerca de 10% da receita. Por outro lado, dentre as três categorias de indústria analisadas, os custos com pesquisa e desenvolvimento (P&D) no caso das indústrias biotecnológicas foram os mais elevados. Os autores ressaltam que dentre os fatores que contribuem diretamente para o elevado custo de produção das indústrias farmacêuticas, está o fato de serem altamente regulamentadas pelas agências regulatórias devido ao impacto direto exercido por seus produtos na saúde do consumidor. Neste sentido, todo o processo que visa o atendimento às exigências regulatórias envolve

métodos capazes de garantir a elevada qualidade dos produtos, o que contribui diretamente para o incremento nos custos produtivos (BASU *et al.*, 2008).

Do ponto de vista estratégico, as empresas precisam saber, não só como as escolhas das tecnologias e dos processos influenciam os custos da produção, como também o tipo de investimento necessário para garantir suficiência na capacidade produtiva e ainda, como a compreensão de custos pode influenciar positivamente a gestão de risco. A maioria dos modelos de análise de custos atende aos princípios de contabilidade financeira e de gestão, sendo capaz de oferecer o suporte necessário para a avaliação do impacto dos custos das diferentes tomadas de decisões, tanto em relação aos investimentos como no que diz respeito às atividades operacionais. Ao separar os custos diretos, relativos ao processo produtivo, dos demais custos, por exemplo, custos com P&D e custos administrativos, os gerentes podem avaliar com maior propriedade o desempenho de cada processo produtivo, sendo capazes de mensurar a contribuição destes para o desempenho geral da empresa (SINCLAIR e MONGE, 2010 B).

Para viabilizar uma avaliação dos custos de produção, é necessário que haja maior transparência das estruturas de custos, terminologias e metodologias aplicadas pelas empresas. Essa transparência deve ser conduzida internamente na empresa, possibilitando a definição de metas objetivas e a maior comunicação entre gestores, a área de pesquisa e desenvolvimento, área de finanças e a da produção propriamente dita, visando apoiar as iniciativas de redução de custos. Neste sentido, para disponibilizar produtos com baixo custo, é necessário reconhecer a estreita relação que existe entre as áreas de desenvolvimento e de produção, fazendo com que a capacidade de gerenciamento efetivo dos custos dessas áreas seja agregada ao núcleo de competência da empresa (SINCLAIR e MONGE, 2010 A). Além disso, o uso de técnicas de gerenciamento de custos que agreguem maior número possível de informações, como por exemplo, o método de custeio baseado em atividades pode demonstrar com maior clareza a relação existente entre as várias categorias e componentes que contribuem para a apuração de custos dos produtos e / ou serviços (SINCLAIR e MONGE, 2010 B).

O escalonamento do volume de reação e o melhoramento da etapa de purificação por TFF para obtenção de MPCO, MATT e MPCT levaram à diminuição dos custos de produção, sugerindo que houve economia de escala. O resultado mostrou que, de modo geral, o escalonamento da produção da nova vacina meningocócica C conjugada contribuiu positivamente para a redução dos custos do processo. Ele pode ser aplicado para produzir lotes em escala industrial com o objetivo de suprir a demanda da vacina, visando à realização dos ensaios clínicos de Fase II/III. A avaliação preliminar apresentada neste trabalho de tese contribuirá para a análise global de todo o investimento feito no desenvolvimento desta vacina.

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Conclusões

- O aumento da escala de obtenção do MPCO, utilizando um reator, proporcionou o monitoramento constante da temperatura e agitação da reação e uma maior rastreabilidade do processo. O emprego de cápsula filtrante com diferentes porosidades com maior área disponível para a clarificação do produto praticamente eliminou os problemas de entupimento da membrana clarificante observado na anteriormente e contribuiu com a redução do tempo e dos custos do processo escalonado. Já o aumento da TMP para 25 psi (1,7 bar) na a escala industrial reduziu de forma não significativa o tempo total do processo, sem alteração das características do produto. O volume do final do produto final MPCO obtido nesta escala foi suficiente para a realização de dois lotes de reação de conjugação, o que é desejável para a produção em escala industrial, pois representa uma economia global no tempo de processo de obtenção do conjugado.
- O aumento de escala de produção da MATT demonstrou que o tempo gasto na escala industrial foi significativamente superior em relação ao tempo na escala piloto, em função da operacionalidade do processo. Para melhorar este parâmetro adotou-se a estratégia de utilizar as mesmas condições empregadas na escala piloto, que não resultou em diferença significativa do tempo de processo entre ambas as escalas.
- A obtenção do MPCT em escala industrial foi considerada satisfatória, sem diferenças significativas entre os parâmetros de processo avaliados para ambas as escalas, sugerindo que houve o dimensionamento correto das membranas de filtração tangencial utilizadas na escala industrial. Neste sentido, o escalonamento da produção da nova vacina meningocócica C conjugada mostrou-se eficiente sob o ponto de vista operacional, tanto em relação ao aumento dos volumes produzidos como em relação ao processo de purificação.

- Os métodos físico-químicos empregados para a análise e caracterização possibilitaram evidenciar não só a consistência do processo produtivo, como também a grande similaridade, no que diz respeito aos atributos de qualidade, entre as moléculas obtidas em ambas as escalas.
- Vários testes foram realizados para avaliação da estabilidade térmica de três lotes de MPCT obtidos em escala industrial, incubados nas temperaturas de 4° C, 37° C e 55° C por cinco semanas. Os resultados analíticos mostraram que o teor de polissacarídeo, a concentração de proteína e também o pH das soluções das amostras não mostraram variação expressiva após o tempo de armazenamento nas temperaturas estudadas, sugerindo a inexistência de alteração significativa na molécula conjugada. As técnicas de espectroscopia de fluorescência e de dicroísmo circular indicaram a desnaturação parcial da proteína carreadora e uma tendência de diminuição do conteúdo de estrutura secundária da molécula estocada a 55°C. Da mesma forma, as técnicas de cromatografia de exclusão e filtração molecular e ¹H RMN mostraram, respectivamente, o alargamento na base do pico com a manutenção do tamanho hidrodinâmico da molécula conjugada e o aumento da intensidade dos picos cujos deslocamentos químicos estão relacionados aos prótons de grupamentos aromáticos e alifáticos da proteína carreadora, nos lotes avaliados. A eletroforese capilar de zona mostrou que os conjugados mantidos nas temperaturas de 37°C e 55°C apresentaram o teor de sacarídeo livre superior ao limite especificado (20%). Todos os lotes de conjugado induziram alto nível de anticorpos do tipo IgG (ELISA) e títulos de anticorpos bactericidas ≥ 4 , após a imunização de camundongos. De acordo com os resultados obtidos, embora os métodos físico-químicos tenham demonstrado haver algumas alterações estruturais na molécula conjugada em função do aumento da temperatura de estocagem, os dados biológicos não mostraram variação significativa na imunogenicidade dos conjugados, sugerindo que o modelo murino não é capaz de discriminar estas alterações estruturais.

- A análise comparativa dos custos do processo para a obtenção de um grama de MPCO, MATT e MPCT, mostrou que houve redução de custos produtivos na escala industrial, tanto em relação aos gastos com pessoal (custo homem-hora) quanto aos custos com insumos necessários para o processo de purificação por filtração tangencial, sugerindo que houve economia de escala.
- O aumento da escala de produção da nova vacina meningocócica C conjugada mostrou-se eficiente sob o ponto de vista operacional e econômico, não só em relação ao aumento dos volumes produzidos como também do processo de purificação dos produtos intermediários: MPCO e MATT, além do próprio conjugado (MPCT). Houve redução dos custos, caracterizada pela economia de escala, e o tempo global de processo não apresentou diferença significativa em relação à escala piloto. Estas são características desejáveis para a produção em grande escala e mostram impacto gerencial favorável ao processo.
- A metodologia descrita neste estudo será empregada para a obtenção dos lotes industriais da nova vacina meningocócica C conjugada, que serão submetidos aos estudos clínicos de Fase II/III, com voluntários na faixa etária entre lactentes e 19 anos.

Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar a possibilidade de uso dos parâmetros de processo e avaliações físico-químicas estabelecidos neste estudo para produzir outras vacinas conjugadas obtidas a partir da plataforma de conjugação consolidada;
- Usar métodos de custeio bem estruturados, como por exemplo, o método de custeio baseado em atividades, que possibilitem a melhor alocação dos custos indiretos, e possam suprir a demanda crescente de informações que certamente serão exigidas, tendo em vista a clara tendência de expansão da carteira de produtos de Bio-Manguinhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, R.; LÓPEZ, E.L., DEBBAG, R., VÁZQUEZ, J.A. (2014), Serogroup W meningococcal disease: global spread and current affect on the Southern Cone in Latin America. *Epidemiol. Infect.*, 142, 2461–2470.
- ABBAS, A., GONÇALVES, M. N., LEONCINE, M. (2012), Os Métodos de Custeio: Vantagens, Desvantagens e sua Aplicabilidade nos Diversos Tipos de Organizações Apresentadas pela Literatura. *ConTexto*, 12,(22), 145-159.
- ABDELHAMEED, A. S., MORRIS, G.A., ADAMS, G.G., ROWE, A. J., LALOUX, O., CERNY, L., BONNIER, B., DUVIVIER, P., CONRATH, K., LENFANT, C., HARDING, S. E. (2012), An asymmetric and slightly dimerized structure for the tetanus toxoid protein used in glycoconjugate vaccines. *Carbohydrate Polymers*. 90, 1831– 1835.
- ABIO, A., NEAL, K.R., BECK, C.R. (2013), An epidemiological review of changes in meningococcal biology during the last 100 years. *Pathogens and Global Health*, 107, (7), 373 -380.
- ACEVEDO, R., FERNÁNDEZ, S., ZAYAS, C., ACOSTA, A., SARMIENTO, M.E., FERRO, V.A., ROSENQVIST, E., CAMPA, C., CARDOSO, D., GARCIA, L., PEREZ, J.L. (2014), Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Frontiers in Immunology*, 5, (121), 1 – 6.
- AGUADO, M.T., JODAR, L., GRANOFF, D., RABINOVICH, R., CECCARINI, C., PERKIN, G.W. (2015), From Epidemic Meningitis Vaccines for Africa to the Meningitis Vaccine Project. *Clinical Infectious Diseases*, 61, (S5), S391–5.
- ALI, A., JAFRI, R.Z., MESSONNIER, N., TEVI-BENISSAN, C., DURRHEIM, D., ESKOLA, J., FERMON, F., KLUGMAN, K.P., RAMSAY, M., SOW, S., ZHUJUN, S., BHUTTA, Z., ABRAMSON, Jon. (2014), Global practices of meningococcal vaccine use and impact on invasive disease. *Pathogens and Global Health*, 108, (1), 11 – 20.
- ANDERSON, A.S., HAO, L., JIANG, Q., HARRIS, S.L., JONES, T.R., PEREZ, J.L., YORK, L., EIDEN, J., JAMSEN, K.U. (2013), Potential impact of the bivalent rLP2806 vaccine on *Neisseria meningitidis* carriage and invasive serogroup B disease. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9, (3), 471–479.
- ANDERSON, E.L., BOWERS, T., MINK, C.M., KENNEDY, D.J., BELSHE, R.B. HARAKEH, H., PAIS, L., HOLDER, P., CARLONE, G.M. (1994), Safety and Immunogenicity of Meningococcal A and C Polysaccharide Conjugate Vaccine in Adults. *Infection and Immunity*, 62, (8), 3391-3395.

- ASTRONOMO, R.D., BURTON, D.R. (2010), Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? *Nature Reviews and Drug Discovery*, 9, 308-324.
- AUNINS, J. G.; LEE, A. L.; VOLKIN, D. B., (2000) Vaccine production. Em: *The biomedical engineering handbook*, 2ª Ed., vol. II, 105-1 – 105-13, CRC Press LCC, Boca Raton, FL.
- AVCI, F.Y., KASPER, D.L. (2010), How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 107–130.
- AVCI, F.Y., LI, X., TSUJI, M., KASPER, D.L. (2011), A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design. *Nature Medicine*, 17, (12), 1602–1609.
- AZEVEDO, L. C. P.; TOSCANO, C. M.; BIERRENBACH, A. L. (2013), Bacterial Meningitis in Brazil: Baseline Epidemiologic Assessment of the Decade Prior to the Introduction of Pneumococcal and Meningococcal Vaccines. *Plos One*, 8, (6), 1 – 8.
- AZEVEDO, N., GADELHA, C.A.G., PONTES, C.F., TRINDADE, C., HAMILTON, W. (2007), *Inovação em Saúde- dilemas e desafios de uma instituição pública*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.
- BAART, G.J., DE JONG, G., PHILIPPI, M., VAN'T RIET, K., VAN DER POL, L.A., BEUVERY, E.C., TRAMPER, J., MARTENS, D.E. (2007), Scale-up for Bulk Production of Vaccine Against Meningococcal Disease. *Vaccine*, 25, (34), 6399-6408.
- BALL, P. (2000), Scale-up and Scale-Down of Membrane-Based Separation Processes. *Membrane Technology*, 117, 10-13.
- BARBOSA, A.P.R. (2009), *A formação de competências para inovar através de processos de transferência de tecnologia: um estudo de caso*. Tese de Doutorado, EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 222 p.
- BARBOSA, A.P.R., HOMMA, A., COUTO, A.R., TELES, E.M.F. (2015), From vaccines and in vitro diagnosis reagents to similar biotherapeutics production in Brazil: A case study. *Journal of Generic Medicines*, 0, (0), 1–7.

- BASH, M. C., LYNN, F., MOCCA, B., BORROW, R., FINDLOW, H., HASSAN-KING, M., PREZIOSI, M.-P., IDOKO, O., SOW, S., KULKARNI, P., LAFORCE, F.M. (2014), Development and Use of a Serum Bactericidal Assay Using Pooled Human Complement to Assess Responses to a Meningococcal Group A Conjugate Vaccine in African Toddlers. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21, 755–761
- BASTOS, R. C., CARVALHO, J. M., SILVEIRA, I. A., COUTO JACOB, S., LEANDRO, K. C. (2010), Determination of hydrazine in a meningococcal C conjugate vaccine intermediary product. *Vaccine*, 28, 5648–5651.
- BASTOS, R. C., SOUZA, I. M., SILVA, M. N., SILVA, F. P., FIGUEIRA, E; S., LEAL, M. L., JESSOUROUN, E., SILVA, J. G., MEDRONHO, R. A., SILVEIRA, I. A. F. B. (2015), Brazilian meningococcal C conjugate vaccine: Scaling up studies, *Vaccine*, 33, 4281–4287.
- BASU, P.; JOGLEKAR, G.; RAI, S.; SURESH, P.; VERNON, J. (2008), Analysis of Manufacturing Costs in Pharmaceutical Companies. *J Pharm Innov.*, 3, 30–40.
- BECKA, C.M., CHACRON-CRUZ, E. (2015), Meningococcal Disease. *J Infect Dis Ther*, 3, (5), 1 – 7.
- BIASIO, R. (2012), Apostila de contabilidade de custos. Disponível em: < <http://www.biasio.pro.br/custos-e-precos>. > Acesso em 18/08/2016.
- BIO-MANGUINHOS. Relatório de Atividades Bio-Manguinhos. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: < <https://www.bio.fiocruz.br/images/ra-2015.pdf>.> Acesso em 11/07/2016.
- BIOTECANADA. (2010), Building on the Legacy of Vaccine in Canada: Value, Opportunities and Challenges. Research and Development: Fostering Vaccine Innovation in Canada, Canada, 3, p. 44.
- BLAKE, E., JOHNSON, J., SHANKAR, N. The OptiFilt Approach to Biopharmaceutical Filter Testing: Scale-Up to Tangential Flow Filtration with Fouling. (2011), ScholarlyCommons. Disponível em:< http://repository.upenn.edu/cbe_sdr/21> Acesso em 19/09/2016.
- BLESSY, M., PATEL, R. D., PRAJAPAT, P. N., AGRAWAL, Y. K. (2014), Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs —A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 4, 159–165.

- BOLGIANO, B., MAWAS, F., YOST, S. E., CRANE, D. T., LEMERCINIER, X., CORBEL, M. J. (2001), Effect of physicochemical modification on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide–CRM₁₉₇ conjugate vaccines. *Vaccine*, 19, 3189–3200.
- BORROW, R. Advances with vaccination against *Neisseria meningitidis*. (2012), *Tropical Medicine and International Health*, 7, (2), 1478–1491.
- BORROW, R., ABAD, R., TROTTER, C., VAN DER KLIS, F. R. M., VAZQUEZ, J.A. (2013), Effectiveness of meningococcal serogroup C vaccine programmes. *Vaccine*, 31, 4477 – 4486.
- BORROW, R., BALMER, P., MILLER, E. (2005), Meningococcal surrogates of protection—serum bactericidal antibody activity. *Vaccine*, 23, 2222–2227.
- BRASIL. Resolução RDC nº. 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- BRÖKER, M., DULL, P.M., RAPPUOLI, R., COSTANTINO, P. (2009), Chemistry of a New Investigational Quadrivalent Meningococcal Conjugate Vaccine that is Immunogenic at All Ages. *Vaccine*, 27, (41), 5574-5580.
- BRÖKER, M.; VEITCH, K. (2010), Quadrivalent meningococcal vaccines: Hyporesponsiveness as an important consideration when choosing between the use of conjugate vaccine or polysaccharide vaccine. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8, (1), 47-50,
- BUCKLAND, B. C. (2005), The Process Development Challenges for a New Vaccine. *Nature Medicine*, 11, s16- s19.
- BUNDLER, D. R.; SMITH, I. C. P.; JENNINGS, H. J. (1974), Determination of the Structure and Conformation of Bacterial Polysaccharides by Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance: Studies on the Group-Specific Antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups A and X. *J. Biol. Chem.*, 249, (7), 2275-2281.
- CAMPBELL H, PARIKH S. R., BORROW R, KACZMARSKI E, RAMSAY ME, LADHANI S. N. (2016), Presentation with gastrointestinal symptoms and high case fatality associated with group W meningococcal disease (MenW) in teenagers, England, July 2015 to January 2016. *Euro Surveill.* 21, (12), 1 – 4
- CAMPBELL, H., SALIBA, V., BORROW, R., RAMSAY, M., LADHANI, S. N. (2015), Targeted vaccination of teenagers following continued rapid endemic expansion of a single meningococcal group W clone (sequence type 11 clonal complex), United Kingdom 2015. *Euro Surveill.* 20, (28), 1 – 5.

- CAMPBELL, H.; RAMSAY, M. (2011), A Short Review of Serogroup C Meningococcal Conjugate Vaccines. *European Infectious Disease*, 5, (2), 129-134.
- CARARETO, E. S., JAYME, G., TAVARES, M. P. Z., VALE, V. P. (2006), Gestão Estratégica de Custos: custos na tomada de decisão. *Revista de Economia da UEG*, 2, (2), 1 – 24.
- CEYHAN, M., GÜRLER, N., OZSUREKCI, Y., KESER, M., AYGAN, A. E., GURBUZ, V., SALMAN, N., CAMCIOGLU, Y., DINLEYICI, E. C., OZKAN, S., SENSOY, G., BELET, N., ALHAN, E., HACIMUSTAFAOGLU, M., CELEBI, S., UZUN, H., ONER, A. F., KURUGOL, Z., TAS, M. A., AYGUN, D., ONCEL, E. K., CELIK, M., YASA, O., AKIN, F., COŞKUN, Y. (2014), Meningitis caused by *Neisseria Meningitidis*, *Hemophilus Influenzae* Type B and *Streptococcus Pneumoniae* during 2005–2012 in Turkey, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10, (9), 2706-2712.
- CHEN, D., KRISTENSEN, D. (2009), Opportunities and Challenges of Developing Thermostable Vaccines, *Expert Rev. Vaccines*, 8, 547 – 557.
- CHILUKURI, S. R., REDDY, P., AVALASKAR, N., MALLYA, A., PISAL, P., DHERE, R. M. (2014), Process development and immunogenicity studies on a serogroup ‘X’ Meningococcal polysaccharide conjugate vaccine. *Biologicals*, 42, 160 – 168.
- CHU, C., SCHNEERSON, R., ROBBINS, J. B., RASTOGI, S. C. (1983), Further Studies on the Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and Pneumococcal type 6A Polysaccharide-Protein Conjugates. *Infect Immunity*, 40, (1), 245-256.
- COBB, B. A., KASPER, D. L. (2005), Zwitterionic capsular polysaccharides: the new MHCII-dependent antigens. *Cellular Microbiology*, 7, (10), 1398–1403.
- CORTES, M.A.; CARDOSO, D.; FITZGERALD, J. DIFABIO, J.L. (2012), Public vaccine manufacturing capacity in the Latin American and Caribbean region: Current status and perspectives. *Biologicals*, 40, 3 – 14.
- COSTANTINO, H. R., SCHWENDEMAN, S. P., GRIEBENOW, K., KLIBANOV, A. M., LANGER, R. (1996), The Secondary Structure and Aggregation of Lyophilized Tetanus Toxoid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, (12), 1290-1293.
- COSTANTINO, P., VITI, S., PODDA, A., VELMONTE, M. A., NENCIONI, L., RAPPUOLI, R. (1992), Development and Phase 1 Clinical Testing of a Conjugate Vaccine Against Meningococcus A and C. *Vaccine*, 10, (10), 691-698.
- CUCCUI, J., WREN, B. (2014), Hijacking bacterial glycosylation for the production of glycoconjugates, from vaccines to humanised glycoproteins. *Royal Pharmaceutical Society, Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67, 338–350.

- CUERVO, M.L.C., PÉREZ, LR., OVIEDO, M., COSTA, L., PERDOMO, V. (2007), Relationships among physico-chemical and biological tests for a synthetic Hib-TT conjugate vaccine. *Vaccine*, 25, 194-200.
- CURLING, J., RATHORE, A.S., KALTENBRUNNER., O., LATHAM, P., LEVINE, H. (2004), Costing Issues in the Production of Biopharmaceuticals. *BioPharm International*, 17, (2), 1 – 7.
- DAGAN, R., POOLMAN, J., SIEGRIST, C.-A. (2010), Glycoconjugate vaccines and immune interference: A review. *Vaccine*, 28, (34), 5513-5523.
- DE MORAES, J.C., KEMP, B., DE LEMOS, A.P.S, GORLA, M.C.O., MARQUES, E.G.L., FERREIRA, M.C., SACCHI, C., CARVALHANAS, T.R.M.P., RIBEIRO, A.F., FERREIRA, C.M., SALGADO, M.M., FUKASAWA, L., GONÇALVES, M.G., HIGA, F., ANGERAMI, R., FREITAS, A.R., SATO, H.K., SÁFADI, M.A.P. (2015), Prevalence, Risk Factors and Molecular Characteristics of Meningococcal Carriage Among Brazilian Adolescents. *Pediatr Infect Dis J*, 34, 1197–1202.
- DELLEPIANE, N.; GRIFITHS, E.; MILSTEIN, J. B. (2000), New Challenges in Assuring Vaccine Quality. *Bull World Health Organ*, 78, (2), 155-162.
- DIAS, E.A., PADOVEZE, C.L. (2007), Os Diferentes Métodos de Custeio e sua Implicação na Apuração de Custo do Produto: um estudo caso em empresa de graxas e óleos industriais. *Revista Eletrônica Gestão e Sociedade*, 2, 1 – 22.
- ENGSTRON, E.M., MARTINS, R.M., LEAL, M.L.M., MAIA, M.L.S., SEPÚLVEDA, C. S., CAMACHO, L.A.B., LEAL, M.L.M., SILVEIRA, I.A.F., HOMMA, A., JESSOUROUN, E. (2012), Phase II Clinical Study of a Brazilian Meningococcal C Conjugate Vaccine, *Anais do congresso 18th International Pathogenic Neisseria Conference*, Wuzburg, Alemanha.
- ERICKSON, B., NELSON, J. E., WINTERS, P. (2012), Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnol. J*, 7, 176–185.
- ESBERARD, R.R.; CHAIM, R.V., TUROLLA, F. A. (2009), Custos de produção como diferencial estratégico: o caso do setor sucroalcooleiro. *Revista Administração em Diálogo*, 13, (2), 73-90.
- EUROPEAN Pharmacopoeia. 7.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2013. 776 p.
- FRASCH, C. E. (2009), Preparation of Bacterial Polysaccharide–Protein Conjugates: Analytical and Manufacturing Challenges. *Vaccine*, 27, (46), 6468-6470.

- FRASCH, C.E., KAPRE, S. V., LEE, C.-H., PRÉAUD, J.-M. (2015), Technical Development of a New Meningococcal Conjugate Vaccine. *Clinical Infectious Diseases*, 61, S404 – 409.
- FREESE, S. (2001), Polysaccharide Vaccines. Em Ellis, R. W (ed), *New Vaccine Technologies*, 227-232, Eureka.com / Landes Bioscience, Texas.
- FUSCO, P. C., FARLEY, E. K., HUANG, C. H., MOORE, S., MICHON, F. (2007), Protective Meningococcal Capsular Polysaccharide Epitopes and the Role of *O* Acetylation. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, (5), 577-584.
- GALAZKA, A., MILSTIEN, J., ZAFFRAN, M. (1998), Thermostability of vaccines. Em: *Global Programs for Vaccines and Immunization*. WHO/GPV/98.07, Geneva, Switzerland, 1 – 64.
- GAO, F., LOCKYER, K., BURKIN, K., CRANE, D. T., BOLGIANO, B. (2014), A physico-chemical assessment of the thermal stability of pneumococcal conjugate vaccine Components. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10, (9), 2744-2753.
- GARRIDO-ESTEPA, M., LEÓN-GÓMEZ, I., HERRUZO, R., CANO, R. (2014), Changes in meningococcal C epidemiology and vaccine effectiveness after vaccine introduction and schedule modification. *Vaccine*, 32, 2604–2609.
- GASPARINI, R., PANATTO, D., BRAGAZZI, N. L., LAI, P. L., BECHINI, A. LEVI, M., DURANDO, P., AMICIZIA, D. (2015), How the Knowledge of Interactions between Meningococcus and the Human Immune System Has Been Used to Prepare Effective *Neisseria meningitidis* Vaccines. *Journal of Immunology Research*, 1 - 27.
- GEIGERT, J. (2013) Biologics are not chemical drugs. Em: *The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and Other Biologics*. 21-33. Springer Science+Business Media, New York.
- GHEESLING, L. L., CARLONE, G. M., PAIS, L. B., HOLDER, P. F., MASLANKA, S. E., PLIKAYTIS, B. D., ACHTMAN, M., DENSEN, P., FRASCH, C. E., KAYHTY, H., MAYS, J. P., NENCIONI, L., PEETERS, C., PHIPPS, D. C., POOLMAN, J. T., ROSENQVIST, E., SIBER, G. R., THIESEN, B., TAI, J., THOMPSON, C. M., VELLA, P. P., WENGER, J. D. (1994), Multicenter comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup C anticapsular polysaccharide antibody levels measured by a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol*, 32, (6), 1475 – 1482.
- GHOSH, R. (2006), Membrane Based Bioseparation. Em: *Principles of Bioseparations Engineering*. 199-250. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapura:

- GIRARD, M. P., PREZIOSI, M.P.; AGUADO, M. T.; KIENY, M. P. (2006), A Review of Vaccine Research and Development: Meningococcal Disease. *Vaccine*, 24, (22), 4692 - 4700.
- GOMES, R. P., PIMENTEL, V. P., LANDIM, A. B., PIERONI, J. P. (2012), Ensaios clínicos no Brasil: competitividade internacional e desafios. *BNDES Setorial*, 36, 45-84.
- GONÇALVES, P. C. Z., DRIESSEN, A. L., ROSÁRIO, B., HORTA, B. R., SUTTILE, F. P., WROBLEVSKI, F. C. (2014), Perfil epidemiológico das meningites meningocócicas nos últimos 11 anos em Curitiba-PR. *Rev. Med. Res.*, 16, (2), 113-121.
- GRANOFF, D. M.; PELTON, S.; HARRISON, L. H. (2012), Meningococcal Vaccines. Em: Stanley A. Plotkin, Walter A. Orenstein e Paul A. Offit (eds), *Vaccines*, 388-418, Elsevier Saunders, Scotland.
- GREENHILL, A. R., PHUANUKOONNON, S., MICHAEL, A., YOANNES, M., ORAMI, T., SMITH, H., MURPHY, D., BLYTH, C., REEDER, J., SIBA, P., POMAT, W., LEHMANN, D. (2015), *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in paediatric meningitis patients at Goroka General Hospital, Papua New Guinea: serotype distribution and antimicrobial susceptibility in the pre-vaccine era. *BMC Infectious Diseases*, 15 (485), 1 – 8.
- GRONEMEYER, P., DITZ, R., STRUBE, J. (2014), Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering*, 1, 188-212.
- GUDLAVALLETI, S.K., LEE, C.H., NORRIS, S.E., PAUL-SATYASEELA, M., VANN, W.F., FRASCH, C.E. (2007), Comparison of *Neisseria Meningitidis* serogroup W135 polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines made by periodate activation of *O*-acetylated, non-*O*-acetylated and chemically de-*O*-acetylated polysaccharide. *Vaccine*. 25, (46), 7972-7980.
- HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. (2006), Processos de Separação por Membranas. E-papers Serviços Editoriais Ltda, Rio de Janeiro.
- HARRISON, L.H. (2010), Epidemiological Profile of Meningococcal Disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 50, (S2), S37-S44.
- HARRISON L.H., PELTON S.I., WILDER-SMITH A., HOLST J., SAFADI M.A., VAZQUEZ J.A., TAHA M.K., LAFORCE F.M., VON GOTTBURG A., BORROW R., PLOTKIN S.A. (2011), The Global Meningococcal Initiative: Recommendations for reducing the global burden of meningococcal disease. *Vaccine*, 29, (18), 3363-3371.

- HARRISON, L.H.; TROTTER, C.L.; RAMSAY, M.E. (2009), Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*, 27, S 2, B51-63.
- HASIJA, M., LI, L., RAHMAN, N., AUSAR, S. F. (2013), Forced degradation studies: an essential tool for the formulation development of vaccines. *Vaccine: Development and Therapy*, 3, 11–33.
- HEDARI, C. P., KHINKARLY, R. W., DBAIBO, G. S. (2014), Meningococcal serogroups A, C, W135, and Y tetanus toxoid conjugate vaccine: a new conjugate vaccine against invasive meningococcal disease. *Infection and Drug Resistance*, 7, 85–99.
- HEINDEL, N. D., ZHAO, H., LEIBY, J., VANDONGEN, J. M., LACEY, J. C., LIMA, D. A., SHABSOUG, B., BUZBY, J. H. (1990), Hydrazide Pharmaceuticals as Conjugates to Polyaldehyde Dextran: Synthesis, Characterization and Stability. *Bioconjug Chem.*, 1, (1), 77-82.
- HERMANSON, G. T. *Bioconjugate Techniques*. (2008), 2a Ed., Elsevier, Oxford.
- HILL, D. J., GRIFFITHS, N. J., BORODINA, E., VIRJI, M. (2010), Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. *Clinical Science*, 118, 547–564.
- HILL, D. M. C., LUCIDARME, J., GRAY, S. J., NEWBOLD, L. S., URE, R., BREHONY, C., HARRISON, O. B., BRAY, J. E., JOLLEY, K. A., BRATCHER, H. B., PARKHILL, J., TANG, C. M., BORROW, R., MAIDEN, M. C. J. (2015), Genomic epidemiology of age-associated meningococcal lineages in national surveillance: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*, 1 – 10.
- HIRVE, S. BAVDEKAR, A., JUVEKAR, S., AGARWAL, D., BARDE, P., MANGRULE, S., PATWARDHAN, M., PANDIT, A., KULKARNI, P. S. (2011), A comparative study to evaluate the safety and immunogenicity of two lots of *Haemophilus influenzae* type-B conjugate vaccine manufactured at different scales. *Vaccine*, 29, 5363-5367.
- HO. M.M., BOLGIANO, B., CORBEL, M.J. (2000), Assessment of the stability and immunogenicity of meningococcal oligosaccharide C–CRM₁₉₇ conjugate vaccines. *Vaccine*, 19, 716–25.
- HO. M. M., LEMERCINIER, X., BOLGIANO, B., CRANE, D., CORBEL, M. J. (2001), Solution stability studies of the subunit components of meningococcal C oligosaccharide–CRM₁₉₇ conjugate vaccines. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 33, 91–98.

- HO, M.M., MAWAS, F., BOLGIANO, B., LEMERCINIER, X., CRANE, D.T., HUSKISSON, R., CORBEL, M. J. (2002), Physicochemical and immunological examination of the thermal stability of tetanus toxoid conjugate vaccines. *Vaccine*, 20, 3509–3522.
- HO, M.M., MAWAS, F., BOLGIANO, B., LEMERCINIER X., CRANE, D.T., HUSKISSON R., CORBEL M.J., (2002), Physico-Chemical and Immunological Examination of the Thermal Stability of Tetanus Toxoid Conjugate Vaccines. *Vaccine*, 20, (29-30), 3509-3522.
- HOLS, J. OSTER, P., ARNOLD, R., TATLEY, M.V., NÆSS, L.M., AABERGE, I.S., GALLOWAY, Y., MCNICHOLAS, A., O'HALLAHAN, J., ROSENQVIST, E., BLACK, S. (2013), Vaccines Against Meningococcal Serogroup B Disease Containing Outer Membrane Vesicles (OMV): Lessons From Past Programs and Implications for the future. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9, (6), 1241-1253.
- IBARZ-PAVÓN, A. B., LEMOS A. P., GORLA M. C., REGUEIRA M., SIREVA WORKING GROUP II, GABASTOU J.M. (2012), Laboratory-Based Surveillance of *Neisseria meningitidis* Isolates from Disease Cases in Latin American and Caribbean Countries, SIREVA II 2006–2010. *PloS ONE*, 7, (8), 1-13.
- ICH, Q5C: International Conference on Harmonization. (1995), Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002823.pdf>.
- IHSSEN, J., KOWARIK, M., DILETTOSO, S., TANNER, C., WACKER, M., THÖNY-MEYER, L. (2010), Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 9, (61), 1-13.
- ISAACS, D. (2015), Pandemic paranoia: A heretical view of Ebola and other infectious threats Warning: Extreme danger of heresy. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 51, 129–130.
- JAFRI, R. Z., ALI, A., MESSONNIER, N. E., TEVI-BENISSAN, C., DURRHEIM, D., ESKOLA, J., FERMON, F., KLUGMAN, K. P., RAMSAY, M., SOW, S., ZHUJUN, S., BHUTTA, Z. A., ABRAMSON, J. (2013), Global epidemiology of invasive meningococcal disease. *Population Health Metrics*, 11, (17), 1 – 9.
- JENNINGS, H. J.; LUGOWSKI, C. (1981), Immunochemistry of Groups A, B, and C Meningococcal Polysaccharide–Tetanus Toxoid Conjugates. *J Immunol*, 127, (3), 1011-1018.

- JESSOUORUN, E., SILVEIRA, I. A. F. B., BASTOS, R. C., FRASCH, C. E., LEE, C. H., (2015), Process for preparing polysaccharide-protein conjugate vaccines, Patente: n. US 9173931, concedida em 03/11/2015.
- JÓDAR, L.; GRIFFITHS, E.; FEAVERS, I. (2004), Scientific challenges for the quality control and production of group C meningococcal conjugate vaccines. *Vaccine*, 22, (8), 1047-1053.
- JONES, C. (2005), Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. *Academia Brasileira Ciências*, 77, (2), 293-324.
- JONES, C.; RAVENSCROFT, N. (2008) NMR Assays for Carbohydrate-Based Vaccines. Em: Holzgrabe U., Wawer I., Diehl B. (eds), *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, 341-364, Elsevier, UK.
- JOSEFSBERG, J. O., BUCKLAND, B. (2012), Vaccine Process Technology Biotechnology and Bioengineering. *Biotechnol. Bioeng.*, 109, 1443-1460.
- JOSHI, V. S., BAJAJ, I. B., SURVASE S. A., SINGHAL, R. S., KENNEDY J. F. (2009), Meningococcal Polysaccharide Vaccines: A Review. *Carbohydrate Polymers*, 75, (4), 553-565.
- KING, T. P.; ZHAO, S. W., LAM, T. (1986), Preparation of Protein Conjugates Via Intramolecular Hydrazon Linkage. *Biochemistry*, 25, (19), 5774-5779.
- KRIEGLSTEIN, K; HENSCHEN, A; WELLER, U; HABERMANN, E. (1990), Arrangement of disulfide bridges and positions of sulfhydryl groups in tetanus toxin. *Eur. J. Biochem*, 188, 39-45.
- KUMRU, O. S., JOSHI, S. B., SMITH, D. E., MIDDAUGH, C. R., PRUSIK, T., VOLKIN, D. B. (2014), Vaccine instability in the cold chain: Mechanisms, analysis and formulation strategies. *Biologicals*, 42, 237 – 259.
- LAFERRIERE, C., RAVENSCROFT, N., WILSON S., COMBRINK, J., GORDON, L., PETRE J. (2011), Experimental Design to Optimize an *Haemophilus influenzae* type b Conjugate Vaccine made with Hydrazide-Derivatized Tetanus Toxoid. *Glycoconj J*, 28, (7), 463-472.
- LAFORCE, F. M., DHERE, R., PISAL, S.S., ALDERSON, M., SII POLYMENING AUTHOR GROUP. (2014) Epidemic Meningococcal Meningitis in Africa: Success Using a Group A Conjugate Vaccine and a Development Update on a New Pentavalent Vaccine (A/C/Y/W/X). In: XIXth International Pathogenic Neisseria Conference, P 47, Asheville, North Carolina.

- LAFORCE, M. Development update on a new African pentavalent ACYWXX conjugate vaccine. Meningitis Vaccine Project Closure Conference Addis, Ethiopia, 2016. disponível em: <
http://who.int/immunization/research/meetings_workshops/Kulkarni_LaForce_MVPconf16.pdf> Acesso em 17/07/2016.
- LAKOWICZ, J. R. (2006), Principles of Fluorescence Spectroscopy, (3^a Ed.), Springer, New York.
- LEE, C. H., FRASCH, C. E., (2011), Polysaccharide-protein conjugate vaccine. Patente: n. US 8048432, concedida em 01/11/2011.
- LEE, C.H., KUO, W.C., BERI, S., KAPRE, S., JOSHI, J.S., BOUVERET, N., LAFORCE, F.M., FRASCH, C.E. (2009), Preparation and characterization of an immunogenic meningococcal group A conjugate vaccine for use in Africa. *Vaccine*, 27, (5), 726-732.
- LEE, S-M., PETERMANN, R., PORTE, Q., BEREZUK, G., CROWE, B., SHIRTZ, J. (2007), Long-Term Thermal Stability of Group C Meningococcal Polysaccharide-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine. *Human Vaccines*, 3, 27-32.
- LEMERCINIER, X.; JONES, C. (1996), Full ¹H NMR assignment and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production. *Carbohydr Res.*, 296, (1-4), 83-96.
- LEROUX-ROELS, G., BONANNI, P., TANTAWICHIE, T., ZEPP, F. (2011), Vaccine development. Em: GARÇON, N., STERN, P. L., CUNNINGHAM, A. L. (eds.), *Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology*, 1, (1), 115 – 150, Elsevier B.V, Amsterdã.
- LEVINE, H. L., LATHAM, P. The Use of Models to Estimate and Control the Cost of Biopharmaceutical Manufacturing. *BioProcess Technology Consultants*. Disponível em: <<http://www.bptc.com/node/91>> . Acesso em 02/09/2016]
- LIGHTFOOT, E. N.; MOSCARIELLO, J. S. (2004), *Bioseparations*. Wiley InterScience, 87, (3), 259-273.
- LINDBERG, A. A. (1999), Glycoprotein conjugate vaccines. *Vaccine*, 17, S28- S33.
- LIU, T. Y., GOTSCHLICH E. C., DUNNE F.T., JONSSON E.K. (1971), Studies on the Meningococcal Polysaccharides II – Composition and Chemical Properties of the Group B and Group C Polysaccharide. *J. Biol. Chem*, v. 246, (15), 4703-4712.

- LOCKYER, K., GAO, F., DERRICK, J. P., BOLGIANO, B. (2015), Structural correlates of carrier protein recognition in tetanus toxoid-conjugated bacterial polysaccharide vaccines. *Vaccine*, 33, 1345–1352.
- LOWRY, O. H. ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.(1951), Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193, (1), 265-275.
- LUTZ, H., RAGHUNATH, B. (2007), Ultrafiltration Process Design and Implementation. In: SHUKLA, A. A., ETZEL, M. R., GADAM, S. (eds). *Process Scale Bioseparations for The Biopharmaceutical Industry*, 297-332, Taylor & Francis Group, Flórida.
- MAIDEN. M. C. (2013), The impact of protein-conjugate polysaccharide vaccines: an endgame for meningitis? *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 368, (1623), 1 – 11.
- MARTINS, E.; (2003) *Contabilidade de custos*, 9ª Ed., Atlas, São Paulo.
- MARTINS, R.M., BARBOSA, G.G., MAIA, M.L.S., ENGSTROM, E., CAMACHO, L.A.B., PÉRISSÉ A.R.S., SILVEIRA, I.A.F.B., LEAL, M.L., MARCOVISTZ, R., HOMMA, A., JESSOUROUN, E. Phase I study of a meningococcal C strain 2135 conjugate vaccine. 17th International Pathogenic *Neisseria* Conference, 2010, Canada.
- METZ, B., TILSTRA, W., VAN DER PUT, R., SPRUIT, N., IJSSEL, J., ROBERT, J., HENDRIKSEN, C., KERSTEN, G. (2013), Physicochemical and immunochemical assays for monitoring consistent production of tetanus toxoid. *Biologicals*, 41, 231-237.
- MICOLI, F., RONDINI, S., PISONI, I., GIANNELLI, C., DI CIOCCIO, V., COSTANTINO, P., SAUL, A., MARTIN, L.B. (2012), Production of a conjugate vaccine for *Salmonella enterica* serovar Typhi from Citrobacte Vi, *Vaccine*, 30, 853-861.
- MILLIPORE. Protein Concentration and Diafiltration by Tangential Flow Filtration. Technical Brief. Disponível em: < <http://merckmillipore.com> > Acesso em: 29 nov. 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE / SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> (Acesso em 16 de novembro de 2014
- MOND, J.J.; LEES, A.; SNAPPER, C.M. (1995), T Cell-Independent Antigens Type 2. *Annu. Rev. Immunol.*, 13, 655-692.

- NAUTA, J. (2011), *Statistics in Clinical Vaccine Trials*. Springe, Verlag Berlin Heidelberg.
- OVIEDO-ORTA, E., AHMED, S., RAPPUOLI, R., BLACK, S. (2015), Prevention and control of meningococcal outbreaks: The emerging role of serogroup B meningococcal vaccines. *Vaccine*, 33, 8628-8635.
- PADOVEZE, C.L. (2006), *Visão geral da contabilidade de custos*, Pioneira Thomson Learning, São Paulo.
- PARCIANELO, E.; GONÇALVES, H.S.; SOARES, C.S. (2015), A contabilidade de custos no setor público: a realidade das prefeituras da região central do RS. *Anais do 6º Congresso UFSC de Iniciação Científica em Contabilidade 2015*, Santa Catarina, RS.
- PEINADO, J., GRAEML, A.R. (2007), *Administração da Produção. Operações Industriais e de Serviços*, Centro Universitário Positivo – UnicenP, Curitiba.
- PERRETT, K.P., NOLAN, T.M., MCVERNON, J. (2013), A Licensed Combined *Haemophilus influenzae* Type b-Serogroups C and Y Meningococcal Conjugate Vaccine. *Infect Dis Ther*, 2, 1–13.
- PERRETT, K.P., WINTER, A.P., KIBWANA, E., JIN, C., JOHN, T.M., YU, L.M., BORROW, R., CURTIS, N., POLLARD, A.J. (2010), Antibody Persistence after Serogroup C Meningococcal Conjugate Immunization of United Kingdom Primary-School Children in 1999–2000 and Response to a Booster: A Phase 4 Clinical Trial. *Clinical Infectious Diseases*, 50, 1601–1610
- PICHICHERO, M. E. (2013), Protein carriers of conjugate vaccines Characteristics, development, and clinical trials, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9, (12), 2505-2523.
- PIERONI, J.P, CAPANEMA, L.X.L., REIS, C., SOUZA, J.O.B., SILVA, L.G. (2009) *Terceirização da P&D de Medicamentos: Panorama do Setor de Testes Pré-Clínicos no Brasil*. *BNDES Setorial*, 29, 131-158.
- PIMENTEL, V., GOMES, R., LANDIM, A., MACIEL, M., PIERONI, J.P. (2013), O desafio de adensar a cadeia de P&D de medicamentos biotecnológicos no Brasil. *BNDES Setorial*, 38, 173-212.
- POLLARD, A.J.; PERRETT, K.P.; BEVERLEY, P.C. (2009), Maintaining protection against invasive bacteria with protein– polysaccharide conjugate vaccines. *Nature Reviews Immunology*, 9, (3), 213-220.
- QUENTAL, C.; SALLES FILHO, S. (2006), *Ensaio Clínicos: Capacitação Nacional para Avaliação de Medicamentos e Vacinas*. *Rev Bras Epidemiol*, 9, (4), 408-424.

- RANA, R., DALAL, J., SINGH, D., KUMAR, N., HANIF, S., JOSHI, N., CHHIKARA, M. K. (2015), Development and characterization of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine prepared using different polysaccharide chain lengths. Chainlengths. *Vaccine*, 33, 2646–2654.
- RAO, K.N. KUMARAN, D., BINZ, T., SWAMINATHAN, S. (2005), Structural Analysis of the Catalytic Domain of Tetanus Neurotoxin. *Toxicon*, 45, (7), 929-939.
- RATHORE, A.S., KARPEN, M. (2006), Production Cost Analysis: Economic Analysis as a tool for Process Development: Harvest of a High Cell Density Fermentation. *BioPharm International*, 19, (11), 1 – 5.
- RATHORE, A. S.; SHIRKE, A. (2011), Recent Developments in Membrane-Based Separations. *Biotechnology Processes: Review. Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 41, (4), 398-421.
- RAY, S. (2011), Challenges and Trends in Vaccine Manufacturing. *BioPharm International Supplements*, 24, (10).
- REQUEJO, H.I.Z. Comportamento imunológico das vacinas anti-meningocócicas. (1997), *Revista de Saúde Pública*, 31 (4), 402 – 416.
- REQUEJO, H.I.Z. Meningite Meningocócica no Brasil - Cem Anos de História das Epidemias. (2005), *NewsLab*, 73, 158-164.
- REZZADORI, K. (2010), Pasteurização térmica e com membranas do caldo de cana adicionado de suco de maracujá. Dissertação de Mestrado, CT/UFSC, Florianópolis, 161p.
- RIBEIRO, R.P., SAUAIA, A.C.A, FOUTO, N.M.M.D. (2014), Custos e economias de escala em um jogo de empresas. *RACE*, 13, (2), 663-690.
- ROBINSON, J. P., PICKLESIMER, J. B., PUETT, D. (1975), Tetanus Toxin: The effect of chemical modifications on toxicity, immunogenicity, and conformation. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, (18), 7435-7442.
- ROSENTEIN, N.E., PERKINS, B.A., STEPHENS D.S., POPOVIC, T., HUGHES J.M. (2001), Meningococcal Disease. *N Engl J Med*, 344, 1378-1388.
- ROY, R.; KATZENELLENBOEGEN, E.; JENNINGS, H.J. (1984), Improved Procedures for the Conjugation of Oligosaccharides to Protein by Reductive Amination. *Can. J. Biochem. Cell Biol*, 62, (5), 270-275.
- SÁENZ, T.W., THORSTEINSDÓTTIR, H., DE SOUZA, M.C. (2010), Cuba and Brazil: An Important Example of South-South Collaboration in Health Biotechnology. *MEDICC Review*, 12, (3), 32 – 35.

- SÁFADI, M.A.P. (2014), Perspectivas na prevenção da doença meningocócica no Brasil. *Revista Imunizações*, 7,(3), 8-11p.
- SÁFADI, M.A.P.; BARROS, A.P. (2006), Meningococcal Conjugate Vaccines: Efficacy and New Combinations. *J Pediatr*, 82, (3), S35-S44.
- SÁFADI, M.A.P, BEREZIN, E.N., ARLANT, L.H.F. (2014), Meningococcal Disease: Epidemiology and Early Effects of Immunization Programs. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 3, (2), 91–93.
- SÁFADI, M.A.P.; BEREZIN, E.N.; OSELKA, G.W. (2012), A critical Appraisal of the Recommendations for the Use of Meningococcal Conjugate Vaccines. *J Pediatr*, 88, (3), 195-202.
- SÁFADI, M.A P.; CINTRA, O.A.L. (2010), Epidemiology of Meningococcal Disease in Latin America: Current Situation and Opportunities for Prevention. *Neurological Research*, 32, (3), 263-271.
- SÁFADI, M.A.P.; GONZALEZ-AYALA, S., JAKEL, A., WIEFFER, H., MORENO, C., VYSE, A. (2013), The epidemiology of meningococcal disease in Latin America 1945–2010: an unpredictable and changing landscape. *Epidemiol. Infect.*, 141, 447–458.
- SÁFADI, M. A. P.; O'RYAN, M., BRAVO, M.T.V., BRANDILEONE, M.C.C., GORLA, M.C.O., LEMOS, A.P.S., MORENO, G., VAZQUEZ, J.A., LÓPEZ, E.L., TAHA, M-K., BORROW, R. (2015), The current situation of meningococcal disease in Latin America and updated Global Meningococcal Initiative (GMI) recommendations., On behalf of the Global Meningococcal Initiative. *Vaccine*, 33, (48), 6529–6536.
- SALINSKY, E.; WERBLE, C. (2006), The Vaccine Industry: Does It Need a Shot in the Arm? FORUM, N. H. P. Washington DC: The George Washington University, 1 - 34.
- SAYDAM, M., BURKIN, K., CARE, R., RIGSBY, P., BOLGIANO, B., MAWAS, F. (2010), Immunogenicity and thermal stability of a combined vaccine against *Haemophilus influenzae* type b and *Neisseria meningitidis* serogroup C diseases. *Vaccine*, 28, 6228–6234.
- SCHAFFNER, W. HARRISON, L. H.; KAPLAN, S. L.; MILLER, E.; ORENSTEIN, W.; PETER, G.; ROSENSTEIN N. E. (2004), The Changing Epidemiology of Meningococcal Disease Among U.S. Children, Adolescents and Young Adults. National Foundation for Infectious Diseases, 1 – 24p.

- SCHNNERSON, R, BARRERA, O., SUTTON, A., ROBBINS, J. B. (1980) Preparation, Characterization and Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b Polysaccharide-Protein Conjugates. *J Exp Med*, 152, (2), 361-376.
- SCHWARTZ, L. Desalting and Buffer Exchange by Dialysis, Gel Filtration, or Diafiltration: Disponível em: < <http://www.pall.com/main/laboratory/literature-library-details.page?id=42217-48K> >. Acesso em 14 dez 2014.
- SHEN, C. F., LANTHIER, S., JACOB, D., MONTES, J., BEATH, A., BERESFORD, A., KAMEN, A. (2012), Process Optimization and Scale-up for Production of Rabies Vaccine Live Adenovirus Vector (AdRG1.3). *Vaccine*, 30, (2), 300-306.
- SHEN, X., LAGERGÅRD, T., YANG, Y., LINDBLAD, M., FREDRIKSSON, M., HOLMGREN, J. (2001), Group B Streptococcus Capsular Polysaccharide-cholera Toxin B Subunit Conjugate Vaccines Prepared by Different Methods for Intranasal Immunization. *Infect. Immun.*, 69, (1), 297-306.
- SILVA, F.R. (2009), Estudo de Otimização dos Processos Envolvidos na Obtenção da Vacina Conjugada Brasileira Contra *Neisseria meningitidis* do Grupo C. Dissertação de Mestrado Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, 251p.
- SILVEIRA, I.A.F.B., BASTOS, R.C., NETO, M.S., LARANJEIRA, A.P., ASSIS, E.F., FERNANDES, S.A.R., LEAL, M.L., SILVA, W.C., LEE, C.-H., FRASCH, C.E., PERALTA, J.M., JESSOURON, E. (2007), Characterization and Immunogenicity of Meningococcal group C Conjugate Vaccine Prepared Using Hydrazide-activated Tetanus Toxoid. *Vaccine*, 25, (41), 7261-7270.
- SINCLAIR, A.; MONGE, M. (2010 A), Delivering Affordable Biologics from Gene to Vial. Economic Challenges for Manufacturing Biologics in the New Millennium: Disponível em: < <http://www.bioprocessintl.com/business/economics/delivering-affordable-biologics-from-gene-to-vial-206428/> >. Acesso em 19 outubro 2016.
- SINCLAIR, A.; MONGE, M. (2010 B), Measuring Manufacturing Cost and Its Impact on Organizations: Disponível em: < <http://www.bioprocessintl.com/upstream-processing/assays/measuring-manufacturing-cost-and-its-impact-on-organizations-297322/> >. Acesso em 19 outubro 2016.
- SINCLAIR, A.; MONGE, M. (2010 C), Influence of Process Development Decisions on Manufacturing Costs: Disponível em: < <http://www.bioprocessintl.com/business/economics/influence-of-process-development-decisions-on-manufacturing-costs-302903/> >. Acesso em 19 outubro 2016.
- SMITH, J., LIPSITCH, M., ALMOND, J.W. (2011), Vaccine Production, Distribution, Access, and Uptake. *Lancet*, 378, (9789), 428-438.

- SNAPE, M. D.; POLLARD, A. J. (2005), Meningococcal Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccines. *Lancet Infect Dis*, 5, (1), 21-30.
- SOUZA, I.M. (2011), Separação e quantificação de proteína e polissacarídeo livres na vacina meningocócica C conjugada brasileira utilizando eletroforese capilar. Dissertação de Mestrado, Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, 106p.
- SOUZA, I.M., SILVA, M.N., FIGUEIRA, E.S., LEAL, M.L., JESSOURON, E., ABRANTES, S.M.P., SILVEIRA, I.A.F.B. (2013), Single validation of CE method for determining free polysaccharide content in a Brazilian meningococcal C conjugate vaccine. *Electrophoresis*, 34, 3221-6
- SRIDHAR, S., GREENWOOD, B., HEAD, C., PLOTKIN, S.A., SÁFADI, M.A., SAHA, S., TAHA, M-K., TOMORI, O., GESSNER, B.D. (2015), Global incidence of serogroup B invasive meningococcal disease: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 15, (11), 1334–1346.
- STEPHEN, T.L., GRONECK, L., KALKA-MOLL, W.M., (2010), The Modulation of Adaptive Immune Responses by Bacterial Zwitterionic Polysaccharides. *International Journal of Microbiology*, 1-12.
- SVENNERHOLM, L. Quantitative Estimation of Sialic Acids. II. A Colorimetric Resorcinol Hydrochloric Acid Method. (1957), *Biochim. Biophys. Acta*, 24, 604-611.
- TAN, A., HILL, D.M.C., HARRISON, O.B., SRIKHANTA, Y.N., JENNINGS, M.P., MAIDEN, M.C.J., SEIB, K.L. (2016), Distribution of the type III DNA methyltransferases modA, modB and modD among *Neisseria meningitidis* genotypes: implications for gene regulation and virulence. *Scientific Reports*, 6, 21015, 1 – 11.
- TAN, L.K.K.; CARLONE, G.M.; BORROW, R. (2010), Advances in the Development of Vaccines against *Neisseria Meningitidis*. *The new England Journal of Medicine*, 362, 1511-1520.
- TERRA, V.S., MILLS, D.C., YATES, L.E., ABOUELHADID, S., CUCCUI, J., WREN, B.W. (2012), Recent developments in bacterial protein glycan coupling technology and glycoconjugate vaccine. *Journal of Medical Microbiology*, 61, 919–926.
- THAYSEN-ANDERSEN, M., JØRGENSEN S. B., WILHELMSSEN, E. S., PETERSEN, J. W., HØJRUP P. (2007), Investigation of the Detoxification Mechanism of Formaldehyde-treated Tetanus Toxin. *Vaccine*, 25, 2213-2217.

- THORSTEINSDÓTTIR, H., SÁENZ, T.W. (2012), Tackling Meningitis in Africa. *Science*, 338, (6114), 1546 – 1547.
- VAN DE BEEK, D., DE GANS, J., SPANJAARD, L., WEISFELT, M., REITSMA, J. B., VERMEULEN, M. (2005), Clinical Features and Prognostic Factors in Adults with Bacterial Meningitis. *N Engl J Med*, 352, (9), 1849-1859.
- VAN REIS, R., GOODRICH E. M., YSON, C. L., FRAUTSCHY, L. N., DZENGELESKI, S., LUTZ, H. (1997), Linear Scale Ultrafiltration. *Biotechnol Bioeng*, 55, n 5, 736-746
- VAN REIS, R.; ZYDNEY, A. (2001), Membrane Separations in Biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, p. 4.
- VERA-CALDERÓN, L. E., FERREIRA, A. C. M. (2004), Estudo da Economia de Escala na Piscicultura em Tanque-Rede, no Estado de São Paulo. *Informações Econômicas*, 34, (1), 1 - 11.
- VINUESA, C.G., DE LUCAS, C., COOK, M.C. (2001), Clinical implications of the specialised B cell response to polysaccharide encapsulated pathogens. *Postgrad Med J*; 77, 562–569.
- VIPOND, C.; CARE, R.; FEAVERS, I. M. (2012), History of Meningococcal Vaccines and Their Serological Correlates of Protection. *Vaccine*, v. 30S, p. 8.
- WOLFERT, M. A., BOONS, G-J. (2013), Adaptive immune activation: glycosylation does matter. *Nature Chemical Biology*, 9, 776 – 784.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record. (2002), Disponível em:< <http://www.who.int/docstore/wer/pdf/2002/wer7740.pdf> > Acesso em 14 dez. 2014
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1981), Requirements for Meningococcal Polysaccharide Vaccine. Technical Report Series, No. 658: Geneva: World Health Organization.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1990), Requirements for Diphtheria, Tetanus, Pertussis and Combined Vaccines. Technical report series No. 800. Geneva. World Health Organization.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2004), Recommendations for the Production and Control of Meningococcal Group C Conjugate Vaccines. Technical report series, No. 924. Annex 2: Geneva: World Health Organization.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2006), Guidelines on Stability Evaluation of Vaccines, In., pp. 1–28. WHO Press, Geneva, Switzerland.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Serogroup C in the Meningitis Belt: Facing the Challenge. Geneva, 2015 disponível em: http://www.who.int/csr/disease/meningococcal/Facing_NmC_Epidemics_Meningitis_Belt.pdf?ua=1&ua=1 >Acesso em 17/07/2016.

ZOLLINGER, W. D., MANDRELL, R. E. (1983), Importance of complement source in bactericidal activity of human antibody and murine monoclonal antibody to meningococcal group B polysaccharide. *Infect Immun.*, 40, (1), 257-264.

ANEXOS

ANEXO 1 – ARTIGO

BASTOS, R. C., SOUZA, I. M., SILVA, M. N., SILVA, F. P., FIGUEIRA, E; S., LEAL, M. L., JESSOURON, E., SILVA, J. G., MEDRONHO, R. A., SILVEIRA, I. A. F. B. Brazilian meningococcal C conjugate vaccine: Scaling up studies, *Vaccine*, 33, 4281–4287, 2015. ISSN: 0264-410X. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.097>

ANEXO 2 – PATENTE

JESSOUORUN, E., SILVEIRA, I. A. F. B., BASTOS, R. C., FRASCH, C. E., LEE, C. H. Process for preparing polysaccharide-protein conjugate vaccines, Patente: n°. US 9173931, 2015. Concedida em 03/11/2015.