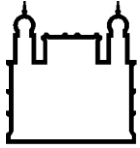


**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**PESQUISA QUALITATIVA DOS REQUERIMENTOS FUNDAMENTAIS
PARA A TRANSFERÊNCIA, REGISTRO SANITÁRIO,
ESTABELECIMENTO E PARÂMETROS DE ESTABILIDADE DE
BANCOS DE CÉLULAS DE *Escherichia coli* QUE EXPRESSA O
INTERFERON ALFA 2B HUMANO RECOMBINANTE**

LUCIANA DOS SANTOS ALMEIDA

**Rio de Janeiro
2009**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

LUCIANA DOS SANTOS ALMEIDA

**Pesquisa Qualitativa dos Requerimentos Fundamentais para a
Transferência, Registro Sanitário, Estabelecimento e Parâmetros de
Estabilidade de Bancos de Células de *Escherichia coli* que
Expressa o Interferon Alfa 2b Humano Recombinante**

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

**RIO DE JANEIRO
2009**

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

A447

Almeida, Luciana dos Santos

Pesquisa qualitativa dos requerimentos fundamentais para a transferência, registro sanitário, estabelecimento e parâmetros de estabilidade de bancos de células de *Escherichia coli* que expressa o interferon alfa 2b humano recombinante / Luciana dos Santos Almeida. – Rio de Janeiro, 2009.

xvii, 121 f. : il. ; 30 cm.

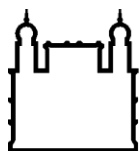
Dissertação (mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2009.

Bibliografia: f. 96-115

1. Banco de células. 2. Interferon alfa 2b humano recombinante. 3. Biofármacos. 4. Regulamentação de banco de células I.Título

CDD 616 079

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em
Imunobiológicos, no Departamento de
Biofármacos, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Elezer
Monte Blanco Lemes



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

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

LUCIANA DOS SANTOS ALMEIDA

**PESQUISA QUALITATIVA DOS REQUERIMENTOS FUNDAMENTAIS
PARA A TRANSFERÊNCIA, REGISTRO SANITÁRIO,
ESTABELECIMENTO E PARÂMETROS DE ESTABILIDADE DE
BANCOS DE CÉLULAS DE *Escherichia coli* QUE EXPRESSA O
INTERFERON ALFA 2B HUMANO RECOMBINANTE**

ORIENTADOR: Prof.^a Dr.^a Elezer Monte Blanco Lemes

Dissertação aprovada em 20/04/2009

Examinadores:

Prof.^a Dr.^a Paula Frassinetti Guimarães de Sá

UNIP/Brasília

Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

USP

Dr.^a Simone Morais da Costa

IOC/Fiocruz

RIO DE JANEIRO
2009

Dedico este trabalho aos meus pais, meus exemplos de vida e “anjos da guarda”.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e por estar sempre me direcionando aos melhores caminhos.

A FIOCRUZ/Bio-Manguinhos, pela oportunidade que me foi concedida.

À Dra. Elezer, por ter aceitado ser minha orientadora, por ter tido toda a paciência em me ensinar o “bê-á-bá” da biologia molecular e por ter me direcionado pelos caminhos mais importantes deste trabalho.

À Maria da Luz, Vice-Diretora de Qualidade de Bio-Manguinhos, pela ajuda no envio dos questionários.

Aos meus pais pelo apoio e amor incondicional e pela compreensão nas minhas ausências familiares.

À Dra. Maria Lúcia Dalgo pelo exemplo de profissionalismo e pelo apoio, amor e sabedoria que me proporciona na minha caminhada profissional.

Ao Adriano Rodrigues, meu estatístico de plantão, por ter me ajudado a analisar os resultados e por compartilhar tão generosamente seu conhecimento. E a sua esposa e minha grande amiga Patrícia Pimenta pelo incentivo e lealdade que sempre me proporcionou.

Ao Miguel Angel de la O Herrera, pela ajuda nas traduções que precisei realizar no decorrer do trabalho.

Ao Marco Alberto Medeiros e João Pedro Santos, pela colaboração no pré-teste do questionário.

À Dra. Sheila Farage, pelo entusiasmo desprendido na coordenação deste curso e por procurar sempre administrar da melhor forma possível as necessidades surgidas no decorrer desta jornada.

À Zaíra Antunes Prado, pela força, carinho e auxílio.

Aos meus amigos do Instituto Vital Brazil pelo espírito de encorajamento e a minha amiga Raquel Bueno, por me incentivar a me inscrever no Mestrado e por me estimular a seguir adiante.

À Andréa e ao César Ayrosa, pelas caronas diárias até Bio-Manguinhos e pelo incentivo e espírito de descontração.

Aos meus irmãos e cunhadas pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Aos amigos do Mestrado Profissional, pelo espírito de companheirismo e colaboração e pela alegria transmitida.

“Escolha um trabalho que ame e não terás que trabalhar um único dia em sua vida”.

Confúcio

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 Introdução	1
1.1 Biotecnologia	1
1.1.1 Histórico da biotecnologia.....	1
1.1.2 Definição de biotecnologia.....	4
1.1.3 Importância da biotecnologia e principais aplicações na área de saúde.....	5
1.1.4 Biotecnologia e biossegurança.....	5
1.1.5 Estratégia Nacional de Biotecnologia.....	6
1.2 Biofármacos	10
1.2.1 Definição e exemplos de biofármacos.....	10
1.2.2 O processo de fabricação de biofármacos.....	11
1.2.3 O mercado de biofármacos.....	15
1.3 Biogênicos e biossimilares	19
1.3.1 Imunogenicidade.....	22
1.3.2 Marcos regulatórios de biogênicos/biossimilares.....	23
1.4 A Transferência de Tecnologia	32
1.5 Interferons	34
1.5.1 Interferon- α	35
1.5.2 Interferon- β	39
1.5.3 Interferon- γ	39
1.6 A Hepatite C	40
1.7 Banco de Células	41
1.7.1 Histórico dos aspectos regulatórios do Banco de Células.....	41
1.7.2 A importância dos parâmetros de controle.....	44
1.7.3 Definição do Sistema de Banco de Células.....	45
1.7.4 Tipos de células usadas na fabricação de produtos biológicos/biotecnológicos.....	46
1.7.5 Tipos de vetores de expressão empregados na tecnologia do ADN recombinante.....	52
1.7.6 Criação dos Bancos de Células Recombinantes.....	54
1.7.7 Controle dos Bancos de Células.....	55
1.8 Justificativa	59
2 Objetivos	61
2.1 Objetivo Geral	61
2.2 Objetivos Específicos	61
3 Metodologia	63
3.1 1ª Fase: Levantamento bibliográfico preliminar	64
3.2 2ª Fase: Questionário	64
3.2.1 Etapas para elaboração do questionário.....	64
3.2.2 Envio dos questionários.....	67
3.3 3ª Fase: Análise dos resultados	68
3.3.1 Tabulação dos dados.....	68
3.3.2 Tratamento dos dados.....	69
3.4 4ª Fase: A pesquisa qualitativa e o caráter bibliográfico-descritivo	70

3.5	5ª Fase: Os Requerimentos dos Bancos de Células no contexto dos biogênicos/biossimilares.....	71
4	Resultados e Discussão.....	73
4.1	1ª etapa: Retorno dos questionários.....	73
4.2	2ª etapa: Tratamento dos dados e Seleção de itens.....	74
4.2.1	Distribuição de frequência simples das variáveis.....	74
4.2.2	Seleção de itens.....	77
4.2.3	Análise dos resultados obtidos.....	78
4.3	3ª etapa: Descrição dos Requerimentos para os Bancos de Células.....	79
4.3.1	1ª Parte: A coleta de informações.....	80
4.3.2	2ª Parte: Orientações descritivas.....	82
4.4	4ª etapa: Biogênicos/Biossimilares e Requisitos para os Bancos de Células....	92
5	Conclusões/Perspectivas.....	94
6	Referências Bibliográficas.....	96
VIII	Anexos.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido Desoxirribonucléico
AEMPS	<i>Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios</i> – Agência Espanhola de Medicamentos e Produtos Sanitários
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANMAT	<i>Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica</i> – Administração Nacional de Medicamentos, Alimentos e Tecnologia
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARN	Ácido Ribonucléico
ATP	Adenosina Trifosfato
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i> – Cromossomo Artificial de Bactéria
BCM	Banco de Células Mestre
BCT	Banco de Célula de Trabalho
BGTD	<i>Biologics and Genetic Therapies Directorate</i> – Diretoria de Terapias Genéticas e Produtos Biológicos
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i> – Rins de Hamster Jovem
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> – Grupos de Diferenciação
CECMED	<i>Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos</i> Centro para o Controle Estatal da Qualidade de Medicamentos
CHMP	<i>Committee for Medicinal Products for Human Use</i> – Comitê de Medicamentos de Uso Humano
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> – Célula de Hamster Chinês
CIGB	<i>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología</i> – Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia
CIPBR	Centro Integrado de Protótipos, Biofármacos e Reativos
CPMP	<i>Committee for Proprietary Medicinal Products</i> – Comitê para Propriedade de Produtos Medicinais
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DCI	Denominação Comum Internacional
DIGEMID	<i>Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas</i> – Direção Geral de Medicamentos, Insumos e Drogas
DRCPPA	<i>Departamento de Regulación y Control de Productos Farmacéuticos y Afines</i> – Departamento de Regulação e Controle de Produtos Farmacêuticos e Afins
DTP	<i>Diphtheria-Tetanus-Pertussis vaccine</i> – Vacina contra Difteria/Tétano/Coqueluche
DTPa	<i>Diphtheria-Tetanus-Pertussis acellular vaccine</i> – Vacina contra Difteria/Tétano/Coqueluche (<i>pertussis</i> acelular)
EEC	<i>European Economic Community</i> – Comunidade Econômica Européia
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

EMEA	<i>European Medicines Agency</i> – Agência Europeia de Medicamentos
EPO	Eritropoetina
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> – Administração de Alimentos e Medicamentos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FIFARMA	<i>Federación Latinoamericana de la Industria Farmacéutica</i> – Federação Latinoamericana da Indústria Farmacêutica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FRhL	Fetal Rhesus Lung – Pulmão Fetal de Macaco <i>Rhesus</i>
FSH	<i>Follicle-Stimulating Hormone</i> – Hormônio Folículo Estimulante
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i> – Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos
GH	<i>Growth Hormone</i> – Hormônio do Crescimento
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> – Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i> – Geralmente Reconhecido Como Seguro
GSK	<i>GlaxoSmithKline</i>
HAV	<i>Hepatitis A Virus</i> – Vírus da Hepatite A
HB	Hepatite B
HBSAg	Antígeno de Superfície da Hepatite B
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i> – Vírus da Hepatite B
HC	<i>Health Canadá</i> – Saúde Canadá
HCG	<i>Human Chorionic Gonadotrofine</i> – Gonadotrofina Coriônica Humana
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> – Vírus da Hepatite C
HeLa	<i>Henrietta Lacks</i>
Hib	<i>Haemophilus influenzae type b</i> – <i>Haemophilus influenzae</i> do tipo b
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> – Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> – Vírus do Papiloma Humano
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> – Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Medicamentos para Uso Humano
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina

IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor - 1</i> – Fator do Crescimento do Tipo Insulina 1
IL	Interleucina
INHRR	<i>Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel</i> – Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel
INVIMA	<i>Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos</i> – Instituto Nacional de Vigilância de Medicamentos e Alimentos
ISPCH	<i>Instituto de Salud Pública de Chile</i> – Instituto de Saúde Pública do Chile
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> – Hormônio Luteinizante
LH-RH	<i>Luteinizing Hormone-Releasing Hormone</i> – Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante
LTDA	Limitada
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i> – rim de cão Madin-Darby
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> – Complexo Maior de Histocompatibilidade
MMR	<i>Measles, Mumps, and Rubella</i> – Vacina contra Sarampo, Caxumba e Rubéola
MSPAS	<i>Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de la Republica de Guatemala</i> – Ministério da Saúde Pública e Assistência Social da República da Guatemala
NIHS	<i>National Institute of Health Sciences</i> – Instituto Nacional de Ciências da Saúde do Japão
NK	<i>Natural Killer</i>
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i> – Fase de Leitura Aberta
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PEG	Polietilenoglicol
PHSA	<i>Public Health Service Act</i> – Lei do Serviço de Saúde Pública
PMSG	<i>Pregnant Mare Serum Gonadotrofina</i> – Gonadotrofina Sérica de Égua Prenhe
PRI	<i>Partido Revolucionario Institucional</i> – Partido Revolucionário Institucional
pUC	<i>plasmid Universal Cloning</i> – plasmídeo de Clonagem Universal
PUR	Poliuretano de Ultra Resistência
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSCC	<i>Roche Molecular Systems Culture Collection</i> – Coleção de Sistemas de Cultura Molecular Roche

SUS	Sistema Único de Saúde
TGA	<i>Therapeutic Goods Administration</i> – Administração de Produtos Terapêuticos da Austrália
TPO	Tireoperoxidase
UE	União Européia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UNICAMP	Universidade de Campinas
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> – Farmacopéia dos Estados Unidos
USP	Universidade de São Paulo
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial de Saúde
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosomes</i> – Cromossomos Artificiais de Leveduras

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Principais marcos históricos no avanço científico e tecnológico da biotecnologia	4
Tabela 1.2 – Alvos estratégicos para a saúde no Brasil abordados no Fórum de Competitividade de Biotecnologia	8
Tabela 1.3 – Alguns biofármacos aprovados em 2007 e 2006 nos EUA e União Européia	11
Tabela 1.4 – Mercado de biofármacos e fármacos no mundo (2000-2005)	15
Tabela 1.5 – Valor global de vendas em 2003 de alguns biofármacos selecionados	16
Tabela 1.6 – Total de vendas das principais empresas biofarmacêuticas no primeiro bimestre do período de 2000 a 2006	18
Tabela 1.7 – Associações entre empresas farmacêuticas e biotecnológicas	19
Tabela 1.8 – Comparação do peso molecular de farmoquímicos sintéticos e biofármacos	20
Tabela 1.9 – Fatores que podem afetar a imunogenicidade de proteínas terapêuticas	22
Tabela 1.10 – Relação dos interferons aprovados e indicações terapêuticas	36
Tabela 1.11 – Relação dos interferons alfa 2a e 2b registrados na ANVISA	37
Tabela 1.12 – Principais indicações terapêuticas aprovadas para o interferon alfa 2b humano recombinante	38
Tabela 1.13 – Relação dos principais documentos criados pelas Autoridades Regulatórias relacionadas ao Controle de Banco de Células	44
Tabela 1.14 – Exemplos de produtos biológicos/biotecnológicos e os tipos de células usadas em sua fabricação	52
Tabela 1.15 – Principais testes/requerimentos a serem aplicados no Sistema de Banco de Células utilizados na produção de vacinas	56
Tabela 1.16 – Principais testes/requerimentos a serem aplicados na célula hospedeira e no vetor de expressão utilizados na produção de proteínas recombinantes	57
Tabela 1.17 – Principais testes/requerimentos a serem aplicados no Sistema de Banco de Células utilizados na produção de proteínas recombinantes	58
Tabela 3.1 – Relação das Agências Regulatórias contempladas para preencher o questionário	68
Tabela 3.2 – Relação das Agências Regulatórias que serviram como fonte de coleta de dados	72
Tabela 4.1 – Distribuição de frequência simples das variáveis do Bloco A	74
Tabela 4.2 – Distribuição de frequência simples das variáveis do Bloco B	75
Tabela 4.3 – Distribuição de frequência simples das variáveis do Bloco C	75

Tabela 4.4 – Distribuição de frequência simples das variáveis do Bloco D	75
Tabela 4.5 – Distribuição de frequência simples das variáveis do Bloco E	76
Tabela 4.6 – Distribuição de frequência simples das variáveis do Bloco F	76
Tabela 4.7 – Distribuição de frequência simples das variáveis do Bloco G	76
Tabela 4.8 – Distribuição de frequência simples das variáveis do Bloco H	76
Tabela 4.9 – Distribuição de frequência simples das variáveis do Bloco I	76
Tabela 4.10 – Distribuição de frequência simples das variáveis do Bloco J	77
Tabela 4.11 – Marcadores genotípicos de <i>E. coli</i>	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Número de biofármacos aprovados pelo FDA no período de 1982 a 2008	17
Figura 1.2 – Ilustração comparativa de uma molécula biológica (A) e química (B)	20
Figura 1.3 – Interferon alfa 2b humano recombinante	38
Figura 1.4 – Relação custo/rendimento em diferentes sistemas de expressão	51
Figura 4.1 – Gráfico representativo da percentagem de variáveis assinaladas por bloco do questionário	78
Figura 4.2 – Gráfico representativo da percentagem de variáveis assinaladas pelos respondentes	79
Figura 4.3 – Representação do plaqueamento em meio sólido	84
Figura 4.4 – Curva de crescimento bacteriano	85

RESUMO

A Era da Engenharia Genética ou Biotecnologia Moderna, que teve início nos anos 1970, encontra diversas aplicações em vários segmentos de atividades, dentre eles a saúde e alimentos. Na área de saúde têm-se o destaque para a indústria de biofármacos, que tem tido um crescimento acelerado nos últimos anos, pelo fato desses novos medicamentos serem voltados para a terapêutica de doenças que aflige uma parcela considerável da população mundial. Como exemplo pode-se citar o interferon alfa 2b humano recombinante, que faz parte do Programa de Medicamentos de Dispensação Excepcional do Ministério da Saúde, e está incluído no Protocolo Clínico para Hepatite C. Como forma de atender à demanda da população brasileira quanto às necessidades desse biofármaco, Bio-Manguinhos assinou em 2004 um Contrato de Transferência de Tecnologia com o Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba (CIGB), com o propósito de nacionalizar a produção do referido medicamento. Este trabalho teve como objetivo realizar uma pesquisa qualitativa para elencar os Requerimentos Fundamentais para Transferência, Registro Sanitário, Estabelecimento e Parâmetros de Estabilidade de Bancos de Células de *E. coli* que expressa o interferon alfa 2b humano recombinante. Foi elaborado um questionário, que serviu como fonte de coleta de dados, que foi enviado por e-mail a diversas Agências Regulatórias e pesquisadores da academia científica. Esse questionário teve como objetivo elencar os principais testes/requisitos que os Bancos de Células devem apresentar. O índice geral de retorno dos questionários foi igual a 39,3%, sendo que o índice de respostas dos pesquisadores foi igual a 62,5% e das Agências Regulatórias igual a 8,3%. O índice de marcação dos itens ficou em torno de 80% e ficou estabelecido que aqueles itens que tiveram um índice maior que 50% seriam os requerimentos indispensáveis a serem descritos. Não foi possível validar o trabalho pelo índice de retorno dos questionários por parte das Agências Regulatórias. Porém, acredita-se que aquilo que foi descrito pode servir como um passo inicial na elaboração de uma norma específica relativa ao Controle de Banco de Células de procariotos, pois representa a opinião de experientes pesquisadores da comunidade científica. E ainda contribuir nos requisitos específicos que serão futuramente estabelecidos pela ANVISA, relativos ao registro de um produto biogênico/biossimilar.

ABSTRACT

The Age of Genetic Engineering and Modern Biotechnology, which began in the 1970s, has had several applications in various business activities, among of which are health and food. In health area the emphasis has been on the biopharmaceutical industry that has had a rapid growth in recent years, because these new drugs are aimed towards the therapy of diseases that afflict a significant part of the world's population. As an example, it can be mentioned the recombinant human interferon-alpha 2b, which is part of the Drugs of Exceptional Dispensation Program of the Ministry of Health, also is it in the Clinical Protocol for Hepatitis C. In order to meet the demand of the Brazilian population for this drug, in 2004, Bio-Manguinhos signed an Agreement on Technology Transfer with the Center for Genetic and Biotechnology Engineering of Cuba (CIGB), so that this medicine could be produced at national level. This study aimed at doing a qualitative research to list the Fundamental Requirements for Transfer, Registration, Establishment and Stability Parameters of Banks of *E. coli* Cells expressing recombinant human interferon-alpha 2b. A questionnaire was compiled for data collection. It was sent by e-mail to a number of regulatory agencies and researchers of the scientific academy. This questionnaire aimed at listing the main tests / requirements that banks must submit Cells. The overall rate of return of questionnaires was 39.3%, and the rate of responses from researchers was 62.5% and from regulatory agencies was 8.3%. The rate of items marked was around 80%, then it was agreed that those items that had a rate higher than 50% would be the essential requirements to be described. The work was not validated due to the low rate of return of questionnaires from the Regulatory Agencies. However, it is believed that what was described can serve as the first step in developing a specific standard relating to control the Banks of Prokaryotes Cells, since it represents the expertise opinion of researchers in the scientific community. Yet, it contributes to the specific requirements that shall eventually be established by ANVISA for the registration of a biogeneric / biosimilar product.

1 Introdução

1.1 Biotecnologia

1.1.1 Histórico da biotecnologia

O uso da biotecnologia teve seu início com os processos fermentativos, cuja utilização transcende, em muito, o início da era Cristã, confundindo-se com a própria humanidade (Villen, 2008).

A produção de bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais foi primeiramente relatada pelos egípcios, no ano de 4.000 a.C. Mais tarde, por volta de 3.000 a.C encontram-se registros de que os egípcios antigos, assírios, sumérios e babilônios conservavam seus alimentos como o leite, frutas e vegetais utilizando a fermentação ácida (Hulse, 2004).

No ano de 2.000 a.C, os egípcios passaram a empregar a fermentação também para a fabricação de pão (Villen, 2008) e foram encontradas descrições chinesas do ano 1000 a.C. sobre miso¹ feito com molho de soja (Oliveira, 2007). Sabe-se que outras aplicações, como a produção de iogurtes e queijos são utilizadas pelo homem desde a antigüidade.

O valor medicinal de produtos fermentados é conhecido há muito tempo (Hulse, 2004). Os chineses usavam coalho de feijão-soja mofado para curar infecções de pele há 3.000 anos e os índios da América Central tratavam feridas infectadas com fungos (Oliveira, 2007).

Entretanto, a fermentação era um processo puramente empírico. As descobertas seguintes é que foram abrindo caminho para o verdadeiro entendimento do processo fermentativo e para o desenvolvimento da biotecnologia.

¹ Miso é uma tradicional comida da culinária japonesa feita a partir da fermentação de arroz, cevada e soja com sal.

Robert Hooke em 1665 foi quem descobriu as células, em um pedaço de cortiça. Ainda no século XVII, Anton von Leeuwenhoek, nos Países Baixos, construiu um microscópio que fornecia um aumento de 30 vezes e assim, conseguiu visualizar pela primeira vez os microorganismos (Hulse, 2004; Lederberg, 2000).

Em 1796 Edward Jenner, considerado o primeiro imunologista, inicia os primeiros trabalhos experimentais de vacinação. O primeiro deles envolveu a remoção dos fluidos de uma lesão de *cowpox* da mão de Sarah Nelmes e posterior inoculação no braço do jovem James Phipps (Jenner, 1800).

O processo fermentativo deixou de ser um processo puramente químico e passou a ser bioquímico, apenas quando Louis Pasteur, na França, em 1860, provou que os microorganismos eram os responsáveis pela fermentação e não o resultado da mesma (Hulse, 2004; Lederberg, 2000). Foi ele também quem esclareceu que cada tipo de fermentação era realizado por um microorganismo específico e que estes podiam viver e se reproduzir na ausência de ar.

No final do século XIX o monge Gregor Mendel, que trabalhava em Brno, República Tcheca, conseguiu desvendar os segredos da hereditariedade. Os cruzamentos de ervilhas com diferentes cores de flores, realizados por Mendel, em 1865, criaram uma nova ciência: a genética (Bateson, 1909).

Duas outras contribuições dadas por Pasteur marcam esse histórico, uma ocorreu em 1870, quando ele faz a primeira atenuação de uma bactéria viva, a *Pasteurella multocida*, criando assim a vacina contra a cólera das aves (Atkinson *et al.*, 2009; Schwartz, 2001). A outra ocorreu em 1884 e se refere ao desenvolvimento da vacina contra a raiva em cães, que se baseia no princípio da inoculação de vírus atenuados. A vacina foi administrada pela primeira vez em 1885 num ser humano, o jovem Joseph Meister, atacado por um cão raivoso (Atkinson *et al.*, 2009; Lederberg, 2000; Schwartz, 2001).

Voltando ao enfoque da fermentação, em 1897, o químico alemão Eduard Buchner demonstrou, pela utilização de leveduras maceradas, que a fermentação era apenas uma seqüência de reações químicas, podendo ocorrer fora de células vivas. Foi este estudo que revelou as enzimas e permitiu a compreensão do metabolismo celular em toda sua globalidade (Buchner, 1897).

O marco de referência da fermentação industrial começou com a produção de antibióticos. A partir de 1929, com a descoberta acidental da penicilina por Alexander Fleming, muitos tipos de antibióticos foram desenvolvidos no mundo.

Em 1930 os bioquímicos alemães Embden e Meyerhof desvendaram as etapas bioquímicas do processo fermentativo, e hoje em dia a seqüência é também conhecida por cadeia de Embden-Meyerhof.

O ano de 1953 foi um marco para a genética, com a descoberta da estrutura helicoidal do Ácido Desoxirribonucléico (ADN) por dois cientistas da Universidade de Cambridge (Inglaterra): o americano James Watson e o inglês Francis Crick. Eles demonstraram que a dupla hélice se constituía de duas fitas pareadas, cada uma com sua seqüência de nucleotídeos complementar à outra. Isto é, na posição onde havia uma Adenina, aparecia uma Timina na segunda, e aonde havia uma Guanina, aparecia uma Citosina, e vice-versa (Watson e Crick, 1953).

A chamada Era da Engenharia Genética ou da Biotecnologia Moderna começou com a primeira clonagem de um gene, em 1973, quando os cientistas Hebert Boyer e Stanley Cohen na Califórnia construíram um gene com uma parte do ADN bacteriano e parte do ADN do sapo *Xenopus laevis* (Morrow, *et al.*, 1974). A experiência destes pesquisadores abriu as portas para uma nova forma de se fazer o melhoramento genético e desenvolvimento de variedades.

A partir daí, novas descobertas foram acontecendo: em 1975 a invenção da tecnologia de hibridoma (Orsenigo, 1989; Wade, 1980); em 1982 a primeira vacina utilizando a tecnologia de ADN recombinante (para *colibacillosis*) foi aprovada na Europa. Em 1982 a empresa Eli Lilly lança o primeiro biofármaco para uso humano: uma insulina recombinante, comercializada com o nome de Humulin[®], a qual foi aprovada primeiramente nos Estados Unidos e Reino Unido.

A Tabela 1.1 mostra os principais marcos históricos no avanço científico e tecnológico da biotecnologia, de acordo com as referências citadas.

Tabela 1.1 Principais marcos históricos no avanço científico e tecnológico da biotecnologia

Período	Acontecimento
4.000 a.C	Egípcios produzem bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais
3.000 a.C	Diversos povos da antigüidade conservavam alimentos pela fermentação ácida
2.000 a.C	Egípcios passar a usar a fermentação para fabricação de pão
1.000 a.C	Chineses preparam alimentos fazendo uso da fermentação
1665	Robert Hooke descobre as células
1675	Anton Von Leeuwenhoek constrói o primeiro microscópio
1796	Jenner inicia os trabalhos experimentais de vacinação
1860	Pasteur prova que os microorganismos são a verdadeira causa da fermentação
1865	Gregor Mendel formula as Leis da Hereditariedade, criando a genética
1870	Pasteur cria a primeira vacina bacteriana (<i>Pasteurella multocida</i>)
1884	Pasteur desenvolve a primeira vacina contra a raiva
1897	Eduard Buchner demonstrou que a fermentação pode ocorrer fora das células vivas
1929	Marco de referência da fermentação industrial
1930	Embden e Meyerhof desvendam as etapas bioquímicas do processo fermentativo
1953	Watson e Crick descobrem a estrutura helicoidal do ADN
1973	Boyer e Cohen clonam o primeiro gene
1975	Criação do primeiro hibridoma
1982	Aprovação na Europa da primeira vacina de ADN recombinante
1982	Lançamento pela Eli Lilly do primeiro biofármaco para uso humano, a insulina

Fonte: Confecção própria

1.1.2 Definição de biotecnologia

O termo biotecnologia foi primeiramente usado em 1919 pelo húngaro e economista agrícola Karl Ereky ao se referir a “todas as linhas de trabalho pelos quais os produtos são fabricados pelas matérias-primas com a ajuda de organismos vivos” (Bud, 1989). Mais tarde, surgiram várias definições para este termo, como a de que se trata da aplicação de princípios científicos e de engenharia no processamento de materiais por agentes biológicos, ou da aplicação industrial de organismos, sistemas e componentes biológicos para produção de bens e serviços de valor agregado (Fardelone e Branchi, 2006).

Porém, a definição mais completa foi estabelecida em 1992 pela Convenção em Diversidade Biológica, que conceitua biotecnologia como “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para criação ou modificação de produtos ou processos para uso específico” (FAO, 2000).

Esta definição foi mais tarde ratificada por 168 países e aceita pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação – *Food and*

Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e Organização Mundial de Saúde – *World Health Organization* (WHO).

1.1.3 Importância da biotecnologia e principais aplicações na área de saúde

A importância da biotecnologia está em seu grande potencial de gerar inovações tecnológicas em diversos setores, principalmente nos setores farmacêutico, químico, agroindustrial e ambiental (McCoy, 2004; Scott, 2004; Walsh, 2005).

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

No setor farmacêutico também existem os *kits* para diagnóstico, como os de detecção de gravidez, patologias, entre outros (Butler, 2005; Mullin, 2004; Storck, 2004; Werner, 2004).

A biotecnologia também utiliza microorganismos, como fungos, leveduras e bactérias, na obtenção de princípios ativos e *building blocks*² para a síntese de fármacos quirais (Antunes, 2005; Krieger *et al.*, 2004, e Rodrigues *et al.*, 2004).

1.1.4 Biotecnologia e biossegurança

Os novos desenvolvimentos da biotecnologia vêm representando mudança de paradigma na ciência contemporânea, conferindo ao componente biológico papel crucial no processo de inovação tecnológica e de destaque com relação a outras tecnologias de ponta (Possas, 2004).

Nesse novo contexto, a biossegurança de OGM (Organismos Geneticamente Modificados) emergiu como um conceito fundamental na regulação da atividade científica, constituindo campo específico do conhecimento, relacionado à antecipação, identificação, gestão, avaliação e comunicação dos riscos resultantes da biotecnologia (Possas, 2004).

² *Building blocks* são definidos como unidades de construção ou composição. Por exemplo, os aminoácidos são considerados os *building blocks* das proteínas.

Questões de biossegurança e bioética, relacionadas às implicações para a saúde humana e o meio ambiente da atividade científica nesse campo, têm suscitado controvérsias e ainda constituem importante desafio no plano internacional, em que pese os importantes avanços da ciência nesta área e a ampliação do debate por organizações diversas da sociedade (Possas, 2004).

Nesse ambiente internacional de crescente valorização da dimensão regulatória e normativa da pesquisa em biotecnologia, os governos, as distintas comunidades científicas e as sociedades envolvidas, têm buscado criar procedimentos que permitam harmonizar, no plano internacional, o tratamento dessas diferentes ordens de questão (Possas, 2004).

Busca-se, através da harmonização, assegurar, de um lado, a proteção dos direitos do cidadão, a melhoria da qualidade de vida das populações envolvidas e a proteção do meio ambiente; de outro, a criação de condições que, no acirrado processo de competição internacional, viabilizem parcerias estratégicas e assegurem a efetiva integração econômica e social (Possas, 2004).

Em 2005, através da lei nº 11.105, foi criada no Brasil a CTNBio, que é uma instância colegiada, cuja finalidade é prestar apoio técnico consultivo e assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a OGM, bem como no estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados (CTNBio, 2009).

A CTNBio, através de sua sub-Comissão de Saúde Humana e Animal avalia pesquisas, processos e produtos resultantes do desenvolvimento de fármacos de alto valor agregado, anticorpos monoclonais, interferons, terapias anticâncer, proteínas, hormônio de crescimento, insulina, fatores de coagulação e novas vacinas recombinantes para prevenção de doenças diversas (HIV/AIDS, Hepatites e outras).

1.1.5 Estratégia Nacional de Biotecnologia

A construção da Estratégia Nacional de Biotecnologia resultou dos trabalhos realizados no âmbito do Fórum de Competitividade de Biotecnologia, instalado no final de 2004, contando com a coordenação conjunta do Ministério do

Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Ministério da Saúde, Ministério da Ciência e Tecnologia e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e com a participação de diversos representantes do setor empresarial, do Governo Federal, da Academia e da Sociedade Civil (Brasil, 2006).

A Estratégia tem por objetivo aumentar a eficiência econômica e estimular o desenvolvimento e a difusão de tecnologias com maior potencial de indução do nível de atividade, de integração e competitividade no comércio internacional. Ou seja, aumentar a eficiência da estrutura produtiva, aumentar a capacidade de inovação, de geração de negócios e de absorção de tecnologias das empresas brasileiras e expandir exportações (Brasil, 2006).

Para tanto, estabelece objetivos específicos, ações estratégicas e custos estimados para as áreas priorizadas no âmbito do Fórum – saúde humana, agropecuária, biotecnologia industrial, recursos humanos/infra-estrutura, investimentos e marcos regulatórios (Brasil, 2006).

No contexto da saúde humana o objetivo é “promover ações com vistas ao estabelecimento de ambiente adequado para o desenvolvimento de produtos e processos inovadores no segmento da saúde, de forma a atender as demandas de saúde pública, estimular o aumento da eficiência da estrutura produtiva nacional, a capacidade de inovação das empresas brasileiras e a expansão das exportações” (Brasil, 2006).

A interação com o setor empresarial, academia, laboratórios públicos e institutos de pesquisa permitiu identificar os gargalos e as oportunidades para a bioindústria brasileira (Brasil, 2006). Na tabela 1.2 estão listados os principais alvos estratégicos para a área de saúde que foram abordados no Fórum de Competitividade de Biotecnologia, de acordo com a referência citada.

Além dos itens listados na tabela 1.2, o Fórum de Competitividade também estimula na área de saúde o desenvolvimento de projetos e produtos nas áreas de genômica, pós-genômica, proteômica, nanotecnologia, células-tronco e neurociência.

Tabela 1.2 Alvos estratégicos para a saúde no Brasil abordados no Fórum de Competitividade de Biotecnologia

Produtos biotecnológicos	Vacinas	Hemoderivados	Biomateriais	Kits diagnósticos
Hormônio do crescimento humano e bovino (somatotrofina)	Pentavalente (DTP/HB+Hib)	Plasma	Stents e stents recobertos para cardiologia	Hepatite B
Insulina humana	Raiva em cultura celular	Fatores da coagulação VIII e IX	Próteses totais de quadril para ortopedia	Hepatite C
Calcitonina	Meningite meningocócica, sorogrupo C, conjugada	Albumina	Materiais para enxertos e scaffolds	Toxoplasmose
LH-RH Somatostatina	Leishmaniose canina Vacina ADN para uso terapêutico da tuberculose (câncer de pescoço e cabeça)	Imunoglobulinas Complexo protrombínico		HIV/AIDS Rubéola
Gonadotrofina coriônica (HCG) e sérica (PMSG)	Raiva para uso canino em cultura de tecidos	Soros hiperimunes		
LH – Hormônio luteinizante bovino e suíno	Gripe pandêmica – aviária			
FSH – Hormônio folículo estimulante humano e bovino	Meningite meningocócica, sorogrupo B+C conjugada			
IGF-1 (Fator do crescimento do tipo insulina 1)	Febre amarela inativada			
Interferon alfa	<i>Streptococcus pneumoniae</i>			
Interferon beta	HPV			
Toxina botulínica	Poliomelite inativada			
Eritropoetina	DTPa (componente pertussis acelular)			
Glucagon	MMR/Varicela			
Antibióticos, Antifúngicos, antitumorais, dentre outros, obtidos por rota biotecnológica	Hepatite A			
	Meningite meningocócica sorogrupo B			
	Rotavírus			
	Meningite A conjugada			
	DTPa/HB+Hib			
	Meningite C conj + Hib + pneumococos			
	HBV/HAV			
	Leishmaniose			
	Outras com prazo indefinido: malária, dengue, HIV/AIDS, Leptospirose, Hepatite C, Schistosoma, Varíola, Tuberculose			

Fonte: Confecção própria

Para se atingir os objetivos propostos, foram elencadas ações que promovam e estimulem:

- a) A absorção e transferência de tecnologia do exterior;
- b) A geração de novos métodos e processos de produção;
- c) O desenvolvimento de ambiente cooperativo entre governo e indústria;
- d) A cooperação entre empresas no Brasil e exterior;
- e) A definição de modelos de gestão mais flexíveis e adequados à realidade das inovações tecnológicas para os laboratórios nacionais;
- f) O apoio à comunidade científica;
- g) A pesquisa, desenvolvimento e inovação de produtos;
- h) O investimento no aperfeiçoamento da infra-estrutura dos laboratórios nacionais;
- i) A criação de programas de intercâmbio com órgãos, empresas ou entidades nacionais e estrangeiras, para capacitação científica e desenvolvimento tecnológico;
- j) A criação e manutenção de uma estrutura de garantia da qualidade da matéria-prima, processos, serviços e produtos;
- k) A formação, treinamento e aperfeiçoamento de pessoal necessário ao desenvolvimento das atividades;
- l) A prospecção em patentes;
- m) Critérios para que todos os processos sejam devidamente documentados para atendimento às exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dentre outros (Brasil, 2006).

Considerando os alvos estratégicos para a saúde no Brasil abordados no Fórum de Competitividade de Biotecnologia, Bio-Manguinhos tem um papel fundamental para o atendimento das metas propostas no referido Fórum.

Aqui, convém destacar a tradição que Bio-Manguinhos possui na fabricação de produtos biológicos e do sucesso em Transferência de Tecnologia para esses tipos de produto, somada às *expertises* dos grupos técnicos e à fabricação de produtos biotecnológicos. Neste último grupo podemos inclusive especificar os biofármacos interferon alfa 2b (IFN- α 2b) e eritropoetina alfa (EPO- α) que tiveram sua produção iniciada em 2004, após a assinatura dos acordos de Transferência de Tecnologia com duas instituições cubanas, o que promoveu a construção do Centro Integrado

de Protótipos, Biofármacos e Reativos (CIPBR), um prédio que abrigará em seu andar térreo as plantas de produção segregada desses biofármacos.

1.2 Biofármacos

1.2.1 Definição e exemplos de biofármacos

Diversas são as definições estabelecidas para biofármacos, porém, aquela que foi adotada neste trabalho e que se tornou consenso geral foi instituída por Walsh (2002), que define biofármacos como uma classe de produtos terapêuticos produzidos por técnicas biotecnológicas modernas, como a tecnologia do ADN recombinante ou tecnologia do hibridoma. Na tabela 1.3 são apresentados alguns biofármacos aprovados nos anos de 2007 e 2006, bem como sua respectiva indicação terapêutica.

Tabela 1.3 Alguns biofármacos aprovados em 2007 e 2006 nos EUA e União Européia

Produto	Companhia	Indicação Terapêutica
Abseamed (eritropoetina alfa humana recombinante produzida em células CHO)	Medice Arzneimittel Putter	Anemia associada com falência renal crônica
Binocrit (eritropoetina alfa humana recombinante produzida em células CHO)	Sandoz	Anemia associada com falência renal crônica
Cervarix (proteínas L1 do capsídeo do papilomavírus humano dos tipos 16 e 18, produzido num sistema de baculovírus)	GlaxoSmithKline	Prevenção do câncer cervical
Elaprased (Iduronato-2-sulfatase humano recombinante produzido numa linhagem de células humanas)	Shire Human Genetic Therapies, Inc.	Mucopolissacaridose II (síndrome de Hunter)
Epoetin alfa Hexal (eritropoetina alfa humana recombinante produzida em células CHO)	Hexal Biotech	Anemia associada com falência renal crônica
Icrelex (mecasermina, IGF-1 humano recombinante, produzido em <i>E. coli</i>)	Tercica/Baxter	Tratamento a longo prazo para o retardo do crescimento em crianças com deficiência primária de IGF-1 ou naquelas em que o gene do hormônio é deletado
Lucentis (ranibizumab, um fragmento IgG humanizado produzido em <i>E. coli</i>)	Genentech	Forma neovascular de degeneração macular relacionada à idade
Mircera (metoxi polietilenoglicol-epoetina beta, uma eritropoetina humana recombinante peguilada produzida em células CHO)	Roche	Anemia associada com doença crônica dos rins
Orencia (abatacept, uma proteína de fusão solúvel produzida em linhagem de células de mamíferos)	Bristol-Myers Squibb	Artrite reumatóide
Pergoveris (folitropina/lutropina alfa; uma combinação contendo FSH e LH humano recombinante, ambos produzidos em células CHO)	Serono	Desenvolvimento da estimulação folicular em mulheres com deficiência severa de LH e FSH
Retacrit (epoetina zeta, uma eritropoetina humana recombinante produzida em células CHO)	Hospira Enterprises	Anemia associada com falência renal crônica
Silapo (epoetina zeta, uma eritropoetina humana recombinante produzida em células CHO)	Stada Arzneimittel	Anemia associada com falência renal crônica
Soliris (eculizumab, uma IgG humanizada que se liga à proteína humana C5 do complemento, produzida em linhagem celular de mieloma murino)	Alexion	Hemoglobinúria paroxística noturna
Valtropin (GH humano recombinante produzido em <i>S. cerevisiae</i>)	Biopartners	Retardo do crescimento/deficiência do hormônio do crescimento
Vectibix (panitumumab, um anticorpo monoclonal humano recombinante que se liga ao EGFR humano, produzido em células CHO)	Amgen	Carcinoma colorretal que expressa EGFR

Fonte: Walsh, 2008

1.2.2 O processo de fabricação de biofármacos

Entre todas as propriedades dos organismos vivos, a capacidade de auto-replicação é fundamental. Conter a informação genética significa não somente

armazenar e transmitir ao longo das gerações, mas expressar, ou seja, servir de molde para a síntese de Ácidos Ribonucléicos (ARNs) e alguns desses serem traduzidos nas proteínas correspondentes (Lemes, 2007).

Com o desenvolvimento técnico e de novas abordagens moleculares, vários avanços significativos têm sido obtidos através do isolamento, análise e síntese de seqüência de ADN e genes. Considera-se também a introdução desses ADNs recombinantes em células vivas para o estudo da sua função e dos mecanismos que controlam sua expressão, produção de substâncias úteis para os seres humanos com potencial cada vez maior de inovações e de geração de novos produtos (Lemes, 2007).

A clonagem de genes tem um potencial enorme para o aumento da qualidade de vida e tem gerado novos caminhos para o desenvolvimento econômico. São inúmeros os exemplos em diversas áreas como a produção de vacinas, biofármacos, anticorpos monoclonais entre outros (Lemes, 2007).

De forma geral os passos para a produção de uma molécula recombinante são os seguintes:

a) Isolamento e digestão

A fonte de ADN pode ser: i. todo o ADN de um organismo usado geralmente para isolar um gene específico, ii. ou ADN sintetizado a partir de um molde de ARN pela enzima transcriptase reversa, iii. o ADN sintetizado *in vitro* a partir de nucleotídeos (Berg *et al.*, 2004; Lemes, 2007).

Ressalta-se que se o ADN genômico total for a fonte de ADN, ele será utilizado para que a partir de um par de *primers* (iniciadores) ele possa amplificar o gene de interesse pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (Lemes, 2007).

b) Junção dos fragmentos de ADN a um vetor de expressão pela ação da ADN ligase

Os pequenos elementos genéticos, utilizados para replicar e controlar a expressão dos genes estão contidos nos vetores de expressão. Estes se replicam de forma independente do ADN cromossômico quando inseridos em um microorganismo hospedeiro, porque possuem em sua construção original elementos genéticos independentes (Berg *et al.*, 2004).

Estes vetores são construídos normalmente de forma a permitir a clonagem do ADN estranho, nos locais de restrição cortados no vetor, mas que não afetam a sua replicação. Se o ADN e o vetor forem cortados com a mesma enzima de restrição, então a sua junção pode ocorrer por ação da ADN ligase, pela complementariedade das regiões de cadeia única do ADN chamadas pontas adesivas (Berg *et al.*, 2004; Lemes, 2007).

c) Incorporação em hospedeiros procarióticos

A molécula de ADN recombinante elaborada *in vitro* pode ser introduzida num hospedeiro por transformação da célula ou por infecção da célula com partículas virais, também estas elaboradas *in vitro* (Lemes, 2007; Zaha *et al.*, 2003).

A incorporação do ADN no hospedeiro de forma genérica é feita por técnicas: mecânica - eletroporação, ou química - cloreto de cálcio (Lemes, 2007; Zaha *et al.*, 2003).

Um passo crucial na tecnologia para produção de moléculas recombinantes é encontrar o clone pretendido na mistura de clones transformantes (Berg *et al.*, 2004).

d) Detecção e purificação do clone requerido

Procedimentos especiais são necessários para a detecção do gene clonado na molécula recombinante transformada no hospedeiro. Se o gene é expresso, a presença de uma proteína estranha na célula poderá ser detectada pela sua atividade ou por meio de anticorpos específicos, evidenciando assim a presença deste gene. No entanto, se o gene não é expresso, a sua presença pode ser detectada utilizando sondas específicas de ácidos nucleicos, que pesquisam uma cadeia de ADN complementar (Berg *et al.*, 2004; Lemes, 2007).

e) Criação dos Bancos de Células

Após o isolamento e seleção do clone requerido, estas referidas células são cultivadas em condições e ambientes especiais para formarem o Banco de Células Mestre (BCM), que é estocado com crioprotetor e congelado sob condições específicas. Cada BCM origina, após cultivo sob condições pré-definidas, os Bancos

de Células de Trabalho (BCTs), que são utilizados como o ponto de partida para uma futura produção industrial (ICH, 1995a; ICH, 1995b; Lemes, 2007).

f) Produção de um grande número de células

De forma genérica, o escalonamento da produção envolve uma série de análises e cálculos de capacidade de transferência que tomam como norte a produtividade. No entanto, a etapa de partida para a produção de um grande número de células é realizada por meio de diversos cultivos seriados, partindo-se de um BCT. As células são assim cultivadas sob condições ideais para a produção em grande quantidade da proteína codificada pelo gene clonado (Lemes, 2007).

g) Lise celular e purificação do produto

Após a produção da substância de interesse na etapa de cultivo celular (*upstream processing*), as operações subseqüentes são lise celular (no caso de proteínas intracelulares – ex.: interferon) e purificação do produto (*downstream processing*).

O rompimento celular pode ser físico, enzimático ou químico (Lemes, 2007).

Os métodos físicos são freqüentemente preferenciais considerando as limitações econômicas e operacionais dos outros dois métodos. Como exemplo, pode ser citado o rompimento celular utilizando-se esferas de vidro. Neste caso, o rompimento será causado pelas forças de atrito no processo de moagem no qual as pequenas esferas agem como abrasivos (Shirgaonkar *et al.*, 1998). Outros exemplos de métodos físicos são congelamento/descongelamento rápido, a sonicação e alta pressão.

No rompimento enzimático pode ser utilizado, por exemplo, a enzima lisozima, que catalisa a degradação da parede celular (Lemes, 2007).

No método químico são adicionadas substâncias que alteram o gradiente de concentração do meio no qual se encontram a célula, provocando a lise celular devido o processo de osmose (Lemes, 2007).

Na etapa de purificação, diferentes técnicas são utilizadas para se chegar à proteína recombinante com elevado grau de pureza, destacando-se as cromatografias de afinidade, gel filtração, troca iônica e fase reversa (Berg *et al.*, 2004; Lemes, 2007).

1.2.3 O mercado de biofármacos

A indústria farmacêutica apresenta uma variedade de produtos, como químicos, biológicos, naturais e biotecnológicos, sendo as principais empresas globalizadas e integradas. O setor farmacêutico é baseado na inovação tecnológica e na propriedade intelectual na forma de patentes. Estas patentes garantem exclusividade de mercado e geram altos ganhos (Fardelone e Branchi, 2006).

Segundo Fardelone e Branchi (2006), o mercado de biofármacos vem ganhando destaque, devido aos grandes avanços científicos e ao grande volume de investimentos na área de pesquisas. A tabela 1.4 apresenta uma comparação entre o total de vendas anuais de produtos farmacêuticos e biofarmacêuticos no período de 2000 a 2005.

Tabela 1.4 Mercado de biofármacos e fármacos no mundo (2000-2005)

Ano	Biofármacos		Fármacos		Biofármacos/ Fármacos (%)
	US\$ bilhões	Variação (%)	US\$ bilhões	Variação (%)	
2000	22,7	-	356	-	6,4
2001	27,1	19,4	390	9,6	6,9
2002	32,4	19,6	427	9,5	7,6
2003	41,3	27,5	497	16,4	8,3
2004	60,7	47,0	559	12,5	10,9
2005	70,8	16,6	602	7,7	11,8

Fonte: Fardelone e Branchi, 2006

Pelos valores ora apresentados é possível concluir que as vendas de biofármacos triplicaram em 6 anos quando comparados às vendas de fármacos químicos, cujos valores nem sequer dobraram no referido período (Fardelone e Branchi, 2006). Dados mais recentes indicam que a venda de biofármacos em 2007 ultrapassou a 75 bilhões de dólares (Lead Discovery, 2008).

Além disso, quando comparados ao setor de medicamentos farmacêuticos, os biofármacos praticamente duplicaram sua participação em porcentagem, demonstrando o dinamismo desse segmento (Fardelone e Branchi, 2006).

No entanto, a venda de biofármacos não é equivalente para todos os produtos. É sabido que alguns biofármacos específicos lideram o *ranking* dos mais vendidos. Tal fato pode ser observado na tabela 1.5, a qual apresenta o valor global de vendas no ano de 2003 de alguns produtos selecionados.

Tabela 1.5 Valor global de vendas em 2003 de alguns biofármacos selecionados

Produto (nome comercial)	Indicação	Companhia	Valor de vendas (por milhões de US\$)
Aranesp e Epogen combinado (ambos EPO)	Anemia	Amgen	3978
Neulasta e Epogen combinado (ambos EPO)	Anemia	Amgen	2522
Procrit/Eprix (EPO)	Anemia	Johnson & Johnson	3984
Avonex (IFN- β)	Esclerose múltipla	Biogen	1188
Remicade (anticorpo monoclonal)	Doença de Crohn	Johnson & Johnson	1729
Rituxan (anticorpo monoclonal)	Linfoma não-Hodgskin	Genentech	1489
Herceptin (anticorpo monoclonal)	Câncer de mama	Genentech	425
Humira (anticorpo monoclonal)	Artrite reumatóide	Abbott	250
Humulin (insulina)	Diabetes	Eli Lilly	1060
Humalog (insulina)	Diabetes	Eli Lilly	1020
Enbrel (uma proteína de fusão)	Artrite reumatóide	Amgen	1300

Fonte: Walsh, 2005

1.2.3.1 Desenvolvimento de novos biofármacos

O incremento do *portfólio* e o aumento do número de vendas das empresas de biofármacos é conseqüência do maciço investimento em Pesquisa e Desenvolvimento, orientado estrategicamente na demanda de novas terapias.

Em muitos casos, o desenvolvimento desses produtos envolve parcerias entre os grandes laboratórios multinacionais, empresas de biotecnologia e as universidades e instituições de pesquisa (Fardelone e Branchi, 2006).

Assim sendo, uma extensa variedade de biofármacos seguros e efetivos foi aprovada para uso, dirigidos para uma ampla variedade de indicações. Destaca-se aqui o tratamento de doenças graves. Não obstante eles representam também o tratamento de escolha para doenças que não são particularmente graves ou que não representam ameaça à vida (Cather *et al.*, 2002; Reichert, 2004; Weinberg *et al.*, 2002).

A figura 1.1 apresenta graficamente o número de biofármacos aprovados pela Administração de Alimentos e Medicamentos – *Food and Drug Administration* (FDA) no período de 1982 a 2008.

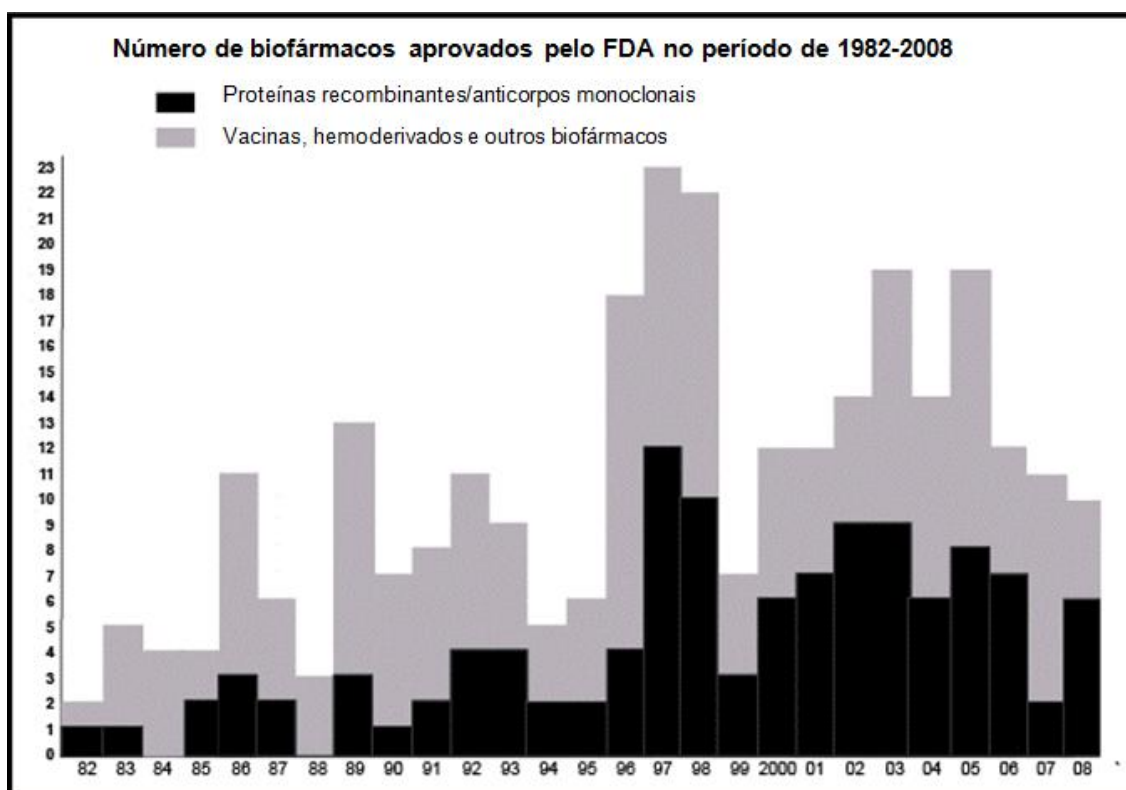


Figura 1.1 Número de biofármacos aprovados pelo FDA no período de 1982 a 2008

Fonte: Rader, 2008

Dessa forma, cruzando-se os dados apresentados na tabela 1.5 com as da figura 1.1 é fácil concluir que as empresas biofarmacêuticas, tais quais as farmoquímicas vêm estabelecendo alguns produtos que lideram suas vendas. Também é observado que anualmente novos biofármacos são disponibilizados no mercado, como resultado do alto investimento dessas empresas em Pesquisa e Desenvolvimento (Fardelone e Branchi, 2006).

1.2.3.2 As principais empresas biofarmacêuticas

As principais empresas biofarmacêuticas existentes no mundo são: Amgen, Biogen Idec, Celgene, Cephalon, Chiron, ImClone Systems, Genentech, Genzyme, Gilead Sciences, MedImmune, Millennium Pharmaceuticals, Novo Nordisk, Serono, Sepracor, e Shire Pharmaceuticals. Elas encontram-se localizadas sobretudo nos países desenvolvidos, como os Estados Unidos, os países europeus e o Japão.

Segundo Fardelone e Branchi (2006), essas empresas lideram mais de 80% da venda total de biofármacos. Um demonstrativo de vendas das mesmas é demonstrado na tabela 1.6.

Tabela 1.6 Total de vendas das principais empresas biofarmacêuticas no primeiro bimestre do período de 2000 a 2006

BIOFARMACEUTICA	2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006
	US\$ bilhoes	Variação (%)	US\$ bilhoes	Variação (%)	US\$ bilhoes	Variação (%)	US\$ bilhoes	Variação (%)	US\$ bilhoes	Variação (%)	US\$ bilhoes	Variação (%)	US\$ bilhoes
Amgen	814,1	10,75	901,6	11,86	1.008,5	74,64	1.761,2	32,98	2.342,0	20,96	2.833,0	13,55	3.217,0
Biogen Idec	-	-	-	-	-	-	-	-	541,7	8,51	587,8	3,98	611,2
Celgene	-	-	22,4	37,05	30,7	59,93	49,1	68,84	82,9	35,59	112,4	61,74	181,8
Cephalon	18,3	57,38	47,1	36,73	111,5	29,78	144,7	48,58	215,0	30,23	280,0	28,54	356,9
Chiron	216,7	10,57	239,6	5,18	252,0	21,67	306,6	23,84	379,7	7,30	407,4	-	-
ImClone Systems	-	-	-	-	-	-	-	-	109,6	-21,72	85,8	185,66	245,1
Genentech	364,2	38,66	505,0	15,88	585,2	28,11	749,7	30,07	975,1	49,89	1.461,6	35,88	1.986,0
Genzyme	170,6	30,54	222,7	8,71	242,1	57,74	381,9	28,65	491,3	-	-	-	730,8
Gilead Sciences	45,2	27,88	57,8	35,64	78,4	110,59	165,1	87,22	309,1	39,24	430,4	60,99	692,9
MedImmune	198,3	23,65	245,2	34,42	329,6	32,25	435,9	10,85	483,2	5,50	509,8	-2,31	498,0
Millennium Pharmaceuticals	46,8	7,69	50,4	36,11	68,6	19,10	81,7	13,34	92,6	33,59	123,7	-0,97	122,5
Novo Nordisk	-	-	660,6	0,82	666,0	37,43	915,3	17,32	1.073,8	17,19	1.258,4	15,30	1.451,0
Serono	-	-	294,4	16,13	341,9	29,39	442,4	25,93	557,1	7,95	601,4	10,99	667,5
Sepracor	-	-	-	-	56,8	48,77	84,5	17,75	99,5	19,60	119,0	140,08	285,7
Shire Pharmaceuticals	-	-	155,6	56,30	243,2	25,61	304,5	7,19	326,3	2,27	333,7	23,16	411,0
TOTAL	1.874,2	81,54	3.402,4	17,99	4.014,5	45,04	5.822,6	38,75	8.078,9	13,19	9.144,4	25,29	11.457,4

Fontes: Fardelone e Branchi, 2006

1.2.3.3 Associações entre empresas farmacêuticas e biotecnológicas

A grande necessidade de acesso ao capital pelas pequenas e médias empresas de biotecnologia e ao desenvolvimento tecnológico produzido pelas grandes empresas biofarmacêuticas determinaram nos últimos anos o aparecimento de alianças estratégicas entre as mesmas (Capanema e Palmeira Filho, 2007; Fardelone e Branchi, 2006; Scrips, 2005).

Para exemplificar o exposto acima, na tabela 1.7 são apresentadas algumas associações recentes de empresas farmacêuticas e empresas de base biotecnológicas, com destaque para a Pfizer, Glaxo-SmithKline, Bristol-Myers Squibb, Merck e Roche, as quais estão entre as grandes farmacêuticas mundiais que, juntas, investiram US\$ 1,928 bilhões de dólares nos anos de 2004 e 2005 (Fardelone e Branchi, 2006).

Tabela 1.7 Associações entre empresas farmacêuticas e biotecnológicas

EMPRESA FARMACÊUTICA	EMPRESA DE BIOTECNOLOGIA	ANO	VALOR (US\$ milhões)
Cilag (J&J)	Basilea Pharmaceutia	2005	312
GlaxoSmithKline	Theravance	2005	252
Japan Tobacco	Gilead Sciences	2005	105
Pfizer	Coley Pharmaceuticals	2005	505
Shire Pharma	New River Pharmaceuticals	2005	500
Bristol-Myers Squibb	Medares	2004	530
Merck	Nastech	2004	341
Roche	Pharmasset	2004	300
Serono	CancerVax	2004	278
Wyeth	Plexxikon	2004	372

Fonte: Sundman, 2005

Em suma, pode-se dizer que o grande sucesso das empresas biofarmacêuticas deve-se ao fato de os medicamentos serem inovadores e atingirem mercados com demanda crescente para este tipo de terapia. As oportunidades na área de biofármacos, para o Brasil, estão relacionadas ao setor de biogênicos/biossimilares, pois há forte crescimento da comercialização desses produtos no mundo, além de investimento em P&D para a geração de novos produtos.

1.3 Biogênicos e biossimilares

As companhias farmacêuticas desenvolvem produtos cujos componentes ativos são obtidos por sínteses químicas e outros expressos em sistemas celulares, seja de microorganismos (*Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* dentre outros) ou de células de mamíferos. Esses últimos formam o grupo dos biofármacos, que possuem algumas peculiaridades, o que lhes conferem características diferenciais em relação aos farmoquímicos, principalmente no que diz respeito à aplicação do termo “biogênico” ou “biossimilar”.

Uma característica importante diz respeito à estrutura molecular. Biofármacos são de 100 a 1000 vezes maiores em tamanho e são estruturalmente mais complexos do que as moléculas dos farmoquímicos disponíveis no mercado. Além disso, as moléculas de um biofármaco têm uma estrutura inerentemente heterogênea e mais diversa do que as moléculas de um medicamento obtido por síntese química (Goldsmith *et al.*, 2007).

Uma comparação é mostrada na tabela 1.8, a qual fornece uma relação com o peso molecular de diversos farmoquímicos sintéticos e biofármacos selecionados.

Tabela 1.8 Comparação do peso molecular de farmoquímicos sintéticos e biofármacos

Farmoquímicos	Peso Molecular (Da)
Glucophage	166
Vioxx	314
Prozac	346
Zantac	351
Paxil	375
Zocor	419
Augmentin	420
Crixivan	712
Taxol	854
Biofármacos	Peso Molecular (Da)
Neupogen	18800
Roferon-A	19625
Humatrope	22125
Avonex	22500
Epogen	30400
Pulmozyme	37000
Enbrel	75000
Zenapaz	144000
Rituxan/MabThera	145000
Fator VIII	264000

Fonte: EuropaBio, 2005

A figura 1.2 ilustra, na forma de modelos moleculares, o hormônio do crescimento humano e a fluoxetina, mostrando um exemplo claro da diferença na complexidade molecular de um biofármaco e um medicamento químico.

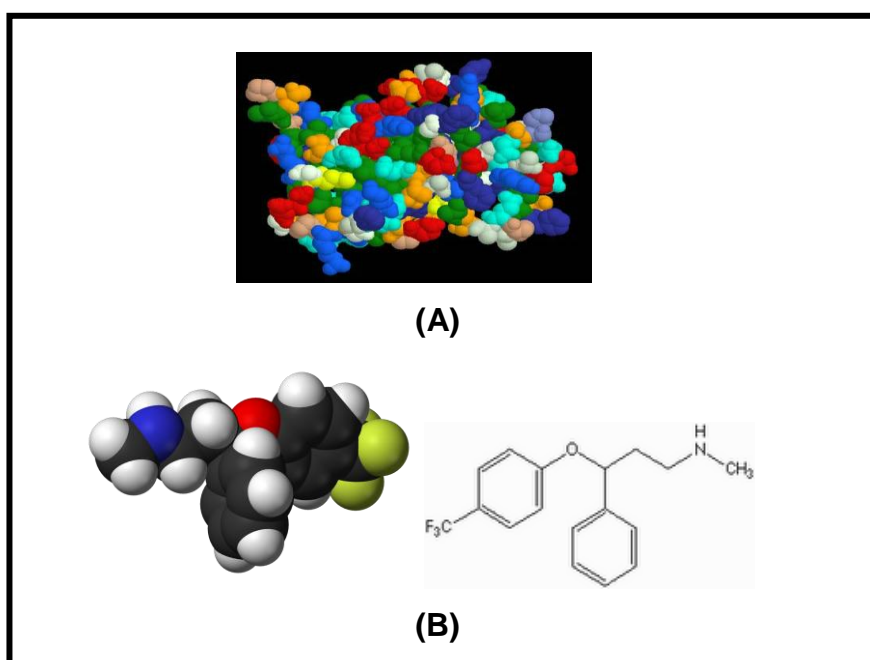


Figura 1.2 Ilustração comparativa de uma molécula biológica (A) e química (B)

Fontes: BioJob, 2008; Cadeias Carbônicas, 2009; Wikimedia, 2008

Além da complexidade estrutural e peso molecular, os biofármacos apresentam as seguintes peculiaridades que os diferenciam dos medicamentos químicos, a saber:

- a) Para produtos farmoquímicos, normalmente já está bem esclarecido todo o processo de síntese da substância, incluindo características dos reagentes utilizados, tempo e mecanismo de reação, temperatura, catalisadores, possíveis subprodutos que possam ser formados, além de métodos de identificação e análise das matérias-primas utilizadas na produção do medicamento. O mesmo não ocorre para biofármacos (Brasil, 2003).
- b) A produção de biofármacos requer uma validação mais estrita e permanente avaliação do produto ao longo do processo de fabricação, já que há muito mais parâmetros que afetam a qualidade do produto final e pelo fato do processo de manufatura ser muito mais complexo. Enquanto estima-se que são realizados de 40 a 50 testes críticos de um produto químico, um produto biológico é testado 250 vezes ou mais durante o processo de manufatura para garantir a eficácia do biofármaco (EuropaBio, 2005).
- c) Por serem produzidos por organismos vivos, os produtos biotecnológicos são inerentemente mais variáveis. Sendo assim, qualquer mudança no processo de manufatura, por menor que seja, altera os parâmetros de fabricação, equipamentos, ingredientes etc. Além disso, podem existir alterações no produto que não podem ser detectáveis por técnicas analíticas atualmente aplicadas em laboratórios (Goldsmith *et al.*, 2007). Toda mudança no processo deve ser novamente avaliada pelas autoridades por meio de um complexo processo de comparabilidade com o processo anterior e sempre deve ser considerada a possibilidade de realização de novos ensaios clínicos suplementares (ICH, 2004).
- d) A estabilidade um biofármaco não é fácil de ser monitorada, já que a degradação e natureza dos subprodutos não são constantes (Brasil, 2003).
- e) A grande variabilidade de técnicas analíticas utilizadas no controle de qualidade de um biofármaco em suas diversas etapas de fabricação é indiscutivelmente de maior complexidade do que as que são utilizadas para o controle de qualidade de produtos farmoquímicos (Brasil, 2003).
- f) Também se requerem controles mais estritos durante o processo de fabricação, que incluem ensaios de toxicidade, de farmacocinética *in vivo*, de

farmacodinâmica e, fundamentalmente, ensaios de imunogenicidade (resposta adversa do organismo às substâncias estranhas), além dos outros ensaios clínicos de segurança e eficácia necessários em cada caso (FIFARMA, 2006).

1.3.1 Imunogenicidade

Entende-se como imunogenicidade o processo mediante o qual o organismo gera uma resposta à introdução de uma proteína estranha, de preferência inativando-as e formando um complexo antígeno-anticorpo, que pode levar a sérias complicações e efeitos adversos (FIFARMA, 2006; Koren *et al.*, 2002; Schellekens, 2002).

Assume-se que, em ausência de provas clínicas em humanos e a tecnologia adequada para prever pequenas mudanças na conformação da estrutura de uma proteína, é impossível caracterizar a sua antigenicidade e conseqüentemente sua imunogenicidade (FIFARMA, 2006). A tabela 1.9 relaciona os fatores que podem afetar a imunogenicidade de uma proteína ou de um produto.

Tabela 1.9 Fatores que podem afetar a imunogenicidade de proteínas terapêuticas

Tipos de fatores	Detalhe
Características da proteína	Grau de glicosilação; Modo de ação (imunomodulação).
Características do produto	Impurezas relacionadas ao processo (proteínas da célula hospedeira, ADN da célula hospedeira); impurezas relacionadas ao produto (agregados, moléculas oxidadas, proteínas desnaturadas); formulação.
Características dos pacientes	Tipo de doença; antecedentes genéticos; idade e sexo; medicação concomitante.
Características da administração	Via de administração; duração do tratamento; intervalo da dose.
Populações	A imunogenicidade pode variar nas diferentes populações e segundo a condição imunológica dos pacientes.
Indicações terapêuticas	A imunogenicidade pode variar nas diferentes indicações terapêuticas.
Outros fatores	Estocagem e manipulação do produto; ensaios e amostragem do soro.

Fontes: FIFARMA, 2006; Koren *et al.*, 2002; Goldsmith *et al.*, 2007; Schellekens, 2002; Schellekens, 2004.

Assim, as razões apontadas acima servem como mais uma argumentação para que os termos “genérico” e “similar” não sejam aplicados da mesma forma que os são para os medicamentos químicos.

Pois, apesar da ciência e tecnologia terem realizado grandes avanços, ainda existe muita polêmica entre as Agências Regulatórias quanto à decisão de se empregar ou não os termos “biogénico” e/ou “biossimilares” para novos biofármacos lançados no mercado, com o mesmo princípio ativo daqueles já existentes, considerados “biofármacos de referência” para alguns órgãos reguladores.

A grande questão é decidir se um novo biofármaco, cópia de um inovador, apresenta ou não o mesmo perfil de qualidade, segurança e eficácia deste último. A partir daí, muitas outras discussões são levantadas, como a decisão de quais testes devem ser realizados e quais as variáveis que mais implicam na qualidade, segurança e eficácia do produto final (como sistema de expressão, tipo de vetor, condições do meio de cultivo, dados de especificação, sistema de purificação empregado etc) para que seja empregada a classificação de “biogénico” ou “biossimilar”.

1.3.2 Marcos regulatórios de biogénicos/biossimilares

A seguir, é apresentado um resumo da situação regulatória mundial no que se refere à concessão de registro de medicamento biotecnológico/biofármaco.

1.3.2.1 Europa: Aspectos normativos relevantes Agência Europeia de Medicamentos – *European Medicines Agency (EMA)*

Em 2003, a EMA modificou a definição do termo “genérico” no intuito de especificar de forma mais clara que os produtos biológicos não fazem parte de tal classificação. Dessa forma, exigia-se que as empresas detentoras de registro de produtos biológicos, mesmo que semelhante a outros já disponíveis no mercado deveriam subsidiar os respectivos registros por meio da apresentação de dados obtidos em ensaios pré-clínicos e clínicos.

Entretanto, no ano seguinte a EMA publicou uma normativa direcionada ao registro de produto biossimilares, na qual era estabelecida a possibilidade de apresentação de cópias de produtos inovadores ao se expirar a patente e a sua exclusividade de mercado. Para tal, as empresas interessadas deveriam apresentar dados comparativos de segurança, qualidade e eficácia do seu produto frente ao medicamento de referência. (EMA, 2004).

Vale ressaltar que os Marcos Regulatórios Europeus também estabeleceram padrões científicos no intuito de assistir os laboratórios no processo de aprovação de biossimilares. Dentre eles, destaca-se a Normativa EMEA/CHMP/437/2004 a qual determina os princípios gerais para a classificação dos biossimilares, bem como as informações adicionais clínicas e não-clínicas necessárias para sua aprovação. Ou seja, dada a sua complexidade, os denominados biogênicos/biossimilares exigiam uma normativa distinta da utilizada para o registro de medicamentos genéricos tradicionais (EMEA, 2004).

Recentemente, a EMEA aprovou diversas normas para assistir aos fabricantes de alguns tipos específicos de biossimilares. Destacam-se aqui os seguintes produtos: insulina humana recombinante, fator estimulador de colônias de granulócitos, eritropoetina, hormônio do crescimento e do interferon alfa recombinante (EMEA, 2006a; EMEA, 2006b).

1.3.2.2 Estados Unidos

Nos Estados Unidos, as autoridades vêm estudando o assunto de forma extensiva, tendo sido realizados vários seminários sobre o tema com a participação da comunidade científica. Entretanto, apesar de sensíveis avanços, o FDA ainda não possui uma legislação robusta o suficiente que assegure a qualidade e segurança dos biofármacos não-inovadores – denominados de “*follow-on protein products*” - a ponto de considerá-los verdadeiros “biogênicos” (Woodcock, 2007).

Na Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos, publicada em 2004 são apresentadas diretrizes legais e simplificadas para aprovação de moléculas biológicas pequenas e proteínas bem caracterizadas, tais como o hormônio do crescimento e insulina (WHO, 2007; Woodcock, 2007; Woodcock *et al.*, 2007).

Entretanto, os outros biofármacos com estrutura mais complexa, tais como as interleucinas e interferons encontram-se sob a tutela do Ato de Serviço de Saúde Pública - *Public Health Service Act* – PHSA - (Woodcock *et al.*, 2007).

Alguns exemplos de biossimilares pelo FDA são: Hylenex (hialuronidase recombinante humana), Hydase (hialuronidase), Fortical (calcitonina de salmão recombinante) *spray* nasal, Amphadase (hialuronidase), GlucaGen (glucagon recombinante para injeção) e Omnitrope (somatotrofina recombinante).

Em fevereiro de 2007, foi introduzida na Câmara dos Representantes e no Congresso Americano a legislação que fornece poderes ao FDA de autorizar a

aprovação de “*follow-on protein products*” de moléculas complexas, utilizando um procedimento simplificado. Sob este propósito, a FDA pode decidir avaliando cada caso específico quantos testes o fabricante necessita realizar para obter a referida aprovação (Woodcock *et al.*, 2007).

Em ambos os casos, a FDA pode afirmar que o “*follow-on protein product*” é aprovado como sendo seguro e eficaz, porém não que o mesmo possa substituir o biofármaco de referência (Woodcock *et al.*, 2007).

Para estabelecer que dois produtos possam ser intercambiáveis, o FDA determina que o fabricante do biosimilar realize testes de não inferioridade de seu produto, bem como apresente resultados de imunogenicidade (Woodcock, 2007).

Além disso, para a avaliação de biossimilares, a FDA avalia outros parâmetros também considerados relevantes. Dentre eles: robustez do processo de fabricação; grau em que a similaridade entre as estruturas pode ser avaliada; a extensão pela qual o mecanismo de ação foi entendido; a existência de validação; ensaios farmacodinâmicos mecanisticamente relacionados; comparação farmacocinética; comparação de imunogenicidade; a quantidade de dados clínicos disponíveis; e a extensão da experiência com o produto original (Woodcock *et al.*, 2007).

1.3.2.3 Canadá

A Agência Regulatória *Health Canada* considera os biossimilares/biogenéricos como sendo uma nova classe de medicamentos biológicos/ *subsequent entry biologicals*. Do ponto de vista legal os biossimilares são produtos comercializados subsequentemente à aprovação de um biofármaco inovador, respeitando-se os princípios das patentes e propriedades intelectuais (Health Canada, 2008).

Na norma “Orientações para produtores: Informações e Submissão de Requerimentos para os Novos Biofármacos” são fornecidas algumas diretrizes no intuito de regulamentar o tema. Destaca-se a não possibilidade de não classificar um biosimilar como biogenérico, a impossibilidade de que esses substituam automaticamente os produtos de referência e a necessidade de apresentação de informações completas sobre a qualidade dos mesmos para que eles sejam aprovados (Health Canada, 2008).

Cabe também ressaltar que a aprovação de biossimilares encontra-se condicionada à apresentação de um pacote reduzido de dados clínicos previstos na

Parte C, Divisão 5 das Legislações de Alimentos e Medicamentos – *Food and Drug Regulations* – e das Orientações para patrocinadores de testes clínicos: aplicações e manual de testes clínicos – *Guidance for Clinical Trial Sponsors: Clinical Trial Applications and the Clinical Trials Manual* (Health Canada, 2008).

1.3.2.4 Austrália

Seguindo os mesmos pressupostos legais estabelecidos pela EMEA, a Administração de Produtos Terapêuticos da Austrália – *Therapeutic Goods Administration* (TGA) atribui o termo “biossimilar” às cópias de biofármacos. Ressalta-se que algumas das normas estabelecidas pela EMEA foram adotadas pela referida Agência (TGA, 2009).

1.3.2.5 Japão

Apesar de no Japão existir uma Agência Regulatória bem estabelecida e com normas consolidadas, os biossimilares são regulamentados pelos princípios estabelecidos pela Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Medicamentos para Uso Humano – *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH ³) na normativa Q5E (WHO, 2007). Sendo assim, o Japão denomina os biossimilares como “*follow-on-biologicals*”, e não “biogênicos” (WHO, 2007).

1.3.2.6 Países das Américas do Sul e Central

1.3.2.6.1 Argentina

Neste país são aprovados biogênicos sem nenhum ensaio clínico, seguindo-se o procedimento simplificado de registro aplicado aos fármacos químicos genéricos. Contudo, a Administração Nacional de Medicamentos, Alimentos e Tecnologia Médica – *Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica* (ANMAT), Agência Regulatória Argentina, tem reconhecido publicamente em várias

³ ICH é um projeto único que reúne as autoridades reguladoras da Europa, do Japão e dos Estados Unidos e especialistas da indústria farmacêutica destas 3 regiões para discutir aspectos científicos e técnicos do registro de produtos.

ocasiões que esta situação deve ser corrigida, elaborando-se uma legislação específica para os produtos biotecnológicos (FIFARMA, 2006).

1.3.2.6.2 Chile

Em 2005, o governo do Chile aprovou uma “norma que define critérios para estabelecer a equivalência terapêutica em produtos farmacêuticos no Chile” onde é reconhecida a necessidade de estabelecer um projeto de lei específico para os biofármacos (FIFARMA, 2006). Todavia, foram aprovados alguns produtos como o interferon, eritropoetina e insulinas sem requerer ensaios clínicos que estabeleçam a eficácia e segurança desses produtos (Roche Brasil, 2007).

Em 2006, no entanto, o Instituto de Saúde Pública do Chile passou a outorgar registro sanitário a cópias de produtos biológicos/biotecnológicos, sem exigir estudos clínicos próprios. Porém, o Ministério da Saúde do Chile proibiu esta decisão 4 meses depois (Câmara da Indústria Farmacêutica do Chile, 2009).

Atualmente, ainda não existe no país uma política definida relacionada a esse tema, somente uma discussão em torno dessa questão no Departamento de Controle Nacional (Saavedra e Quiñones, 2006).

1.3.2.6.3 Colômbia

Colômbia foi o primeiro país, depois da China, a comercializar, sob aprovação do Instituto Nacional de Vigilância de Medicamentos e Alimentos – *Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA)*, um medicamento biossimilar (Terapia Biológica, 2007).

Já foram aprovados na Colômbia produtos similares de EPO, imunoglobulina, heparina, somatotrofina e insulina (FIFARMA, 2006).

Porém, ainda não se tem uma normativa estabelecida e, reconhecendo a necessidade de se estipular parâmetros para a aprovação de produtos biotecnológicos, o INVIMA esclarece que legislações de tal abrangência farão parte da coletânea de suas normatizações (INVIMA, 2009), a fim de proteger e beneficiar a saúde pública colombiana.

1.3.2.6.4 Guatemala

O Ministério da Saúde Pública e Assistência Social da República da Guatemala – *Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de la Republica de Guatemala* (MSPAS) estabeleceu em 2008 que para o registro de biossimilares deveriam ser realizados alguns testes específicos. Dentre esses se destaca: estudo clínico de imunogenicidade; ensaios clínicos de segurança e eficácia; e estudos clínicos de biossimilaridade comparado com o biofármaco de referência, sendo esse último solicitado para produtos novos, cujo princípio ativo já tenha registro no país e, inclusive para a renovação de registro (MSPAS, 2008).

1.3.2.6.5 México

A Secretaria de Saúde do México, apesar de não possuir uma regulamentação que determina os requerimentos para o cadastramento de biogênicos, já autorizou o registro de 60 medicamentos biotecnológicos. Sendo que, em torno de 50 desses biofármacos, foram registrados como “biogênicos” (Grupo Parlamentario do PRI no Senado, 2008).

Cientes da necessidade de se estabelecer uma normativa específica, Autoridades Parlamentares do México já declararam possuir um Projeto de Decreto, que irá reformular o artigo 222 da Lei Geral de Saúde, a fim de incorporar na mesma requerimentos para o registro de “biogênicos” (Grupo Parlamentario do PRI no Senado, 2008).

Conforme o Projeto, os “biogênicos” são equivalentes aos genéricos, isto é, são intercambiáveis. Para obter a tal classificação, o fabricante deve realizar estudos *in vitro* ou clínicos simplificados, para demonstrar a segurança e eficácia. Caberá a Secretaria de Saúde avaliar caso por caso, de acordo com a Denominação Comum Internacional (DCI) e julgar qual estudo caberá ao fabricante realizar (Grupo Parlamentario do PRI no Senado, 2008).

1.3.2.6.6 Venezuela

O Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR) determina os requisitos para o cadastramento de produtos biológicos, por meio de um Guia Instrutivo que fornece as ações a serem seguidas pelo fabricante (Registro Sanitário de Produtos Biológicos, 2009).

Esse Guia define três tipos de produtos biológicos: recombinantes, anticorpos monoclonais e terapêuticos. Vale ressaltar que somente os dois primeiros podem ser obtidos por meio da tecnologia do ADN recombinante.

Entretanto, as diretrizes a serem seguidas pelo fabricante são estabelecidas de acordo com outra subclassificação de produtos: *Novo* (A1, A2, B1 e B2) e *Conhecido*, que é determinada em função de vários fatores, como por exemplo: se o produto já é aprovado na Venezuela; se o princípio ativo já se encontra registrado no país; ou se o fabricante já produziu o tal medicamento e está mudando apenas a via de administração ou a indicação quanto à população alvo.

Assim, de acordo com a classificação do produto, são definidos os ensaios a serem realizados pelo fabricante, que podem ser: pré-clínicos (estudos de toxicidade; farmacodinâmica; farmacocinética; e estudos para os ativos) e clínicos (Registro Sanitário de Produtos Biológicos, 2009).

Podemos notar que em nenhum momento o INHRR se posiciona em relação à adoção dos termos “biogênico” ou “biossimilar” e sim procura enfatizar os processos de fabricação e controle de qualidade dos produtos biológicos. Inclusive em um Projeto de Norma para Produtos Biológicos, que foi criado por esse Instituto, com a intenção de atualizar o Guia Instrutivo, não se menciona o posicionamento do órgão em relação a essa abordagem (INHRR, 2008).

1.3.2.6.7 Cuba

O Centro para o Controle Estatal da Qualidade dos Medicamentos – *Centro para el Control Estatal de la calidad de los Medicamentos* (CECMED), Autoridade Sanitária Cubana, não dispõem de um regulamento específico para o registro de biogênicos ou biossimilares.

Porém, um representante do CIGB (*Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología*), empresa cubana, apresentou uma abordagem lógica quanto aos biogênicos, em uma conferência realizada em articulação da ANVISA e OPAS/OMS (Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial de Saúde).

Segundo Martínez (2003) os produtos biotecnológicos podem ou não ser “biogênicos”, dependendo: do vencimento de patente; da possibilidade de fontes

alternativas de medicamentos (multi-origem ⁴), neste caso sem necessidade de repetir ensaios clínicos de fase III; e da redução de gastos em saúde.

Este conferencista classifica os produtos biotecnológicos em quatro categorias, para definir se podem ser registrados como “biogênicos”:

a) Categoria I:

- ✓ Produto com vasta experiência de uso;
- ✓ Estrutura química bem conhecida;
- ✓ Atividade biológica bem definida;
- ✓ Existência de diferentes fabricantes no mercado;
- ✓ Usados para o tratamento de deficiências;

Para ser considerado “biogênico” requer-se:

- ✓ Comparação físico-química exaustiva;
- ✓ Comparação farmacocinética e farmacodinâmica em voluntários.

Exemplo: insulina.

b) Categoria II:

- ✓ Produto com vasta experiência de uso;
- ✓ Estrutura química bem conhecida;
- ✓ Atividade biológica bem definida;
- ✓ Existência de diferentes fabricantes no mercado;
- ✓ Pode ser usado para o tratamento de deficiências;
- ✓ Anticorpos interferem com a eficácia;

Para ser considerado “biogênico” requer-se:

- ✓ Comparação físico-química exaustiva;
- ✓ Comparação farmacocinética e farmacodinâmica em voluntários;
- ✓ Vigilância farmacológica para demonstrar igual segurança.

Exemplos: hGH (hormônio do crescimento humano), IFNs (interferons), IL-2 (interleucina-2), G-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos),

⁴ De acordo com a OMS, produtos multi-origem são aqueles produtos farmacêuticos elaborados por vários (múltiplos) fabricantes.

GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos) e fator VII.

c) Categoria III:

- ✓ Estrutura química bem conhecida;
- ✓ Atividade biológica bem definida;
- ✓ Existência de diferentes fabricantes no mercado;
- ✓ Pode ser usado para o tratamento de deficiências;
- ✓ Anticorpos neutralizam o homólogo natural.

Para ser considerado “biogênico” requer-se:

- ✓ Comparação físico-química exaustiva;
- ✓ Comparação farmacocinética e farmacodinâmica em voluntários;
- ✓ Vigilância farmacológica para demonstrar igual segurança;
- ✓ Estudos de fase III para as indicações terapêuticas mais importantes.

Exemplos: TPO (anticorpos anti-tireoperoxidase) e IL-12 (interleucina-12).

d) Categoria IV:

- ✓ É muito difícil copiar a molécula original;
 - ✓ Não é possível falar de “biogênicos” para os próximos anos;
- Exemplos: anticorpos monoclonais.

1.3.2.6.8 Brasil

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem uma regulamentação específica para os produtos genéricos desde 2003 (Resolução RDC 135, maio de 2003). Esta resolução estabelece que os produtos biológicos, imunoterápicos, derivados do plasma e sangue humano, e os produtos biotecnológicos (com exceção dos antibióticos e fungicidas), não são admitidos para o cadastro de genérico.

A ANVISA também dispõe, desde 2002, de uma regulamentação específica para produtos biológicos (RDC 80), a qual foi atualizada em outubro de 2005 por meio da

publicação da RDC 315. Atualmente, a referida RDC encontra-se em revisão, segundo informações da própria Agência.

Sendo assim, é possível observar claramente que no Brasil não existe uma regulamentação específica que abranja o tema biogênicos/biossimilares.

Apesar de não haver uma questão decidida neste sentido, e sabendo das oportunidades relacionadas ao setor de biogênicos/biossimilares, muitas empresas privadas (exemplo GlaxoSmithKline, a Aventis e a Roche) têm firmado parcerias com instituições de pesquisa e universidades brasileiras, com projetos relacionados à biofármacos.

Muitas instituições, como a Fundação Oswaldo Cruz e o Instituto Butantan, e universidades, como a UNICAMP, a USP e a UFRJ, mantêm, além das parcerias com empresas no Brasil, convênios com instituições de pesquisa de várias partes do mundo, os quais viabilizam relações de caráter técnico e financeiro com o ambiente externo à Instituição. A título de exemplo, em 2004 Brasil e Cuba assinaram um acordo para Transferência de Tecnologia na produção de biofármacos (Fardelone e Branchi, 2006).

1.4 A Transferência de Tecnologia

De acordo com Neto (1983), transferência de tecnologia é o deslocamento de um conjunto de conhecimentos e práticas tecnológicas de uma entidade produtiva para outra, incluindo as diversas etapas do processo de fabricação. Ainda que altamente complexa, ela é uma das formas mais eficientes de incorporação rápida de tecnologia.

Para Linsu Kim (1997), o desenvolvimento de capacitação tecnológica é visto como um processo de aprendizagem nos níveis individual e organizacional, e nas dimensões do conhecimento tácito e explícito. Um dos conceitos centrais de sua abordagem é que a capacidade de absorção de uma empresa é determinada pela base de conhecimento existente e pela intensidade de esforço comprometido. Sendo assim, a capacitação tecnológica é um processo de aprendizagem que ocorre em todos os níveis da sociedade.

Em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, associa-se à incipiente inovação tecnológica a falta de técnicos qualificados, ou mesmo universidades e Centros de Pesquisa e Desenvolvimento aptos para tal. Dessa forma, tais países adquirem novas tecnologias por meio de convênios e na medida em que vão sendo

treinados, vão se especializando e formando novas competências. Não há altas taxas de inovação devido à falta de técnicos qualificados, universidades e centros de pesquisa e desenvolvimento aptos para inovar. Assim sendo, estes países adquirem tecnologia, isto é copiam tecnologias de inovação e na medida em que vão sendo treinados, vão se especializando e formam novas competências. A partir de então, com massa crítica formada, esses países tornam-se aptos a inovar.

Bio-Manguinhos é uma empresa do Ministério da Saúde, comprometida com a melhoria das condições de saúde da população brasileira. Ao longo de sua existência a referida instituição tem investido em desenvolvimento próprio, colaborações – a partir de processos de alianças estratégicas e transferência de tecnologia – e apoio a projetos que visem soluções para prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças de grande impacto na saúde pública do país (Bio-Manguinhos, 2008a).

No que se refere ao processo de Transferência de Tecnologia (enquadra-se no modelo de inovação proposto por Linsu Kim), Bio-Manguinhos tem fechado vários acordos com diversas instituições públicas e privadas. Destaca-se aqui o acordo firmado em 2004 com o *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología* (CIGB) para a produção de IFN 2b recombinante.

A importância desse acordo foi o fato de Bio-Manguinhos passar a atuar na produção de IFN 2b no intuito de suprir a demanda do Programa de Medicamentos de Dispensação Excepcional do Ministério da Saúde.

Dessa forma, a produção e distribuição do referido fármaco garantiria à população o acesso gratuito aos produtos de alta tecnologia, fortalecendo os princípios de universalidade, integralidade e equidade que norteiam as ações do Sistema Único de Saúde (SUS), contribuindo, dessa forma, para a redução dos gastos do Ministério da Saúde (Bio-Manguinhos, 2008b). Além disso, é inquestionável a redução dos gastos do Ministério da Saúde no que se refere à aquisição do referido fármaco (Bio-Manguinhos, 2008b).

Bio-Manguinhos assinou o contrato de transferência de tecnologia em 2004 e disponibilizou este medicamento para o Programa em fevereiro de 2006.

Considerando a experiência decorrente do processo de Transferência de Tecnologia, Bio-Manguinhos hoje possui um Projeto em desenvolvimento na Carteira de Projetos do Programa de Biofármacos para a produção nacional de interferon β .

1.5 Interferons

Os interferons e seus receptores formam uma subclassificação das citocinas da classe de 2 α -hélices que existiram primeiramente em cordatos, por aproximadamente 500 milhões de anos (Krause e Pestka, 2005) e representam os primeiros elementos da resposta imune inata e adaptativa.

Os interferons foram a primeira família de citocinas a ser descoberta. Em 1957 pesquisadores observaram que se células animais susceptíveis fossem expostas à colonização viral, estas células imediatamente tornavam-se resistentes ao ataque de outros vírus (Isaacs e Lindenmann, 1957). Esta resistência foi induzida por uma substância secretada pelas células infectadas com o vírus, a qual foi chamada de “interferon” (IFN). Subseqüentemente, foi mostrado que a maioria das espécies animais produzia de fato um extenso conjunto de interferons (Walsh, 2003).

Aproximadamente 10 tipos de interferons foram descobertos em espécies de mamíferos, mas apenas 7 são encontrados em humanos: IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- ν , IFN- γ , dos quais todos são do tipo I, exceto um que é do tipo II - IFN- γ (Pestka *et al.*, 2004).

Apesar de ter sido encontrados 7 interferons na espécie humana, apenas 3 são mais estudados e conhecidos: IFN- α , IFN- β e IFN- γ . Estes interferons são produzidos por uma variedade de tipos celulares, e exibem um amplo alcance de efeitos biológicos, incluindo (Walsh, 2003):

- a) Indução da resistência celular ao ataque viral;
- b) Regulação da maior parte das funções imunes;
- c) Regulação do crescimento e diferenciação de muitos tipos celulares; e
- d) Sustento das primeiras fases de gravidez em algumas espécies animais.

O receptor de superfície celular do IFN tipo I é um homodímero de dois polipeptídeos estruturalmente relacionados; um deles liga-se à citocina e o outro transduz os sinais de ativação por meio de um complexo mecanismo chamado JAK/STAT (Abbas *et al.*, 2003; Darnell *et al.*, 1994; Stark, 2007).

Os IFN- α e IFN- β exibem amplas atividades biológicas. Dentre estas, destaca-se: ação antiviral e estimulação antiproliferativa da atividade citotóxica (Ortaldo *et al.*, 1983) de uma variedade de células do sistema imune (células T, células natural *Killer*, monócitos, macrófagos e células dendríticas); aumento na expressão de

antígenos de superfície associado a tumores, tais como Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), classe I (Greiner *et al.*, 1987); indução e/ou ativação de genes e proteínas proapoptóticos; repressão de genes antiapoptóticos; modulação da diferenciação e atividade anti-angiogênica. Todas estas ações fazem do interferon o agente mais promissor para o tratamento de várias doenças (Pestka, 2007).

1.5.1 Interferon- α

Estudos clínicos realizados no final da década de 70, com multicomponentes contendo preparações impuras de IFN- α , claramente ilustraram os potenciais anticarcinogênicos da referida substância (Gresser e Bourali, 1970). Foi demonstrado que o interferon alfa induzia a regressão de tumores em um número significativo de pacientes diagnosticados com câncer de mama, alguns tipos específicos de linfoma e mieloma múltiplo. Também é descrito na literatura que o referido interferon retarda o crescimento de tumores após procedimento cirúrgico realizado em pacientes diagnosticados com sarcoma osteogênico (Walsh, 2003).

Após muitos anos da sua descoberta inicial, foi proposto que o IFN- α representa o produto de um único gene. Entretanto, em humanos são relatados ao menos 24 genes ou pseudo-genes, que codificam a produção de pelo menos 14 tipos distintos e maduros de “interferons alfas” (Walsh, 2003).

Atualmente é sabido que todas as espécies produzem múltiplos tipos de interferon, denominados “interferons alfas”. Na década de 70, estudos de purificação utilizando técnicas de cromatografia de alta resolução (principalmente troca-iônica e cromatografia de gel filtração, cromatografia de imunoafinidade e focalização isoelétrica) elucidaram tal fato (Walsh, 2003; Billiau, 2007).

Nos anos 80, após a legalização das técnicas de clonagem, diversos genes que codificam o IFN em uma variedade de sistemas de expressão foram identificados. Observou-se que a expressão de genes específicos fornecia como produto um único subtipo de IFN (Walsh, 2003).

O primeiro IFN recombinante a tornar-se disponível para estudos clínicos foi o IFN- α 2a, em 1980. Logo após, os genes que codificam os adicionais “interferons alfas” adicionais foram clonados e expressos, e devidamente testados em estudos clínicos diversos (Goeddel *et al.*, 1980; Maeda *et al.*, 1980; Nagata *et al.*, 1980).

As propriedades antivirais, antitumorais e imunomoduladoras dos interferons garantiram sua aprovação para uma variedade de aplicação terapêutica. Atualmente, a maioria dos “interferons alfas humanos recombinantes” fabricados e vendidos pelas companhias biofarmacêuticas são geralmente produzidos em *E. coli* (Pestka, 2007; Walsh, 2003).

A tabela 1.10 mostra os principais interferons disponíveis no mercado, assim como sua respectiva indicação terapêutica. Na tabela 1.11 são destacados os produtos contendo interferons alfa 2a e 2b registrados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Tabela 1.10 Relação dos interferons aprovados e indicações terapêuticas

Produto	Companhia	Indicação
Intron A (IFN- α -2b humano recombinante)	Schering Plough	Câncer, verrugas genitais, hepatites
PegIntron A (IFN- α -2b humano recombinante peguilado)	Schering Plough	Hepatite C crônica
Viraferon (IFN- α -2b humano recombinante)	Schering Plough	Hepatite B e C crônica
ViraferonPeg (IFN- α -2b humano recombinante peguilado)	Schering Plough	Hepatite C crônica
Roferon A (IFN- α -2b humano recombinante)	Hoffman-La-Roche	Leucemia
Actimmune (IFN- γ -1b humano recombinante)	Genentech	Doença Granulomatosa Crônica
Betaferon (IFN- β -1b humano recombinante, difere da proteína humana em que Cys 17 que é substituído por Ser)	Schering AG	Esclerose Múltipla
Betaseron (IFN- β -1b humano recombinante, difere da proteína humana em que Cys 17 que é substituído por Ser)	Laboratórios Berlex e Chiron	Reincidências de esclerose múltipla
Avonex (IFN- β -1a humano recombinante)	Biogen	Reincidências de esclerose múltipla
Infergen (IFN- α recombinante, interferon sintético do tipo I)	Amgen (EUA) e Yamanouchi Europe (UE)	Hepatite C crônica
Rebif (IFN- β -1a humano recombinante)	Ares Serono	Reincidências de esclerose múltipla
Rebetron (combinação de ribavirina e IFN- α -2B humano recombinante)	Schering Plough	Hepatite C crônica
Alfatronol (IFN- α -2b humano recombinante)	Schering Plough	Hepatite B e C e vários cânceres
Virtron (IFN- α -2b humano recombinante)	Schering Plough	Hepatite B e C
Pegasys (PEGinterferon α -2a)	Hoffman La Roche	Hepatite C
Vibragen Omega (interferon - ω felino r)	Virbac	Veterinário (reduz mortalidade/sinais clínicos de parvovirose caninas)

Fonte: Walsh, 2003

Tabela 1.11 Relação dos interferons alfa 2a e 2b registrados na ANVISA

Empresa	Produto	Nome da marca
Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.	Alfainterferona 2a	Roferon A
Blausiegel Indústria e Comércio LTDA	Interferon alfa 2a recombinante	Blauferon A
Cubanacan Comércio Internacional LTDA/Biofar LTDA	Interferon alfa 2b humano recombinante	Heberon Alfa R
Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica LTDA	Interferon alfa 2b humano recombinante	Intron A
Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos	Interferon alfa 2b humano recombinante	Beferon B
Laboratório Químico Farmacêutico Bergamo LTDA	Alfainterferona 2a	Kinnoferon 2A
Blausiegel Indústria e Comércio LTDA	Interferon alfa 2b humano recombinante	Blauferon-B
Eurofarma Laboratórios LTDA	Interferon alfa 2b humano recombinante	Danaferon
Fundação Oswaldo Cruz	Alfainterferona 2b	Interferon Alfa 2b Humano Recombinante

Fonte: ANVISA, 2009

1.5.1.1 Interferon alfa 2b humano recombinante

O IFN- α 2b é uma proteína muito bem conhecida e caracterizada, que contém 165 aminoácidos. Trata-se de uma proteína não glicosilada, com peso molecular aproximado de 19,2 kDa. Contém duas pontes dissulfeto: uma entre o resíduo de cisteína 1 e 98, e a outra entre o resíduo de cisteína 29 e 138 (Radhakrishnan *et al.*, 1996; EMEA, 2006a).

A estrutura do IFN- α 2b humano recombinante mostrando as pontes dissulfeto e resíduos de cisteína foi determinada pela difração de raios X e é representada na Figura 1.3.

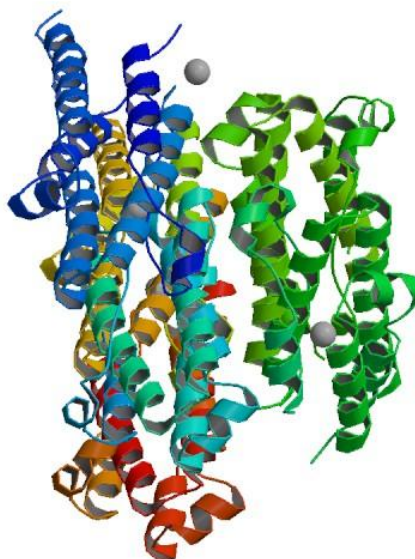


Figura 1.3 Interferon alfa 2b humano recombinante

Fonte: PDB, 2008

A empresa *Schering Plough* foi a primeira indústria biofarmacêutica a conseguir a aprovação no FDA do uso de IFN- α 2b humano recombinante (Intron A) para o tratamento de leucemia. Entretanto, atualmente, o referido produto encontra-se aprovado em mais de 50 países para, pelo menos, 16 diferentes indicações terapêuticas (Walsh, 2003). Na tabela 1.12 são apresentadas algumas das indicações terapêuticas IFN- α 2b humano recombinante.

Tabela 1.12 Principais indicações terapêuticas aprovadas para o IFN- α 2b humano recombinante

Leucemia de célula “cabeluda”	Papilomatose laringeal benigna
Leucemia mielóide crônica	Papilomatose laringeal
Carcinoma renal celular	Papilomatose respiratória recorrente
Carcinoma de célula basal	Micoses
Melanoma maligno	Condiloma acuminado
Sarcoma de Kaposi relacionado com AIDS	Hepatite B crônica
Mieloma múltiplo	Hepatite C
Linfoma não - Hodgkin	Hepatite D crônica
Infecção pelo vírus da imunodeficiência humana	Hepatite não-A, não-B/C crônica
Tricoleucemia	

Fontes: Bio-Manguinhos, 2008c; Walsh, 2003

1.5.1.2 O interferon alfa 2b humano recombinante no Brasil

O INF- α 2b humano recombinante faz parte do Programa de Medicamentos de Dispensação Excepcional do Ministério da Saúde. O referido programa, o qual foi iniciado em 1982, tem como principal objetivo a disponibilização de medicamentos

de alto custo utilizados para o tratamento de doenças específicas que atingem um número limitado de pacientes.

Por se tratarem de doenças crônicas sabe-se que os pacientes atendidos pelo programa receberão os produtos por períodos prolongados em uma das unidades ambulatoriais do Sistema Único de Saúde (SUS). Sendo assim, o fornecimento desses medicamentos denominados como de “alto custo” depende da aprovação específica das Secretarias Estaduais de Saúde e de uma avaliação clínica e laboratorial do paciente. Os critérios de inclusão previstos pelo Programa encontram-se estabelecidos nos Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas – PCDT (Portal Saúde, 2008).

O IFN- α 2b humano recombinante foi incluído especificamente no PCDT da Hepatite Viral C em 2007 (Brasil, 2007).

1.5.2 Interferon- β

O IFN- β é uma proteína única produzida por muitas células, tais como fibroblastos - por isso é também chamado de interferon fibroblástico - e algumas células epiteliais (Abbas *et al.*, 2003; Walsh, 2003).

Ele vem sendo utilizado como tratamento padrão para esclerose múltipla (Axtell e Steinman 2008; Piper *et al.*, 2001; Kovarik *et al.*, 2008). Acredita-se que o IFN- β atue codificando proteínas, que influenciam a proliferação, diferenciação ou ativação de células imunocompetentes (Sørensen, 2006).

1.5.3 Interferon- γ

O IFN- γ é a principal citocina ativadora dos macrófagos e exerce funções críticas na imunidade inata e na imunidade específica mediada pela célula. O IFN- γ é uma proteína homodimérica produzida pelas células NK (*Natural Killer*), pelas células CD4⁺ T_H1 e pelas células T CD8⁺ (Abbas *et al.*, 2003; Boehm *et al.*, 1997; Pestka *et al.*, 2004).

É também chamado de IFN imune, ou tipo II. Possui alguma atividade antiviral, porém não é um interferon antiviral potente, e funciona principalmente como uma citocina efetora de respostas imunes, tendo importante ação contra microorganismos intracelulares (Abbas *et al.*, 2003; Janeway *et al.*, 2002).

IFN- γ é atualmente usado na doença granulomatosa crônica, lesões de pele – relacionadas com o vírus papiloma humano e quelóide (Piper *et al.*, 2001) e na lepra lepromatosa (Janeway *et al.*, 2002), mas estudos adicionais ainda estão em andamento.

1.6 A Hepatite C

A hepatite C é uma doença infecciosa que se tornou um dos maiores problemas de saúde pública no mundo por apresentar uma alta morbidade e mortalidade. A infecção causada pelo vírus da hepatite C (HCV) é comumente assintomática, apresenta uma elevada taxa de cronicidade e pode evoluir para fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular (Hoofnagle, 2002). A infecção crônica também está relacionada com distúrbios no metabolismo lipídico (Su *et al.*, 2002) e esteatose hepática (Siagris *et al.*, 2006).

Com todas essas consequências devastadoras, a hepatite C vem sendo considerada a grande pandemia do próximo milênio (Passos, 1999).

O vírus da hepatite C é o único membro do gênero *Hepacivirus*, o qual pertence à família *Flaviviridae*, tendo seu genoma clonado e seqüenciado pela primeira vez em 1989 (Choo *et al.*, 1989). O vírus é envelopado e seu genoma é constituído de uma molécula de ARN de fita simples, de polaridade positiva, que contém uma única e longa fase de leitura aberta (ORF – *Open Reading Frame*), que codifica uma poliproteína com cerca de 3000 aminoácidos (Choo *et al.*, 1991; Friebe e Bartenschlager, 2002; Friebe *et al.*, 2005; Penin *et al.*, 2004).

A transmissão do HCV ocorre por transfusão de sangue e hemoderivados, utilização de agulhas e seringas contaminadas e transplante de órgãos e tecidos. A transmissão por outros fluidos biológicos como saliva, lágrima, urina, sêmen e secreção vaginal pode ocorrer, porém os riscos são baixos (Hsu *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1992).

O último dado epidemiológico divulgado pelo WHO mostrou que o número de indivíduos infectados pelo HCV na população mundial é estimado em 170 milhões (WHO, 2000).

No Brasil, a prevalência de anti-HCV varia de 0,3% no Estado de Santa Catarina a 5,9% na região Amazônica (da Fonseca e Brasil, 2004; Rosini *et al.*, 2003). Segundo Campiotto *et al.* (2006) nas cinco regiões geográficas do Brasil, o genótipo 1 foi o mais freqüentemente detectado.

É importante ressaltar que neste trabalho pretende-se levantar questões relacionadas à fabricação de produtos biotecnológicos, especificamente do biofármaco utilizado no tratamento da hepatite C.

Como pesquisadores atuantes em temas ligados à saúde humana, preocupados com a ciência de forma geral, sobretudo com a qualidade, segurança e eficácia dos produtos comercializados e futuros produtos do mercado, vamos expor questões importantes, de natureza propositiva, diretamente relacionada à fabricação de proteínas recombinantes utilizadas para fins terapêuticos.

1.7 Banco de Células

1.7.1 Histórico dos aspectos regulatórios do Banco de Células

O primeiro produto biológico fabricado a partir de um sistema celular foi a vacina da poliomielite, desenvolvida em 1949 por Jonas Salk, a partir de vírus inativados, produzidos em cultura de tecido (células de rim de macaco). A vacina foi testada em 1954 em 45 mil crianças nos Estados Unidos.

Paralelamente, questões relacionadas à qualidade de medicamentos impulsionaram as Agências Regulatórias a normatizarem a produção e o registro de produtos biológicos. Assim, em 1959 a OMS publica o primeiro requerimento para cultura de células a ser utilizado na fabricação de produtos biológicos, direcionado especificamente para o controle de células primárias da vacina inativada da poliomielite (WHO, 1959). Este documento foi revisado em 1965 (WHO, 1966).

Diferentes células primárias, oriundas de outros animais, tais como o *hamster*, passaram a ser empregadas no processo de produção de vacinas. Ressalta-se que até então se dava preferência às células primárias, pois estas eram consideradas com ciclo de vida bem definido e pouco se conhecia sobre a cancerologia humana e os riscos implicados na utilização das mesmas (Hilleman, 1968; Hilleman, 1979).

Porém, como a cultura de células primárias não permite a criação de um Sistema de Banco de Células, estes documentos iniciais não abordavam este tema, que passou a ser abordado apenas nos documentos seguintes.

Nos anos 1960, células humanas diplóides foram desenvolvidas e propostas como uma alternativa às culturas primárias de células de rim de macaco, usadas para a produção da vacina da poliomielite por muitos anos (Petricciani e Sheets, 2008).

O caminho para a aceitação de células humanas diplóides foi difícil e longo, primeiramente porque alguns membros da comunidade científica acreditavam que um latente, desconhecido e intestável “agente oncogênico” poderia estar presente em células diplóides, mesmo considerando o fato dessas células não apresentarem nenhuma característica fenotípica que sugerisse sua presença. Assim, alguns pesquisadores acreditavam que os tais “agentes” poderiam comprometer a qualidade das vacinas produzidas com as referidas células (Petricciani e Sheets, 2008). Entretanto, finalmente, as células humanas foram aceitas, e continuam sendo utilizadas até hoje por muitos fabricantes na produção de diversas vacinas virais (Hayflick *et al.*, 1987).

Assim, em 1966, a OMS publica o primeiro documento contendo os “Requerimentos para Substâncias Biológicas”, que contempla as diretrizes para controle de células diplóides.

Os conceitos de BCM e BCT surgiram em uma conferência na Iugoslávia, em 1963. O Dr. Leonard Hayflick propôs, ao subcomitê do Comitê de Cultura Celular e Padronização Microbiológica, da Associação Internacional das Sociedades Biológicas, o conceito de dois níveis do Sistema do Banco de Células, bem como a possibilidade da utilização dos mesmos no preparo Lotes Sementes de Vírus (Symposium on Diploid Cells, 1963).

Em 1978, a FDA e a *Tissue Culture Association* - Associação de Cultura de Tecido - se reuniram em Lake Placid, Nova York para considerar se a linhagem celular contínua poderia ser usada para a fabricação de outros produtos biológicos (Petricciani *et al.*, 1979). Neste momento, já estavam interessados em usar uma linhagem celular contínua, chamada célula Namalwa (uma linhagem de célula linfoblastóide humana) para produzir α -interferon para estudos clínicos (Beale, 1979; Petricciani e Sheets, 2008).

A maioria dos participantes da referida reunião tiveram uma precaução quanto ao uso da linhagem celular contínua no que diz respeito à produção de biológicos, mas vários participantes acreditaram que os riscos potenciais associados ao uso destas células eram também grandes. As principais razões para a rejeição desta linhagem celular era o fato delas apresentarem cariologia anormal e malignidade - crescimento anormal em potencial (Schiff, 2005).

No início dos anos 80, o conceito de BCM e BCT foi então adaptado para as células CHO (*Chinese Hamster Ovary* - Ovário de Hamster Chinês) e à célula de mieloma de camundongo (Sp2/0 e NS0). Esse foi considerado um fato marcante

para o longo caminho de regulamentação de controle de fabricação de produtos biológicos/biotecnológicos.

Vários anos depois, em 1984 numa outra reunião internacional, foi realizada uma discussão acerca dos fatores de segurança relacionados aos substratos celulares de linhagens celulares contínuas (Hopps e Petricciani, 1985). Os principais contaminantes apontados como de grande impacto foram as proteínas, os ADNs e a presença de vírus alterados. A partir de então, a comunidade passou a acreditar na potencial utilização da linhagem celular contínua na fabricação de produtos biológicos (Schiff, 2005).

Tal fato foi corroborado pelo Grupo de Estudo da OMS, o qual recomendou em 1986 o uso de linhagens celulares contínuas para produção de biológicos (WHO, 1987a). A partir desta reunião veio também as recomendações para um BCM bem caracterizado, testando-o quanto aos agentes endógenos e exógenos (WHO, 1987b).

No âmbito regulatório, destaca-se a publicação de regulamentos específicos relacionados ao Controle dos Bancos de Células Contínuas, proposta pela OMS e FDA em 1987.

Paralelamente, observa-se que os rápidos avanços em biotecnologia nos anos 80 (especificamente em produtos derivados da tecnologia do ADN recombinante - proteínas e anticorpos monoclonais) exigiram das Agências Regulatórias o desenvolvimento de uma legislação que contemplasse as diretrizes necessárias para a garantia da qualidade e segurança destes novos produtos (Schiff, 2005; Petricciani e Sheets, 2008).

Assim sendo, diversas diretrizes foram propostas com o intuito de controlar a qualidade dos BCM e BCT recombinantes. Na tabela 1.13 são apresentados os principais documentos publicados por diversas Autoridades Regulatórias relacionadas ao Controle de Células/Banco de Células.

Tabela 1.13 Relação dos principais documentos criados pelas Autoridades Regulatórias relacionados ao controle de Banco de Células

Autoridade Regulatória	Norma	Ano de criação/revisão
WHO	WHO Série de Informes Técnicos 178 Anexo 2: Requerimentos para Vacina da Poliomielite (Inativada)	1959/1966/2002
WHO	WHO Série de Informes Técnicos 323 Anexo 1: Requerimentos para Substâncias Biológicas	1966/1989/1990/ 1992
WHO	Boletim da Organização Mundial de Saúde 61: Controle de Qualidade de Produtos Biológicos Produzidos por Técnicas de ADN Recombinante	1983
FDA	Pontos a Considerar na Caracterização de Linhagens Celulares Usadas para Produção de Biológicos	1987/1993
WHO	WHO Série de Informes Técnicos 745 Anexo 3: Requerimentos para Linhagem Contínua de Células Usadas na Produção de Biológicos	1987
WHO	WHO Série de Informes Técnicos 771 Anexo 7: Requerimentos para Interferon Humano Produzido por Técnicas de ADN Recombinante	1988
WHO	WHO Série de Informes Técnicos 878 Anexo 1: Requerimentos para o uso de células animais com substratos <i>in vitro</i> para a produção de biológicos	1998/2005
EEC	Diretriz 75/318 Produção e Controle de Qualidade de Citocinas Produzidas por Processos Biotecnológicos	1990
WHO	WHO Série de Informes Técnicos 814 Anexo 3: Diretrizes para Garantir a Qualidade de Medicamentos e Produtos Biológicos Preparados pela Tecnologia do ADN Recombinante	1991
EEC	Diretriz 75/318 Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos Produzidos pela Tecnologia do ADN Recombinante	1994
ICH	CPMP/ICH/139 Tópico Q 5 B Qualidade de Produtos Biotecnológicos; Análise do Vetor de Expressão Usado em Linhagens Celulares para Produção de Proteínas Derivadas da Tecnologia do ADN Recombinante	1995
ICH	CPMP/ICH/294 Tópico Q 5 D Qualidade de Produtos Biotecnológicos: Derivação e Caracterização de Substratos Celulares Usados na Produção de Produtos Biológicos/Biotecnológicos	1995
ICH	CPMP/ICH/295 Tópico Q 5 A Qualidade de Produtos Biotecnológicos: Avaliação da Segurança Viral de Produtos Biotecnológicos Derivadas de Linhagens Celulares Humanas ou de Origem Animal	1995
FDA	Pontos a Considerar na Fabricação e Testagem de Anticorpos Monoclonais para Uso Humano	1997
CECMED	Produtos Biológicos: Regulações Internacionais Relacionadas à Produção e Controle Adotadas em Cuba	2000
EMA	EMA/CHMP/410869 Diretrizes Para Produtos Medicinais Baseados em Células Humanas	2006

Fonte: Confecção própria

1.7.2 A importância dos parâmetros de controle

É indiscutível que a biotecnologia abriu uma nova e promissora oportunidade para diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças por meio, por exemplo, do provimento de novos medicamentos e vacinas, assim como sensíveis ferramentas de diagnóstico (WHO, 2003).

Entretanto, o uso destas substâncias biológicas levanta preocupações acerca da segurança e qualidade das mesmas, resultante principalmente de suas características biológicas, de suas complexas estruturas moleculares, de sua interação com excipientes e solventes e de sua forte tendência à agregação (Crommelin *et al.*, 2007; WHO, 2003).

Dessa forma, é fundamental assegurar que medidas de controle sejam estabelecidas no intuito de garantir a qualidade, identidade, potência, pureza e estabilidade do produto biológico, antes do mesmo ser liberado para uso (Lim *et al.*, 2004).

Um dos principais requisitos para se alcançar a consistência e segurança na fabricação de proteínas biológicas para uso humano é a caracterização, controle e manutenção do material de partida, isto é, as células que dão origem aos produtos (Schiff, 2005).

1.7.3 Definição do Sistema de Banco de Células

As células recombinantes que expressam o produto biotecnológico são definidas pelas Autoridades Regulatórias como “Sistema de Banco de Células”. Este, por sua vez, é classificado como Banco de Células Mestre (BCM) e Banco de Células de Trabalho (BCT), tendo em conta as seguintes definições (ICH, 1995b; WHO, 1991; WHO, 1988; WHO, 1998; EEC, 1990; EEC, 1994).

- a) BCM: Uma alíquota de um simples “*pool*” de células, as quais geralmente foram obtidas de um clone de células selecionadas, sob condições definidas, dispensadas em múltiplos frascos e estocadas sob condições definidas. O BCM é usado para preparar todos os BCT.
- b) BCT: O Banco de Células de Trabalho é preparado a partir de alíquotas de uma suspensão homogênea de células obtidas da cultura do BCM sob condições definidas.

Um Sistema de Banco de Células bem caracterizado não apenas permite uma fonte consistente de produção de células durante toda a vida de um produto, mas também diminui a probabilidade de contaminação por outras linhagens celulares e agentes adversos (Schiff, 2005).

1.7.4 Tipos de células usadas na fabricação de produtos biológicos/biotecnológicos

A seleção de um apropriado sistema celular para se utilizar na fabricação de produtos biológicos tem sido um tema de extrema atenção e ansiedade há pelo menos 50 anos (Petricciani e Sheets, 2008).

Com o desenvolvimento das técnicas de engenharia genética e tecnologia do hibridoma nos anos 70 (Walsh, 2004), aliado com uma grande variedade de sistemas de expressão disponíveis (*Escherichia coli*, insetos, aves, leveduras, fungos filamentosos, células de mamíferos, plantas, animais transgênicos etc), a possibilidade de produção de biotecnológicos foi sensivelmente incrementada (Houdebine, 2009; Hunt, 2005; Mett *et al.*, 2008; Sofer e Zabriskie, 2000).

Levando-se em consideração as características fenotípicas do crescimento celular *in vitro* - e excetuando-se as células de bactérias, fungos filamentosos, leveduras e insetos - as células podem ser divididas em três categorias (Petricciani e Sheets, 2008; WHO, 1998):

a) Células primárias

Células primárias são aquelas derivadas diretamente do tecido do doador e, caso tenha sofrido algum subcultivo *in vitro*, este foi mínimo (Petricciani e Sheets, 2008). Sendo assim, esse tipo de célula é obtido diretamente do tecido triplicinizado do animal sadio, contando o prévio conhecimento de suas funções na virologia ou na imunologia (WHO, 1998).

Historicamente, as culturas de células primárias foram as primeiras a serem aceitas para a produção comercial de vacinas virais. Sabe-se que algumas delas continuam sendo utilizadas até o dia de hoje, dentre as quais podem-se destacar: células de rim de macaco para a produção da vacina da pólio, células de rim de *hamster* para a produção da vacina da encefalite japonesa e fibroblastos de embriões de galinha para uma variedade de produtos, incluindo as vacinas para sarampo e caxumba (Petricciani e Sheets, 2008).

A cultura de células primárias oferece diversas vantagens. Dentre essas se ressalta o fato de seu preparo ser comparativamente fácil, usando-se meio de cultivo simples e soro bovino. Além disso, possuem uma ampla sensibilidade a diversos vírus, alguns dos quais são citopatogênicos, e atualmente podem ser postas em

crescimento em biorreatores, utilizando-se os microcarreadores (Van Wezel, 1984; WHO, 1998).

Entretanto, alguns fatores limitam a sua utilização, quando se dispõem de outros sistemas celulares. Contaminação por agentes infecciosos, tais como vírus, o que é um problema comum; a qualidade e sensibilidade das culturas obtidas de diferentes animais são variáveis é a dificuldade de se obter culturas derivadas de primatas não-humanos são alguns deles (WHO, 1998).

Culturas obtidas de animais silvestres mostram uma alta frequência de contaminação viral. Por exemplo, é geralmente aceito que culturas de células de rim de macaco podem ser contaminadas por um ou mais agentes adversos, incluindo viroses símias (WHO, 1998).

O número de vírus isolados e a frequência de isolamento dependem de vários fatores, incluindo o método de isolamento, testes aplicados no sistema de células, número de passagens e duração de incubação e co-cultivo. E, são diretamente proporcionais ao período de incubação das culturas (WHO, 1998).

A frequência de contaminação das culturas pode ser significativamente reduzida pelo cuidadoso exame da fonte animal. Esta pode ser demonstrada pela ausência de anticorpos de vírus relevantes. Dessa forma, o uso de animais criados em uma colônia cuidadosamente controlada, especialmente aquelas nas quais são livres de patógenos específicos, é enormemente recomendado (WHO, 1998).

b) Linhagem de células diplóides

O processo de linhagem de células diplóides originadas de humanos e primatas não humanos foi desenvolvido nos anos 60 e 70. Basicamente, trata-se de células com características não-tumorigênicas, apresentando uma expectativa de vida finita, com um quadro cromossômico normal. Exemplos incluem as células WI-38, MRC-5 e FRhL-2 (Petriccioni e Sheets, 2008).

A experiência que foi ganha com a vacina da poliomielite oral e outras vacinas virais na bem-sucedida imunização de milhões de crianças em muitos países demonstrou claramente a segurança das vacinas produzidas em tais células (Hayflick *et al.*, 1987).

A principal vantagem das células diplóides em comparação com as células primárias é que estas podem ser bem caracterizadas e padronizadas, e a produção pode ser baseada em um Sistema de Banco de Células - BCM e BCT (WHO, 1998).

Entretanto, linhagem de células diplóides possui algumas desvantagens. Dentre elas destaca-se o fato de não serem facilmente utilizadas para produção em larga escala, tais como tecnologia em biorreator. Além disso, geralmente elas necessitam de uma demanda maior de meio de crescimento e de outros substratos, bem como de grandes quantidades de soro bovino, o qual pode ser uma fonte de introdução de patógenos (WHO, 1998).

c) Linhagem de células contínua

Linhagem de células contínua possui a característica em potencial de terem uma vida infinita *in vitro*, freqüentemente exibindo um quadro cromossômico anormal, sendo a grande maioria tumorigênica (Petricciani e Sheets, 2008)

Normalmente são cultivadas como células ancoradas, ou em suspensão em biorreator, e são derivadas dos seguintes métodos: a) subcultivo seriado de uma cultura de células primárias humanas ou animal, que apresentem células tumorais, tais como HeLa ou células Namalwa; b) transformação de uma célula normal que possui uma expectativa de vida finita com um vírus oncogênico, como por exemplo, o linfócito B transformado pelo vírus do Epstein-Barr; c) subcultivo seriado de uma população normal de células, gerando uma nova população celular que apresenta uma alta expectativa de vida; ou d) fusão entre um mieloma e um linfócito B produtor de anticorpos (WHO, 1998).

A sua habilidade em formar tumores em animais de testes pode estar relacionada a alguns fatores, a saber: “espontânea transformação” *in vitro* durante a adaptação da subcultura - por exemplo, células MDCK e BHK-21; transformação por vírus inteiros ou elementos virais - por exemplo, células 293ORF6 e PerC.6; ou por serem derivadas de tecidos tumorais - por exemplo, células Namalwa, HeLa e T-24 (Petricciani e Sheets, 2008).

A linhagem de células contínuas é atualmente considerada adequada para a produção de muitos produtos biológicos e possui vantagens distintas em relação ao uso de células primárias e de células diplóides (Grachev, 1990). Enquanto que um Sistema de Banco de Células similar àquele usado na linhagem de células diplóides (BCP e BCT) assegura um meio de fabricação de produtos biológicos por um período indefinido, o Sistema de Banco de Células precisa estar bem caracterizado e padronizado (WHO, 1998).

A linhagem de células contínua tende a ser menos exigente que a linhagem de células diplóides. Em geral, elas apresentam um bom crescimento utilizando um meio de cultura comum e soro, sendo que algumas delas nem sequer necessitam do segundo componente. Além disso, elas também podem ser cultivadas em biorreatores, utilizando microcarreadores, para produção em larga escala de produtos biológicos (WHO, 1998).

Entretanto, conforme já mencionado, muitas linhagens de células contínuas podem expressar vírus endógenos e são tumorigênicas. Portanto, suas desvantagens teóricas incluem o risco de tumorigenicidade associado com o ADN residual que pode codificar algumas proteínas (WHO, 1998).

d) Células de leveduras

Embora a bactéria *E. coli* represente uns dos mais poderosos sistemas de expressão heteróloga, várias proteínas eucarióticas de interesse comercial não puderam ser expressas eficientemente nesse microrganismo. Assim a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi mais uma alternativa para a utilização de sistema de expressão.

As leveduras são fungos que têm sido utilizados pelo homem há milhares de anos e cuja manipulação causou um grande impacto na produção de alimentos e, por conseguinte, influenciando o próprio processo de desenvolvimento sócio-econômico da humanidade (Torres e Moraes, 2000).

O *S. cerevisiae* além de ser considerado um dos microorganismos mais úteis ao homem, é um dos sistemas eucarióticos mais bem conhecidos. Sua genética é bem dominada e seu genoma foi totalmente seqüenciado, fato este que representou uma das maiores conquistas da Biologia no século XX (Torres e Moraes, 2000).

Após o advento da tecnologia do ADN recombinante, a levedura *S. cerevisiae* pôde ser empregada em estudos de genética molecular a partir do final dos anos 70, quando ela foi geneticamente transformada pela primeira vez. O ambiente intracelular da levedura é adequado para a ocorrência de várias reações que normalmente ocorrem em células de mamíferos. Desde então, vários tipos de vetores moleculares foram desenvolvidos, inclusive cromossomos artificiais, mais conhecidos como YAC - *Yeast Artificial Chromosomes* (Berg *et al.*, 2004).

Assim, a levedura *S. cerevisiae* foi mais uma alternativa para ser utilizada como sistema de expressão. Uma das grandes vantagens da utilização de *S.*

cerevisiae como uma alternativa utilizada para sistemas de expressão é o fato do mesmo ser classificado como GRAS (*Generally Recognized As Safe* – Geralmente Reconhecido Como Seguro) o que é de suma importância no que se refere à produção de biofármacos por técnicas de engenharia genética. Um inconveniente é que muitas proteínas humanas podem sofrer hiperglicosilação quando secretadas por *S. cerevisiae*.

Ao longo das últimas duas décadas, outras leveduras têm sido apresentadas como sistemas alternativos de expressão por apresentarem vantagens sobre *S. cerevisiae*. Dentre esses novos sistemas, destaca-se a *Pichia pastoris*, uma levedura metilotrófica, que vem ganhando grande aceitação como organismo hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas de interesse farmacológico.

Dentre as proteínas expressadas pela *P. pastoris* destacam-se: a albumina sérica humana - que já está em testes clínicos para seu uso como produto de substituição de plasma; e o antígeno de superfície da hepatite B - que foi aprovado para se fazer uma vacina contra esse vírus.

e) Células de bactérias

Atualmente, os sistemas bacterianos representam o sistema de expressão de proteínas recombinantes mais largamente empregados (Mett *et al.*, 2008).

A bem caracterizada bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) é considerada uma das ferramentas mais utilizadas, com aplicações abrangendo desde a pesquisa básica até a produção industrial de enzimas e proteínas terapêuticas. A referida bactéria é dotada de um imenso conjunto de mecanismos moleculares, bioquímicos, processamento e engenharia conhecidos, acumulados durante anos, o que faz da *E. coli* um atrativo sistema de expressão de proteínas (Mahmoud, 2007).

Este sistema de expressão apresenta características vantajosas. Destaca-se aqui a fácil manipulação dos genes, a possibilidade de obter altos rendimentos com grandes quantidades de proteína expressa em pequenos volumes de cultura, a rapidez do processo produtivo e o baixo custo associado ao mesmo. Originalmente, tal sistema era empregado para expressão de proteínas menos complexas (Tonso, 2000).

A figura 1.4 mostra esquematicamente a vantagem da utilização de sistemas procariotos enfocando a relação custo/rendimento.

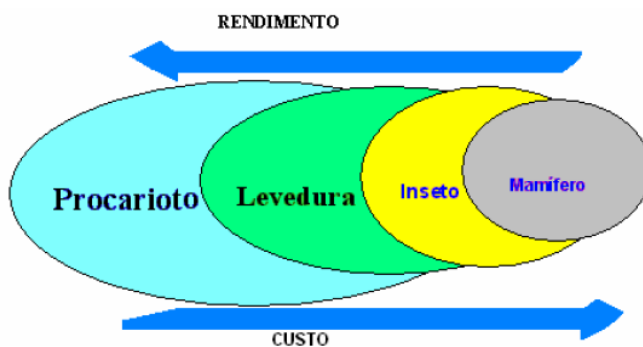


Figura 1.4 Relação custo/rendimento em diferentes sistemas de expressão

Fonte: Lemes, 2007.

Entretanto, a utilização de *E. coli* apresenta uma série de limitações, dentre as quais a incapacidade de realizar modificações pós-traducionais, a propriedade de formação de pontes dissulfeto e a possibilidade de glicosilação de sítios designados (Rai e Padh, 2001). Além destas, a produção de endotoxinas endógenas e pirogênio, os quais são difíceis e custosos de remover das preparações desejadas, fazem parte das desvantagens do emprego desta bactéria na produção industrial de proteínas recombinantes (Mett *et al.*, 2008).

Outro fator crítico no emprego da *E. coli* como sistema de expressão é a formação de corpos de inclusão, que são grandes agregados protéicos acumulados intracelularmente, que em muitos casos prejudicam a recuperação do produto. Dessa forma, sua aplicação na produção de proteínas animais gera, habitualmente, a desnaturação ou a perda da configuração tridimensional e, conseqüentemente, da atividade biológica da proteína (Lemes, 2007; Tonso, 2000).

Convém, contudo, ressaltar que a formação de agregados protéicos em muitos casos facilita a recuperação do produto. A condição é que as proteínas ao serem desnaturadas e renaturadas não percam a atividade biológica, como no caso do IFN- α 2b humano recombinante (Lemes, 2007).

Outras espécies de bactérias gram-negativas, tais como *Pseudomonas sp*, *Serratia marcescens* e *Erwinia herbicola* também foram empregadas com sucesso na expressão de proteínas, mas seus níveis de expressão são limitados e requerem muitos anos de pesquisa e desenvolvimento para se tornarem competitivas frente à *E. coli* (Mahmoud, 2007).

Na tabela 1.14 são apresentados alguns exemplos de produtos biológicos/biotecnológicos comerciais fabricados pelas células citadas anteriormente.

Tabela 1.14 Exemplos de produtos biológicos/biotecnológicos e os tipos de células usadas em sua fabricação

Produto	Sistema de fabricação	Fabricante
Vacina contra poliomielite	Vírus cultivado em células primárias de rim de macaco	Bio-Manguinhos Sanofi Pasteur
Vacina contra a tríplice viral (sarampo, rubéola e caxumba)	Vírus cultivado em células primárias de tecido de ovos embrionados de galinha (caxumba e sarampo) e células diplóides humanas MRC5 (rubéola).	Bio-Manguinhos GSK (GlaxoSmithKline)
Vacina contra a hepatite A	Vírus cultivados em células diplóides humanas	GlaxoSmithKline Sanofi Pasteur MerckSharpDhome
Vacina anti-rábica humana	Vírus cultivado em células Vero (uma linhagem contínua de células de rim de macaco verde africano)	Sanofi Pasteur
Vacina contra hepatite B	Expressão do antígeno recombinante HBSAg em leveduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Hansenula polymorpha</i>)	Sanofi Pasteur GlaxoSmithKline MerckSharpDhome Instituto Butantan
Interferon alfa 2b humano recombinante	Expressão do biofármaco em bactérias (<i>Escherichia coli</i>)	Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia Schering Plough
Insulina humana recombinante	Expressão do biofármaco em bactérias (<i>Escherichia coli</i>) Expressão do biofármaco em leveduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Eli Lilly Novo Nordisk
Eritropoetina humana recombinante	Expressão do biofármaco em células CHO (uma linhagem contínua de células de ovário de hamster chinês)	Centro de Imunologia Molecular
Anticorpo monoclonal OKT3	Secreção de anticorpos monoclonais por hibridoma murino	Johnson & Johnson

Fontes: Bio-Manguinhos, 2008d; Bio-Manguinhos 2008e; Hermes Pardini, 2008; Thiel, 2004; Tupam Editores, 2008.

1.7.5 Tipos de vetores de expressão empregados na tecnologia do ADN recombinante

Conforme já mencionado no item 1.2.2, para o processo de fabricação de biofármacos é fundamental que se disponha de um vetor de expressão, também chamado de vetor de clonagem ou veículo de clonagem (Zaha *et al.*, 2003). Esse vetor é que transporta o inserto de ADN para dentro da célula hospedeira, onde ele poderá ser replicado (Zaha *et al.*, 2003).

Dentre os vários tipos de vetores utilizados para clonagem em células hospedeiras, destacam-se os plasmídeos, os bacteriófagos, e os cromossomos artificiais de leveduras – *Yeast Artificial Chromosome* (YAC).

a) Plasmídeos

São moléculas de ADN circular, de fita dupla, extracromossômico, que ocorrem naturalmente em bactérias e em alguns organismos eucarióticos unicelulares, como leveduras (Berg *et al.*, 2004; Zaha *et al.*, 2003).

Os plasmídeos possuem capacidade de replicação autônoma e, freqüentemente, transportam genes que conferem resistência a antibióticos, como ampicilina e tetraciclina. Esses genes são utilizados como uma maneira de distinguir entre as células hospedeiras que receberam o vetor e aquelas que não o receberam (Berg *et al.*, 2004; Zaha *et al.*, 2003). Dentre os mais utilizados, destaca-se o pBR322 e os plasmídeos pUC.

O pBR322 foi desenvolvido por Bolívar *et al.* (1977), sendo um dos plasmídeos mais úteis para clonagem (Berg *et al.*, 2004). Trata-se de um vetor pequeno (4,36 kb) e caracteriza-se por apresentar um alto número de cópias por célula. Contém genes de resistência a ampicilina e a tetraciclina além de um conveniente número de sítios de restrição em posições estratégicas, imprescindíveis para a engenharia genética. O tamanho menor confere algumas vantagens para o plasmídeo, como: elevado número de cópias e maior facilidade de manipulação do ADN plasmidial (Astolfi-Filho *et al.*, 1996).

Posteriormente aos vetores derivados diretamente do pBR322 foram desenvolvidos vetores mais elaborados, dos quais os mais importantes pertencem a série pUC desenvolvida por Messing (1991). Os plasmídeos pUCs têm como principais características o tamanho pequeno (2,69 kb), duas marcas de seleção e caráter multicópia em *E. coli* (Nascimento, 2006).

Os vetores pUCs, permitem seleção visual direta de colônias contendo plasmídeos recombinantes. O elemento principal para a seleção direta deste vetor é a presença de uma pequena parte do gene de β -galactosidase (*lacZ*) de *E. coli* (Nascimento, 2006; Zaha *et al.*, 2003).

Além desses, podemos citar também os cosmídeos, que são plasmídeos bacterianos utilizados para a clonagem de fragmentos maiores; o cromossomo

bacteriano artificial – *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC); e os plasmídeos *Bluescript M13+* e *M13-* (Zaha *et al.*, 2003).

b) Bacteriófagos

São vírus que infectam exclusivamente bactérias, por introdução de seus ácidos nucleicos no hospedeiro (Grilo e Magalhães, 1994). Dentre os mais utilizados pode-se citar o fago Lambda (λ) e o fago M13 (Berg *et al.*, 2004; Zaha *et al.*, 2003).

O ADN do fago λ foi modificado pela tecnologia do ADN recombinante, originando um dos mais versáteis e gerais vetores para clonagem (Zaha *et al.*, 2003). Após ser inserido na célula hospedeira, este fago pode multiplicar-se no interior da mesma, causando a lise - ciclo lítico - ou integrando o seu ADN no cromossomo do hospedeiro - ciclo lisogênico (Berg *et al.*, 2004; Zaha *et al.*, 2003).

O fago M13 é especialmente útil para o seqüenciamento do ADN inserido, mas não para propagação em longo prazo de ADN recombinante, porque inserções maiores do que cerca de 1kb não são mantidas estáveis (Berg *et al.*, 2004). Outra característica marcante de M13 é que ele não destrói sua bactéria hospedeira. Em conseqüência, grandes quantidades de M13 podem ser cultivadas e facilmente obtidas (Berg *et al.*, 2004).

Uma vantagem de se utilizar esses vírus modificados como vetores é que eles são inseridos na bactéria muito mais facilmente do que os plasmídeos (Berg *et al.*, 2004).

c) Cromossomos artificiais de leveduras

Os YACs foram desenvolvidos no final da década de 1980, como um tipo de vetor para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que podem clonar fragmentos longos de ADN (Zaha *et al.*, 2003).

Os YACs têm sido muito importantes na construção de bibliotecas genômicas de organismos com genomas complexos, como, por exemplo, os mamíferos (Zaha *et al.*, 2003).

1.7.6 Criação dos Bancos de Células Recombinantes

De uma maneira simplificada, a criação dos Bancos de Células segue as seguintes etapas:

- a) O gene de interesse é isolado;
- b) Esse gene é então inserido num vetor de expressão com os elementos reguladores;
- c) É realizado um seqüenciamento do ADN do inserto para verificar se ocorreram mutações;
- d) O ADN recombinante formado é introduzido numa célula hospedeira e depois realizada a seleção das células que incorporaram o referido vetor;
- e) As células que contém o vetor de expressão são colocadas em um meio de cultivo específico para crescimento;
- f) Essas células são então dispensadas em vários frascos com crioprotetor, estocadas e refrigeradas (normalmente a -70°C ou temperatura inferior, como nitrogênio líquido a -196°C) sob condições pré-definidas, formando assim o BCM;
- g) Quando necessário cada frasco do BCM é descongelado;
- h) As células do BCM são colocadas em condições específicas de crescimento;
- i) As células que expressam o produto são expandidas por uma série de subcultivos até certo número de passagens, determinada pelo fabricante;
- j) Quando se atinge o número de células desejado, as mesmas são dispensadas em múltiplos frascos, formando o BCT.

1.7.7 Controle dos Bancos de Células

Com o intuito de garantir a qualidade dos Bancos de Células, considerando aspectos relevantes como segurança, pureza e eficácia, as principais e mais experientes Autoridades Regulatórias publicaram diversos regulamentos a serem seguidos pelos fabricantes de produtos biológicos/biotecnológicos, a fim de garantir a qualidade dos BCM e BCT.

Na tabela 1.15 são apresentados os principais testes/requerimentos a serem realizados nos BCM e BCT utilizados na produção de vacinas. Nas tabelas 1.16 e 1.17, os principais testes/requerimentos a serem aplicados na célula hospedeira e vetor; e BCM e BCT, respectivamente, utilizados na produção de proteínas recombinantes.

Tabela 1.15 Principais testes/requerimentos a serem aplicados no Sistema de Banco de Células utilizados na produção de vacinas

Banco de Células Mestre	Banco de Células de Trabalho
origem e breve histórico	data de estabelecimento do BCT
aprovado por autoridades sanitárias	quantidade de células estocadas
número de ampolas estocadas	número de passagens do BCT até a escala industrial
método de preparação do BCM	condições de estocagem
número de passagens do BCM até obtenção do BCT	percentagem do total de ampolas do BCT testados
condições de estocagem	testes de identidade
percentagem do total de ampolas do BCM testados	testes de agentes adversos
características de crescimento	testes de tumorigenicidade (se aplicável)
características morfológicas	teste de esterilidade
marcadores imunológicos	teste de retrovírus e outras viroses endógenas ou ácido nucléico viral
dados citogenéticos	
dados bioquímicos	
outros testes de identidade específicos	
testes de agentes adversos	
testes de tumorigenicidade (se aplicável)	
susceptibilidade viral	
teste de esterilidade	
teste de retrovírus e outras viroses endógenas ou ácido nucléico viral	

Fontes: criação própria baseada nos dados pesquisados em: WHO, 1998; WHO, 2004a; WHO 2004b; WHO, 2005; WHO, 1987b; WHO, 2006; WHO, 2002; FDA, 1993; FDA, 2006

Tabela 1.16 Principais testes/requerimentos a serem aplicados na célula hospedeira e no vetor de expressão utilizados na produção de proteínas recombinantes

Célula hospedeira	Vetor de expressão
descrição das características genotípicas e fenotípicas	identificação, origem e fonte de obtenção da célula de onde o gene que codifica a proteína foi obtido
fonte de obtenção da célula	identificação e detalhes quanto ao isolamento do gene que será clonado
histórico da célula quanto seu emprego na produção de biofármacos	métodos usados para construção do vetor
importantes referências bibliográficas da literatura científica referentes à célula em questão	descrição detalhada da montagem do vetor
procedimento utilizado para o cultivo	fonte de obtenção do vetor e histórico do mesmo
método de preservação do banco de célula hospedeira	um mapa com a descrição e seqüência relevantes do vetor
	mapa das enzimas de restrição
	fonte e funções dos componentes do vetor
	quais regiões do vetor foram seqüenciadas
	se a proteína é expressa ou não como uma proteína de fusão
	se o vetor expressa mais de uma proteína
	descrição do método de transformação/transfecção
	descrição completa da forma utilizada para amplificação do vetor
	método detalhado de seleção clonal
	indicação se o vetor se encontra integrado no genoma ou extracromossomal
	método de preservação do vetor
	seqüenciamento do ADN da região codificante do gene de interesse
	seqüenciamento do ADN das regiões flanqueadoras e das junções de inserção
	análise quanto inserções e deleções

Fontes: criação própria baseada nos dados pesquisados em: WHO, 1991; ICH, 2002; ICH, 1995a; ICH, 1995b; CECMED, 2000; WHO, 1988; EEC, 1990; EEC, 1994; FDA, 1997; USP, 2008, Farmacopéia Britânica, 2007

Tabela 1.17 Principais testes/requerimentos a serem aplicados no Sistema de Banco de Células utilizados na produção de proteínas recombinantes

Banco de Células Mestre	Banco de Célula de Trabalho
célula aprovada por Autoridades de Controle Sanitário Nacional	se o banco de células é preparado pelo próprio fabricante ou obtido de fontes externas
se o banco de células é preparado pelo próprio fabricante ou obtido de fontes externas	tamanho do banco de células preparado ou adquirido de fontes externas
tamanho do banco de células preparado ou adquirido de fontes externas	origem, estocagem, utilidade e prazo de validade dos materiais utilizados na composição do banco de células
procedimento detalhado de transformação, seleção, isolamento da colônia, clonagem, amplificação gênica, adaptação da bactéria ao meio e às condições de cultura específicos	condições de estocagem do BCT
data de obtenção do BCM	planejamento quanto ao uso do banco de células, considerando a viabilidade celular e expectativa de vida do BCT
condições de estocagem do BCM	Existência de condições de precauções de acidentes
origem, estocagem e expectativa de vida do BCM	procedimentos detalhados usados durante o preparo do BCT
planejamento quanto ao uso do banco de células, considerando a viabilidade celular e expectativa de vida	número de passagens do BCT até a fase de cultivo no biorreator
existência de condições de precauções de acidentes	gerenciamento da documentação de forma a permitir a rastreabilidade
gerenciamento da documentação de forma a permitir a rastreabilidade	verificação da presença do vetor na célula
número de passagens do BCM até a obtenção dos BCT	pureza – ausência de contaminação
quantidade de BCT oriundo de cada BCM	determinação da idade celular <i>in vitro</i>
origem, estocagem, utilidade e prazo de validade dos materiais utilizados na composição do BCM	seqüenciamento do ADN que codifica o produto recombinante
número de cópias do vetor presente na célula	seqüenciamento das regiões flanqueadoras
análise do vetor quanto à inserções e deleções	estabilidade plasmidial
isolamento do vetor e seqüenciamento do ADN que codifica o produto recombinante	identificação da bactéria por meio de características genotípicas e fenotípicas
seqüenciamento das regiões flanqueadoras	viabilidade celular
pureza – ausência de contaminação	data de obtenção dos BCT
identificação da célula por meio de características genotípicas e fenotípicas	
estabilidade plasmidial	
viabilidade celular	

Fontes: criação própria baseada nos dados pesquisados em: WHO, 1991; ICH, 2002; ICH, 1995a; ICH, 1995b; CECMED, 2000; WHO, 1988; EEC, 1990; EEC, 1994; FDA, 1997; USP, 2008, Farmacopéia Britânica, 2007

Como se pode observar, o controle do Sistema do Banco de Células utilizado para a produção de proteínas recombinantes é mais complexo do que aquele usado para a produção de vacinas, já que o primeiro conta com mais dois sistemas para ser analisados: o vetor e a célula hospedeira.

Além disso, a necessidade de estabelecer parâmetros de controle para o Banco de Células atualmente ultrapassa as expectativas de qualidade, segurança e eficácia

do biofármaco em questão, já que num futuro bem próximo o produto poderá ser classificado como biogênérico ou biossimilar, sendo os parâmetros de controle adotados pelo fabricante um dos fatores cruciais para a adoção dessa classificação.

Somando-se ao exposto acima, pode-se acrescentar outra abordagem desta questão, que é o impacto que a classificação de biogênérico e biossimilar irá provocar, que poderá influenciar nos custos, vendas, mercado nacional e internacional etc.

1.8 Justificativa

As Autoridades Regulatórias têm um papel crucial em todas as fases de desenvolvimento, fabricação, comercialização e fiscalização de um produto biotecnológico. Dessa forma, o papel de “regulação” inclui muitas responsabilidades.

Das responsabilidades, destaca-se: coordenar as atividades regulatórias envolvidas numa Transferência de Tecnologia; autorizar ou cancelar o funcionamento de estabelecimentos que realizam alguma atividade relacionada à cadeia de fabricação/distribuição de produtos biotecnológicos; concessão do registro de produto etc.

Considerando o acordo de Transferência de Tecnologia firmado entre Brasil e Cuba em 2004, que tem como um dos objetivos a nacionalização da produção do IFN- α 2b humano recombinante, pode-se afirmar que a ANVISA tem várias incumbências relacionadas a essa “movimentação” de tecnologia. Dentre elas, pode-se citar a solicitação de documentos dos locais que estão transferindo a tecnologia (no caso o CIGB), a fim de verificar se os parâmetros estabelecidos por este Centro atende às exigências nacionais. Solicitações estas normalmente feitas na etapa de registro do produto para comercialização. Após esta etapa a ANVISA também realiza inspeções anuais ao Instituto fornecedor da transferência de tecnologia para avaliar as condições de Boas Práticas de Fabricação.

Porém, como a Transferência de Tecnologia envolve países diferentes, conseqüentemente abrange também Agências Regulatórias diferentes – Brasil e Cuba. Tal fato pode gerar conflitos de exigências e afetar de forma negativa o próprio processo de Transferência de Tecnologia.

O foco deste trabalho está relacionado exatamente a essa questão de harmonização dos documentos necessários para a transferência, estabelecimento e parâmetros de estabilidade do banco de células que expressam o IFN- α 2b humano

recombinante. Ao se propor na harmonização as exigências relativas à construção dos bancos têm-se a possibilidade real da garantia da segurança e eficácia do produto nacionalizado, no que se refere ao banco de células.

A experiência das duas agências regulatórias (ANVISA/CECMED) que se reúnem anualmente para acompanhamento do processo de transferência de tecnologia abrange também a experiência dos Institutos de Pesquisa e dos profissionais que coordenam o projeto de transferência. Este estudo se preocupou antecipadamente com esta questão e seu resultado visa dar apoio e sustentar as ações que estejam diretamente envolvidas com o banco de células produtor do IFN- α 2b humano recombinante e seu sistema hospedeiro (vetor de expressão e célula hospedeira – *E. coli*). É importante ressaltar que a transferência do banco de células para Bio-Manguinhos ainda não ocorreu, apesar de várias ações já terem começado para esta etapa importante do projeto de transferência de tecnologia do IFN- α 2b humano recombinante.

A falta de requerimentos específicos ou mesmo de um *check-list* de ensaios essenciais a serem executados (no caso da Transferência de Banco de Células), somado ao fato das normas existentes relacionadas ao tema não serem suficientemente claras, objetivas e completas, justifica a descrição de requisitos, de forma que essa não seja redundante e tão pouco exaustiva e custosa, mas que garanta a qualidade e eficácia do produto gerado.

Pensando de forma mais ampla, para que esta experiência possa contribuir também com o cenário nacional de produção de biofármacos, procuramos agrupar determinados conceitos e expor os mesmos na forma de questionário para as Agências Reguladoras de diferentes países, bem como para a comunidade científica e desta forma elencar pontos fundamentais para a Transferência, Registro Sanitário, Estabelecimento e Parâmetros de Estabilidade de Bancos Celulares.

Entendemos desta forma que estaremos ajudando com nossa experiência a definir alguns aspectos, mesmo sabendo que cada caso possui particularidades especiais e pode ser discutido separadamente com os Marcos Regulatórios.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é elencar os Requerimentos Fundamentais para a Transferência, Registro Sanitário, Estabelecimento e Parâmetros de Estabilidade dos Bancos de Células de *E. coli* recombinante para a produção do interferon alfa 2b humano recombinante em Bio-Manguinhos, a fim de se nacionalizar a sua produção.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos têm como finalidade:

- a) Propor os Requerimentos Fundamentais capazes de atender às exigências Regulatórias da Transferência de Tecnologia, no que tange o Translado, Registro Sanitário, Estabelecimento e Parâmetros de Estabilidade dos Bancos de Células, levando em consideração as exigências dos Marcos Regulatórios dos países envolvidos na referida Transferência;
- b) Garantir que as análises descritas neste modelo assegurem a qualidade, eficiência, eficácia e segurança do produto final, no que diz respeito aos prováveis desvios de qualidade que os Bancos de Células podem proporcionar e;
- c) Verificar se existe alguma norma regulamentadora de biogênicos/biossimilares que especifique os Requisitos que os Bancos de Células devem atender para que o fabricante registre seu

produto como tal. E, caso já exista, realizar o exercício de comparação dos Requisitos estabelecidos com os testes elencados neste trabalho.

3 Metodologia

O trabalho foi composto de cinco fases distintas e subseqüentes, a saber:

1. Na primeira fase foi realizado um levantamento bibliográfico a fim de se investigar quais seriam os aspectos importantes que deveriam estar contidos no questionário.
2. Na segunda fase ocorreu a elaboração e o envio de um questionário para os pesquisadores da comunidade científica e diferentes entidades regulatórias.
3. A terceira fase consistiu na análise dos resultados gerados do retorno dos questionários.
4. Na quarta fase, baseado nos resultados gerados na fase anterior, foram elencados e descritos os Requerimentos Fundamentais para Transferência, Registro Sanitário, Estabelecimento e Parâmetros de Estabilidade de Bancos de Células de *E. coli* recombinante.
5. Na quinta e última fase é realizado um levantamento bibliográfico a fim de se verificar se já existe alguma legislação pertinente ao registro de produtos biogénicos/biossimilares que especifique os Requisitos que os Bancos de Células devem atender para se registrar o produto como tal. E, caso exista, fazer uma comparação destes com os Requerimentos que foram descritos na 3ª fase.

Vale ressaltar que o atendimento à conformidade dos Bancos de Células representa apenas uma parte da bateria de ensaios a ser executada por uma empresa farmacêutica, quando a mesma realizar a petição de registro de produto como biogénico/biossimilar.

3.1 1ª Fase: Levantamento bibliográfico preliminar

Primeiramente foi realizado um levantamento bibliográfico com o intuito de selecionar os principais aspectos relacionados ao BCM e BCT que deveriam estar presentes no questionário.

Como fonte de coleta de dados foi utilizada principalmente documentos de diversas Agências Regulatórias, além de artigos científicos que tratavam deste tema.

3.2 2ª Fase: Questionário

Segundo Parasuraman (1991), um questionário é tão somente um conjunto de questões, feito para gerar os dados necessários para se atingir os objetivos do projeto. Embora o mesmo autor afirme que nem todos os projetos de pesquisa utilizam essa forma de instrumento de coleta de dados, o questionário é muito importante na pesquisa científica.

É adotado o questionário, pois, segundo Marconi e Lakatos (1996) este instrumento possibilita a racionalização do tempo de preenchimento do respondente, facilita a aplicação simultânea em várias empresas, consegue atingir maior abrangência territorial com economia de recursos financeiros.

3.2.1 Etapas para elaboração do questionário

3.2.1.1 Tipos de amostras

Para a realização da pesquisa ora apresentada optou-se por amostras não probabilística, isto é, a escolha dos elementos não foi feita aleatoriamente, por julgamento - proposital, tipicidade - (Marconi e Lakatos, 1996; Levin, 1987).

Foram escolhidos pesquisadores da comunidade científica que reconhecidamente trabalham ou já trabalharam com a expressão heteróloga de proteínas em *E. coli*. No caso das Agências Regulatórias selecionadas, optou-se, por razões óbvias pela agência nacional e por agentes de países dotados de uma regulamentação sanitária específica para o registro de biofármacos (biomedicamentos ou medicamentos biotecnológicos).

3.2.1.2 Tipo de questionário

A escolha do “Questionário Estruturado Não Disfarçado” foi fundamentada no que é preconizado por Marconi e Lakatos (1996). Ressalta-se que para os referidos pesquisadores tal tipo de questionário é padronizado, ou seja, apresenta questões de múltipla escolha, e o respondente sabe qual é o objetivo da pesquisa, o que lhe dá maior credibilidade.

3.2.1.3 Tipos de questões

Após um estudo bibliográfico, optou-se pela utilização de questões de múltipla escolha, pois, segundo Mattar (1994), oferece as seguintes vantagens:

- a) Facilidade de aplicação, processo e análise;
- b) Facilidade e rapidez no ato de responder e;
- c) Apresentam pouca possibilidade de erros.

Além disso, outros benefícios são incluídos, como: proporcionar uma exploração em profundidade do tema abordado e abordar vários tópicos do mesmo assunto.

3.2.1.4 Redação das questões

Durante a elaboração das questões foram tomados os seguintes cuidados: utilização de uma linguagem clara e de fácil entendimento; com termos técnicos específicos, porém de conhecimento dos profissionais que atuam na área; objetividade, utilizando uma linguagem precisa e estética; verificação se a pergunta era importante para a pesquisa e a análise sobre a necessidade de perguntas adicionais sobre o assunto (Alreck e Settle, 1995; Carnevalli e Cauchick Miguel, 2001; Marconi e Lakatos, 1996; Mattar, 1996).

Ressalta-se que todas as perguntas foram formuladas com base nos Regulamentos Técnicos de diversas Agências Regulatórias e artigos científicos pertinentes.

3.2.1.5 Ordem das questões

As perguntas foram agrupadas e ordenadas em dois grandes grupos:

- a) 1º grupo: referentes às informações consideradas necessárias ao fabricante do biofármaco IFN- α 2b humano recombinante para Translado e Estabelecimento dos Bancos de Células de *E. coli*, e
- b) 2º grupo: referem-se às análises que potencialmente devem ser realizadas pelo fabricante do biofármaco, relativas aos Parâmetros de Estabilidade dos Bancos de Células.

3.2.1.6 Instrução de preenchimento

No tópico de cada pergunta foi dada ao respondente a opção de assinalar o número de alternativas que julgar necessário, e não apenas uma.

3.2.1.7 Pré-teste

Antes da decisão do *layout* final do questionário, um pré-teste do mesmo foi realizado com 3 (três) profissionais de Bio-Manguinhos. Os referidos profissionais eram da área de Pesquisa e Desenvolvimento, com vasta experiência em Biologia Molecular e Expressão de Proteínas, e a intenção era procedermos a uma análise crítica do questionário.

Sabe que a realização de pré-teste feita como instrumento de coleta de dados tem como principal objetivo o aperfeiçoamento do mesmo. Sendo assim, o pré-teste é uma ferramenta bastante valiosa para verificar se: as questões não geram dúvidas ou vieses; não causam embaraço – isto é, se elas estão claras; e se seqüência das questões é adequada e se existe a necessidade de criar novas questões ou retirar algumas (Boyd e Wetfall, 1964; Marconi e Lakatos, 1996; Mattar, 1996; Oliveira, 1997).

O questionário foi encaminhado por e-mail, depois de uma prévia conversa telefônica. Após um prazo acordado, os pesquisadores enviaram suas respostas e sugeriram algumas modificações no instrumento de coleta de dados, com o intuito de não deixar margem de dúvida nas perguntas formuladas.

O pré-teste é uma prática também apoiada por Chagas (2008), que considera a hipótese de ser provável que não se consiga prever todos os problemas e/ou dúvidas que podem surgir durante a aplicação do questionário. Este mesmo autor afirma que, sem o pré-teste, pode haver grande perda de tempo, dinheiro e credibilidade caso se constate algum problema grave com o questionário já na fase

de aplicação. Nesse caso o questionário terá que ser refeito e estarão perdidas todas as informações já colhidas.

Outras possíveis falhas também podem ser detectadas neste tipo de revisão:

- a) Inconsistência ou complexidade das questões;
- b) Ambigüidades ou linguagem inacessível;
- c) Perguntas supérfluas ou que causem embaraço ao informante;
- d) Questões que não obedeçam a uma determinada ordem, e
- e) Se são muito numerosas.

Além dos autores já mencionados, Goode e Hatt (1972) também apóiam esta idéia, afirmando que nenhuma quantidade de pensamento, não importa quão lógica seja a mente e brilhante a compreensão, pode substituir uma cuidadosa verificação empírica.

3.2.1.8 *Layout final*

Após os ajustes no questionário, baseadas nas sugestões feitas pelos pesquisadores de Bio-Manguihos, foi finalizada a sua versão final (Anexo I).

3.2.2 Envio dos questionários

O questionário foi encaminhado por correio eletrônico a 12 Agências Regulatórias, de vários países, dirigido a um profissional especializado na área de Produtos Biológicos, além de 16 experientes pesquisadores da FIOCRUZ, da UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro) e de empresa do ramo privado. Os entrevistados foram escolhidos baseados na sua familiaridade com projetos na área de Biologia Molecular, especificamente na expressão heteróloga de proteínas em *E. coli*.

Os seguintes cuidados foram tomados: verificou-se se os participantes tinham ou não o conhecimento técnico necessário para responder as questões (Boyd e Wetfall, 1964; Marconi e Lakatos, 1996) e foi explicitado o tempo estimado para o preenchimento do questionário, no intuito de se eliminar eventual ansiedade por parte dos respondentes (Machado *et al.*, 2007). Foi estipulado o prazo de um mês para que os profissionais respondessem e retornassem o questionário.

Também foi esclarecido que se o respondente não se sentisse em condições de responder aos questionamentos técnicos ele poderia entrar em contato com o solicitante para esclarecimentos ou abdicar de respondê-los.

Com o intuito de se melhorar o índice de retorno dos questionários, a pesquisa adotou o procedimento de enviar junto com o questionário uma carta apresentando os objetivos da pesquisa (Mattar, 1996).

Após a expiração do prazo de entrega dos questionários, foi enviado outro e-mail de “cobrança” para aqueles pesquisadores que eventualmente não haviam retornado.

A relação das Agências Regulatórias (ou departamento da mesma) participantes da pesquisa é apresentada na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Relação das Agências Regulatórias contempladas para preencher o questionário

Agência Regulatória	País
ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica)	Argentina
ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)	Brasil
BGTD (Biologics and Genetic Therapies Directorate)	Canadá
ISPCH (Instituto de Salud Pública de Chile)	Chile
INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos)	Colômbia
CECMED (Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos)	Cuba
AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios)	Espanha
DRCPFA (Departamento de Regulación y Control de Productos Farmacéuticos y Afines)	Guatemala
SALUD (Secretaría de Salud)	México
OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde)	Países das Américas
DIGEMID (Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas)	Peru
INHRR (Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”)	Venezuela

3.3 3ª Fase: Análise dos resultados

3.3.1 Tabulação dos dados

Após o retorno dos questionários, antes de sua análise, houve a verificação dos dados e tabulação. Segundo Mattar (1996), verificação consiste em analisar se todas as questões foram respondidas, se o respondente seguiu corretamente as instruções de preenchimento, e se existe coerência nas respostas. Caso

aparecesse algum (s) deste (s) problema (s), a equipe da pesquisa entraria em contato com o respondente.

A tabulação significa organizar os dados em tabelas, por meio da codificação, a fim de tornar mais fácil a análise. Neste caso, a codificação foi feita atribuindo-se números para designar a resposta do questionário: o número 1 foi escolhido para as respostas assinaladas pelo respondente e número 2 para aquelas não assinaladas.

O recurso utilizado foi o meio eletrônico, onde cada questão foi recriada em tabelas do aplicativo Windows[®] Excel, existindo uma coluna, para cada opção de respostas das questões fechadas. A tabulação foi feita seguindo-se a mesma seqüência dos agrupamentos e blocos contidos no questionário, com o propósito de manter a lógica dos objetivos pretendidos pelas questões, conforme é recomendado por Malhotra (2001).

3.3.2 Tratamento dos dados

Após a tabulação dos dados, o questionário foi dividido em 10 blocos (segundo-se a seqüência já estabelecida) para facilitar a análise. Dessa forma, o bloco A representa o item 1.1 do questionário, o bloco B o item 1.2 e assim sucessivamente.

As opções contidas em cada bloco foram codificadas por um número, seguindo-se a seqüência do questionário. Assim, o número 1 representa a primeira opção do item 1.1 (bloco A), o número 2 a segunda opção do bloco A e assim sucessivamente. O questionário está disposto no Anexo I, com os blocos e codificação representados.

A seguir, foi realizada a distribuição de freqüência simples das variáveis do questionário, e, com base nesses resultados, foram selecionados os itens que tiveram um percentual de marcação superior a 50% para fazerem parte da terceira etapa desse trabalho. Esse percentual foi atribuído com a intenção de ser realizar uma harmonização entre as respostas, já que esse é o objetivo do trabalho.

Como forma de explorar mais os dados obtidos e validar a pesquisa foi determinada a percentagem média das variáveis assinaladas em cada bloco do questionário e a percentagem de variáveis assinaladas pelos respondentes, utilizando-se o aplicativo Statistic. Para facilitar a interpretação dos resultados foram criados gráficos no aplicativo Windows[®] Excel representando as percentagens já determinadas.

3.4 4ª Fase: A pesquisa qualitativa e o caráter bibliográfico-descritivo

Após a análise dos dados gerados do questionário, a pesquisa passou a ter um caráter bibliográfico-descritivo. Isto é, as características apontadas pelos pesquisadores e Agências Regulatórias foram investigadas e analisadas mais profundamente com o objetivo de se descrever os Requerimentos Fundamentais para a Transferência, Registro Sanitário, Estabelecimento e Parâmetros de Estabilidade dos Bancos de Células de *E. coli* recombinante em Bio-Manguinhos.

Trata-se, portanto, de uma pesquisa qualitativa, pois, segundo Moreira e Caleffe (2006), a pesquisa qualitativa é aquela que busca entender um fenômeno específico em profundidade. Ao invés de estatísticas, regras e outras generalizações, a qualitativa trabalha com descrições, comparações e interpretações. A pesquisa qualitativa é mais participativa e, portanto, menos controlável. Os participantes da pesquisa podem direcionar o rumo da pesquisa em suas interações com o pesquisador.

Vale ressaltar que, mesmo utilizando um questionário fechado a pesquisa tem uma abordagem qualitativa, pois, como assinala Triviños (1987), sem dúvida alguma o questionário fechado também pode ser utilizado na pesquisa qualitativa.

O caráter bibliográfico é justificado por Cervo e Bervian (1983), que afirmam que toda pesquisa bibliográfica constitui parte de uma pesquisa descritiva ou experimental enquanto é feita com o intuito de recolher informações e conhecimentos prévios acerca de um problema para o qual se procura resposta ou acerca de uma hipótese que se quer experimentar.

De acordo com Pádua (2004) a finalidade da pesquisa bibliográfica é colocar o pesquisador em contato com o que já se produziu a respeito do seu tema de pesquisa. Assim, a pesquisa bibliográfica é imprescindível para qualquer pesquisa científica (Tognetti, 2006).

Para Dane (1990) o caráter descritivo tem sua aplicabilidade quando a pesquisa envolve o exame de um fenômeno para defini-lo mais profundamente, ou para diferenciá-lo de outros fenômenos. De acordo com Rudio (1978), a pesquisa descritiva é a que mais se adapta quando se pretende descrever e interpretar fenômenos.

Na pesquisa descritiva as informações são observadas, registradas, analisadas e correlacionadas, sem serem, contudo, manipuladas (Cervo e Bervian, 1983).

Neste trabalho, para a coleta de informações são utilizadas as fontes de papel, que contém as pesquisas documentais e bibliográficas (Gil, 1991). Consideram-se aqui as definições de documento no seu sentido mais amplo, como sendo toda e qualquer base de conhecimento fixada materialmente e acessível para consulta (Pádua, 2004).

Os documentos mais explorados durante a execução da pesquisa são livros, farmacopéias, periódicos, *sites* especializados no objeto de estudo (incluindo os de Agências Regulatórias), assim como trabalhos similares com aplicação desse tema.

Assim, para se atingir o objetivo proposto, a abordagem qualitativa e bibliográfico-descritiva é a mais adequada, pois a pretensão é definir uma metodologia por meio da coleta, observação, análise e correlação das informações sem, no entanto, manipular ou modificar os elementos pesquisados.

Vale ressaltar que a eleição dos requisitos especificados neste trabalho não esgota todas as possibilidades que podem ser estabelecidas para o Controle dos Bancos de Células, nem tampouco para o registro de um produto biotecnológico.

3.5 5ª Fase: Os Requerimentos dos Bancos de Células no contexto dos biogênicos/biossimilares

Esta fase da pesquisa tal qual a terceira, também apresentou um caráter bibliográfico-descritivo. Primeiramente, foram investigados quais são os critérios que as Agências Regulatórias estão adotando para classificar os produtos como biogênicos ou biossimilares. Inclusive esse levantamento bibliográfico inicial já foi exposto no Capítulo da Introdução deste trabalho.

O objetivo principal é verificar se existe alguma norma que contenha os Requisitos que os Bancos de Células devem atender, como parte das exigências estabelecidas por Agências Regulatórias, para ser registrado como biogênico ou biossimilar. E, no caso da existência de tal (is) norma (s), realizar uma comparação com o que foi proposto.

Como fonte de coleta de dados é utilizada: os próprios sítios das Agências Regulatórias; sítios afins, como o da OMS e OPAS; e artigos específicos que tratam desse tema. A relação das Agências que foram consultadas está descrita na tabela a seguir.

Tabela 3.2 Relação das Agências Regulatórias que serviram como fonte de coleta de dados

Agência Regulatória	País
ANMAT (Administração Nacional de Medicamentos, Alimentos e Tecnologia Médica)	Argentina
TGA (Administração de Produtos Terapêuticos da Austrália)	Austrália
ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)	Brasil
HC (Health Canada)	Canadá
ISPCH (Instituto de Saúde Pública do Chile)	Chile
INVIMA (Instituto Nacional de Vigilância de Medicamentos e Alimentos)	Colômbia
CECMED (Centro para o Controle Estatal de Qualidade dos Medicamentos)	Cuba
EMA (Agência Europeia de Medicamentos)	Diversos Estados-Membros da Europa
FDA (Administração Federal de Alimentos e Medicamentos)	Estados Unidos da América
MSPAS (Ministério da Saúde Pública e Assistência Social da República de Guatemala)	Guatemala
NIHS (Instituto Nacional de Ciências da Saúde)	Japão
SALUD (Secretaria de Saúde)	México
INHRR (Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”)	Venezuela

Fonte: Confecção própria

4 Resultados e Discussão

Este capítulo é apresentado em quatro etapas, conforme o trabalho foi elaborado:

1ª etapa: avaliação do retorno dos questionários;

2ª etapa: tratamento dos dados e seleção dos itens que farão parte da 3ª etapa;

3ª etapa: descrição dos Requerimentos Fundamentais para Transferência, Registro Sanitário, Estabelecimento e Parâmetros de Estabilidade dos Bancos de Células de *E. coli* recombinante em Bio-Manguinhos;

4ª etapa: discussão das normas encontradas que ditam as diretrizes para registro de produto como biogênico ou biossimilar, nas quais estão descritas os Requerimentos para os Bancos de Células, assim como uma comparação geral com o que foi proposto na 3ª etapa.

4.1 1ª etapa: Retorno dos questionários

Dos 28 questionários enviados, apenas 11 foram respondidos, tendo-se um índice de retorno geral de 39,3%. Todos os questionários recebidos foram corretamente respondidos, conforme as instruções recomendadas.

Desses 11 respondidos, 10 referem-se a respostas enviadas pelos pesquisadores entrevistados e apenas 1 deles foi respondido por uma Agência Reguladora (ANVISA). Sendo assim, o índice de respostas dos pesquisadores de 62,5%, enquanto que das Agências Regulatórias foi equivalente a 8,3%, o que não pode ser considerado representativo das Agências.

Apesar do baixo índice de retorno dos questionários, a pesquisa é válida, pois o retorno dado pela comunidade científica é considerado representativo, pois representa os anseios da Academia em relação ao assunto.

Complementado a justificativa, vale ressaltar que a Organização Mundial de Saúde, em uma de suas conferências, julgou necessária a participação da Academia Científica, junto às Autoridades Regulatórias, na elaboração de normas referentes à fabricação de produtos biotecnológicos (WHO, 2003).

Dessa forma, pode-se dizer que o conhecimento dos pesquisadores envolvidos contribuiu de maneira positiva e engrandecedora para a realização da 3ª etapa deste trabalho.

4.2 2ª etapa: Tratamento dos dados e Seleção de itens

4.2.1 Distribuição de frequência simples das variáveis

Abaixo estão representadas as tabelas de distribuição de frequência simples das variáveis. Os itens destacados em azul são aqueles que foram selecionados para fazerem parte da 3ª etapa do trabalho.

Tabela 4.1 Distribuição de frequência simples das variáveis do Bloco A

Código da questão	Frequência	Percentual
1	11	100
2	11	100
3	8	72,73
4	2	18,18
5	11	100
6	8	72,73
7	4	36,36
8	11	100
9	4	36,36
10	11	100
11	8	72,73

Tabela 4.2 Distribuição de freqüência simples das variáveis do Bloco B

Código da questão	Freqüência	Percentual
12	10	90,91
13	9	81,82
14	5	45,45
15	8	72,73
16	11	100
17	10	90,91
18	10	90,91
19	10	90,91
20	6	54,55
21	11	100
22	10	90,91
23	7	63,64
24	5	45,45
25	5	45,45
26	11	100
27	11	100

Tabela 4.3 Distribuição de freqüência simples das variáveis do Bloco C

Código da questão	Freqüência	Percentual
28	11	100
29	10	90,91
30	8	72,73
31	11	100
32	11	100
33	11	100
34	11	100
35	10	90,91
36	7	63,64
37	7	63,64
38	11	100
39	10	90,91
40	10	90,91
41	10	90,91
42	8	72,73

Tabela 4.4 Distribuição de freqüência simples das variáveis do Bloco D

Código da questão	Freqüência	Percentual
43	11	100
44	9	81,82
45	10	90,91
46	11	100
47	9	81,82
48	7	63,64
49	10	90,91
50	11	100
51	11	100
52	8	72,73

Tabela 4.5 Distribuição de freqüência simples das variáveis do Bloco E

Código da questão	Freqüência	Percentual
53	11	100
54	8	72,73
55	8	72,73

Tabela 4.6 Distribuição de freqüência simples das variáveis do Bloco F

Código da questão	Freqüência	Percentual
56	5	45,45
57	8	72,73
58	11	100
59	10	90,91
60	7	63,64
61	11	100
62	10	90,91
63	11	100
64	9	81,82

Tabela 4.7 Distribuição de freqüência simples das variáveis do Bloco G

Código da questão	Freqüência	Percentual
65	11	100
66	11	100
67	1	9,09
68	6	54,55
69	3	27,27
70	11	100
71	8	72,73
72	10	90,91

Tabela 4.8 Distribuição de freqüência simples das variáveis do Bloco H

Código da questão	Freqüência	Percentual
73	9	81,82
74	7	63,64
75	11	100
76	8	72,73

Tabela 4.9 Distribuição de freqüência simples das variáveis do Bloco I

Código da questão	Freqüência	Percentual
77	11	100
78	10	90,91
79	9	81,82
80	5	45,45
81	6	54,55
82	10	90,91
83	5	45,45
84	9	81,82

Tabela 4.10 Distribuição de frequência simples das variáveis do Bloco J

Código da questão	Frequência	Percentual
85	10	90,91
86	7	63,64
87	6	54,55
88	11	100
89	11	100

4.2.2 Seleção de itens

Conforme já mencionado anteriormente, os itens selecionados são aqueles que tiveram um percentual de marcação superior a 50% (destacados em azul), que representa as variáveis assinaladas pela maioria dos respondentes. Compreendemos dessa forma que estamos elencando os elementos considerados mais importantes a serem descritos neste trabalho. Podemos ainda dizer que estamos fazendo uma harmonização entre as respostas obtidas.

Os dados obtidos nos revelam que alguns itens foram selecionados por todos os respondentes, isto é, tiveram um consenso entre a Agência Regulatória (ANVISA) e todos os pesquisadores. Entendemos que esses itens com percentual de marcação igual a 100% representam elementos fundamentais a serem descritos.

Outros itens foram assinalados pela grande maioria dos respondentes (tendo um percentual de marcação igual a 90,91%) e outros pela maioria (percentual igual a 81,82% e 72,73%), sendo considerados importantes também serem descritos, já que a pesquisa em si elegeu pesquisadores com vasta experiência no tema abordado.

Outros elementos foram também elencados, apesar de não terem sido tão apontados quanto aqueles já citados, porém representam itens assinalados por mais de 50% dos respondentes. Tratam-se daqueles com percentual de marcação igual a 63,64% e 54,55%.

Complementando a análise, podemos verificar que outros itens tiveram um baixo percentual de marcação: 45,45%, 36,36%, 27,27%, 18,18%, chegando até 9,09% (assinalado por apenas um respondente). Podemos a princípio ter a(s) seguinte (s) suposição (ões) para explicar este baixo percentual:

- a) Que esses itens realmente não são muito importantes;
- b) Trata-se de análises que não são imprescindíveis e que necessitam de equipamento(s) muito caro, podendo ser difícil a obtenção do(s) mesmo(s);
- c) Referem-se a análises muito complexas e/ou dispendiosas;

- d) São análises desconhecidas pelos respondentes. Inclusive um deles fez esse comentário na devolução de um questionário, apesar de não especificar a qual item estava se referindo;
- e) A análise é inadequada ao objetivo do questionário. O item 67 (determinação da idade celular *in vitro*) é o exemplo desta afirmativa, pois esta análise é importante apenas quando se trabalha com células animais, e não de bactérias. Apenas atentamos para esta questão depois que o questionário havia sido enviado (inclusive não surgiu nenhum comentário no pré-teste) e ficou comprovado pelo baixíssimo índice de marcação: 9,09%;
- f) No caso dos seguintes itens relativos ao vetor: “métodos usados para construção do vetor”, “descrição detalhada da montagem do vetor” e “fonte de obtenção do vetor e histórico do mesmo”, pode-se dizer que os respondentes tiveram uma análise cuidadosa quanto aos mesmos, pois tratam-se de informações sigilosas da empresa.

4.2.3 Análise dos resultados obtidos

Complementando a análise realizada no item 4.2.1 (referente à distribuição de frequência simples das variáveis), apresentamos nas figuras 4.1 e 4.2, respectivamente, os gráficos da percentagem média das variáveis assinaladas em cada bloco do questionário e da percentagem de variáveis assinaladas pelos respondentes.

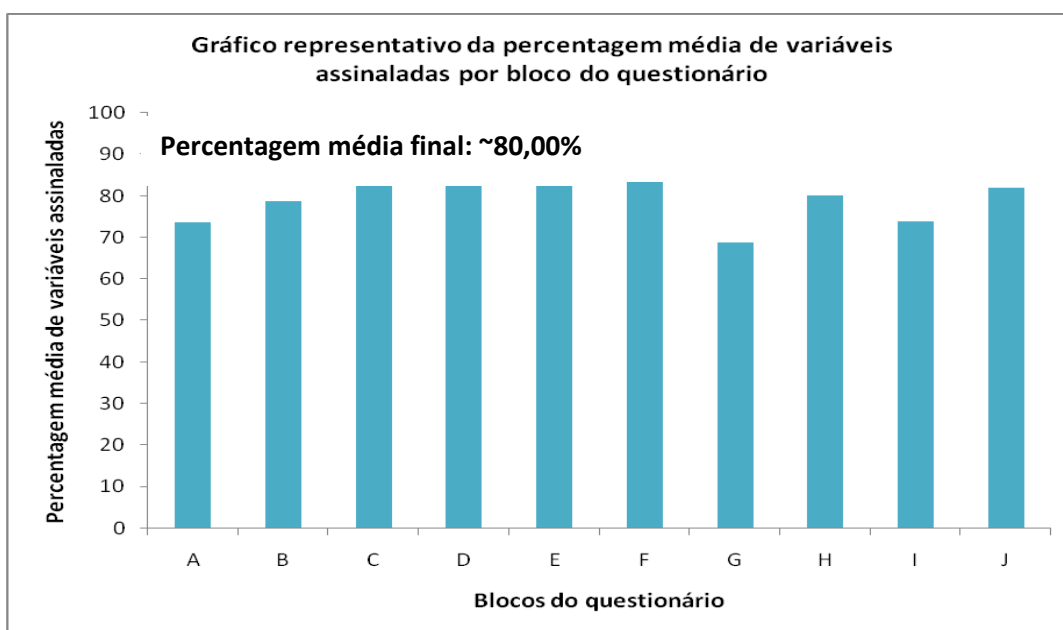


Figura 4.1 Gráfico representativo da percentagem de variáveis assinaladas por bloco do questionário

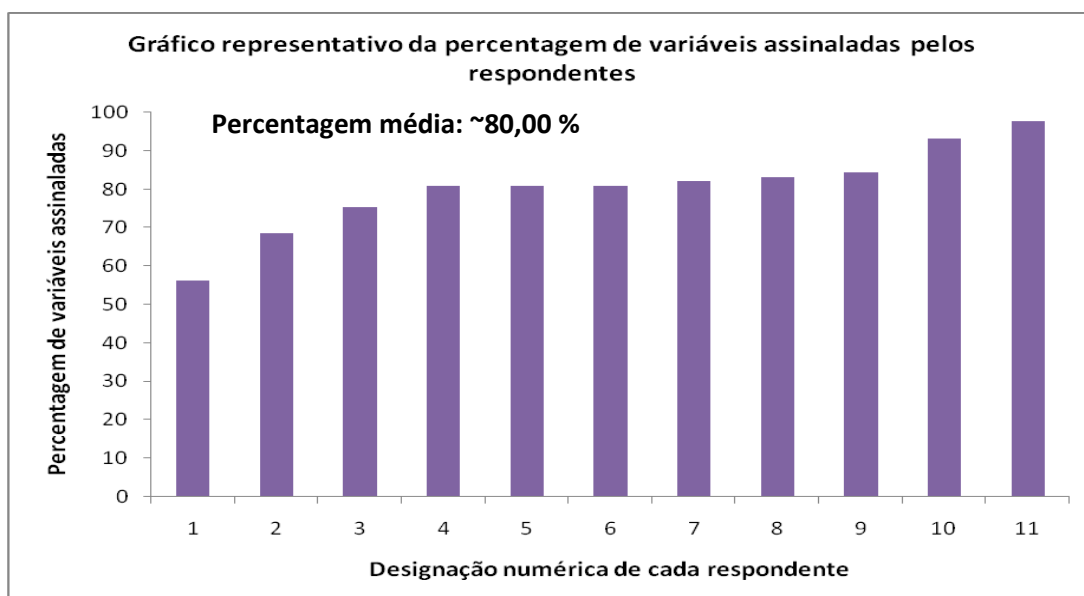


Figura 4.2 Gráfico representativo da percentagem de variáveis assinaladas pelos respondentes

Observando-se as figuras 4.1 e 4.2 podemos verificar que os respondentes assinalaram uma quantidade de variáveis que resultou numa média de aproximadamente 80%. Essa média foi considerada satisfatória para o contexto do trabalho, pois demonstra que os itens propostos se enquadraram no tema abordado, validando toda a pesquisa bibliográfica realizada. Essa afirmação é também comprovada pelo fato de nenhum respondente ter assinalado menos que 50% das questões propostas - o mínimo assinalado por um respondente foi igual a 56% (figura 4.2).

Observando-se a figura 4.1 podemos constatar que nenhum dos blocos do questionário teve uma percentagem média de questões assinaladas menor que 60% e, além disso, verifica-se que essa percentagem se mostrou homogênea entre os grupos, demonstrando que nenhum grupo ficou defasado em relação a outro. Assim, afirmamos que todos os blocos são importantes para o trabalho e que a fragmentação dos mesmos foi realizada de uma forma coerente.

4.3 3ª etapa: Descrição dos Requerimentos para os Bancos de Células

Esta etapa do trabalho foi dividida em duas partes. A primeira referia-se a um roteiro de informações relativas aos Bancos de Células, as quais o fabricante deve responder de maneira clara, objetiva e direta. Na segunda, encontravam-se descritos outros itens do questionário que foram investigados e analisados mais

minuciosamente, a fim de esclarecer alguns pontos que merecem ser mais detalhados, servindo de orientação para o fabricante.

Outro item, que não estava presente no questionário, foi acrescentado à segunda parte, pois foi visto após a elaboração do mesmo e considerado de suma importância estar presente. O item refere-se ao transporte do plasmídeo, célula hospedeira e Banco de Células até o Brasil.

4.3.1 1ª Parte: A coleta de informações

Considerando a importância de se garantir a qualidade do IFN- α 2b humano recombinante e a segurança da população que será beneficiada pelo referido medicamento, solicitamos aos entrevistados que respondessem sucintamente os itens a seguir:

4.3.1.1 Características relativas à célula hospedeira

- a) Descrição da espécie, subespécie e cepa bacteriana;
- b) Descrição da patogenicidade, produção de toxinas e outras informações referentes ao biorrisco, se existirem.
- c) Fonte de obtenção da célula: laboratório externo ou desenvolvimento próprio;
- d) Breve histórico da célula quanto seu emprego na produção de biofármacos;
- e) Procedimento utilizado para o cultivo bacteriano, incluindo a descrição do meio de cultura;
- f) Possibilidade de potencial contaminação cruzada com outros microorganismos.

4.3.1.2 Características relativas ao vetor plasmidial

- a) Identificação, origem e fonte de obtenção da célula de onde o gene que codifica a proteína foi obtido;
- b) Identificação e detalhes quanto ao isolamento do gene que será clonado;
- c) Descrição detalhada da montagem do vetor plasmidial;
- d) Fonte de obtenção do vetor e breve histórico do mesmo;
- e) Um mapa com a descrição e seqüência relevantes (promotores, terminadores de transcrição e/ou tradução, dentre outros, quando existirem) dos componentes do vetor destinado à expressão heteróloga de proteínas;

- f) Mapeamento das enzimas de restrição – ao menos dos sítios usados na construção do vetor;
- g) Fonte e funções dos componentes do vetor, como origem de replicação, genes de resistência aos antibióticos, promotores, indutores, dentre outros, caso haja;
- h) Quais regiões do vetor foram seqüenciadas, seja pelo fabricante ou obtida de fontes literárias/revendedores;
- i) Se a proteína é expressa ou não como uma proteína de fusão;
- j) Se o vetor expressa mais de uma proteína;
- k) Descrição do método de transformação adotado;
- l) Indicação se o vetor se encontra integrado no genoma ou extracromossomal.

4.3.1.3 Características relativas ao BCM e BCT

- a) Se a célula é aprovada por Autoridades de Controle Sanitário Nacional para produzir o biofármaco. No caso brasileiro as Autoridades são: ANVISA e CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança);
- b) Se os bancos de células são preparados pelo próprio fabricante ou adquiridos de fontes externas;
- c) Tamanho do banco de células preparado ou adquirido de fontes externas;
- d) Procedimento detalhado de seleção, isolamento da colônia, clonagem, amplificação gênica, adaptação da bactéria ao meio e às condições de cultura específicas, incluindo outros, quando houver – item relativo ao BCM;
- e) Origem, estocagem, utilidade e prazo de validade dos materiais utilizados na composição dos bancos de células;
- f) Data de obtenção do BCM e BCT;
- g) Origem e expectativa de vida dos bancos de células;
- h) Planejamento quanto ao uso dos bancos de células, considerando a viabilidade celular e expectativa de vida dos referidos bancos;
- i) Procedimentos utilizados durante o preparo dos bancos de células;
- j) Se existem condições de precauções de acidentes com as unidades dos frascos que constituem o banco de células, como: se estão situados em múltiplos congeladores e em localização distante (outro prédio ou unidade de fabricação); se utilizam reforço de energia e se dispõem de sistema automático de controle de temperatura;

- k) Breve descrição de como a documentação é gerenciada, de forma a permitir a rastreabilidade;
- l) Número de passagens do BCM até a obtenção do BCT;
- m) Número de passagens do BCT até a fase de cultivo em biorreator;
- n) Quantidade de BCT oriundo de cada BCM.

4.3.1.4 Características relativas à fase de subcultivo

- a) Frequência de subcultivos;
- b) Descrição dos materiais utilizados no subcultivo.

4.3.1.5 Características relativas à fase de produção

- a) Rendimento do produto formado;
- b) Estratégias usadas para promover e controlar a expressão do gene de interesse.

4.3.2 2ª Parte: Orientações descritivas

Como alguns itens que foram selecionados para fazerem parte deste roteiro do estudo qualitativo necessitavam ser mais detalhados, foi realizada uma busca em periódicos e normas regulatórias de vários países. A intenção era a apresentação de parâmetros que pudessem esclarecer e orientar a fabricação do produto considerando a Transferência de Tecnologia, subsídios relacionados ao Registro Sanitário bem como o estabelecimento e manutenção de *E. coli* recombinante.

4.3.2.1 Transporte do plasmídeo, célula hospedeira e BCM até o Brasil

No que se refere ao transporte do Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA) desde o CIGB (Cuba) até Bio-Manguinhos (Brasil) observou-se que tal procedimento já se encontra validado. Sendo assim, acredita-se que as recomendações pertinentes devem considerar as condições já adotadas para o transporte do plasmídeo, célula hospedeira e BCM, conforme os seguintes procedimentos:

- a) A temperatura do transporte deve ser mantida em – 70°C, com pequenas variações;

- b) Utilizar para o transporte caixas isotérmicas com poliuretano expandido (PUR) como elemento isolante, recoberta de polietileno de alta densidade com tampa e lacres; placas e flocos de gelo seco e monitor de temperatura contínuo, conforme especificações da Lei Nacional de Biossegurança 11.105 de 24 de março de 2005;
- c) Monitorar continuamente a temperatura e manter arquivados estes registros para uma eventual rastreabilidade.

4.3.2.2 Estocagem da célula hospedeira, plasmídeo, BCM e BCT

O resfriamento é fundamental para a conservação das características genótípicas e fenotípicas das cepas de *E. coli*. Dessa forma, é recomendado que tanto o plasmídeo quanto as células contendo meio e crioprotetor sejam refrigerados à - 70° C.

É sabido que um Banco de Células armazenado sob condições que asseguram sua estabilidade genética, evita alterações de suas características bioquímicas, bem como alterações na sua seqüência nucleotídica, na estabilidade plasmática e em suas características morfológicas. Além disso, retarda a morte dos microorganismos, previne a contaminação e mantém a viabilidade dos microorganismos (Pérez e Prieto, 2007).

Um estudo realizado pela *Roche Molecular Systems Culture Collection* (RMSCC) mostrou que a viabilidade celular e retenção plasmidial de células recombinantes de *E. coli* se mantiveram constantes quando BCM's foram estocados criogenicamente a uma temperatura de - 80°C por um período de 10 anos (Koenig, 2003).

Vale também ressaltar a importância dos Bancos serem estocados em separado, sempre mantendo uma cópia dos mesmos em outro lugar para evitar que algum tipo de incidente, tais como incêndio, falta de energia, etc destrua todo o Banco (Schiff, 2005).

4.3.2.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular é expressa pela seguinte fórmula:

Viabilidade = nº de colônias na placa x índice de diluição da amostra = nº de bactérias por mL. Sendo assim, sugere-se que a viabilidade celular seja avaliada tanto no BCM quanto no BCT.

O método mais comumente utilizado para se determinar a viabilidade celular é o plaqueamento em meio sólido ou também conhecido por semeadura em placas. Este método revela o número de colônias capazes de se multiplicarem e formarem colônias em meios de cultivo apropriados e sob condições de incubação adequadas. Cada colônia desenvolvida é suposta ter sido originada a partir de uma unidade viável.

Para uma maior precisão da análise somente deverão ser contadas as placas com número de colônias entre 30 e 300. Uma diluição da amostra deverá ser feita antes de se proceder a sua mistura com o meio de cultura, conforme representado na figura 4.3.

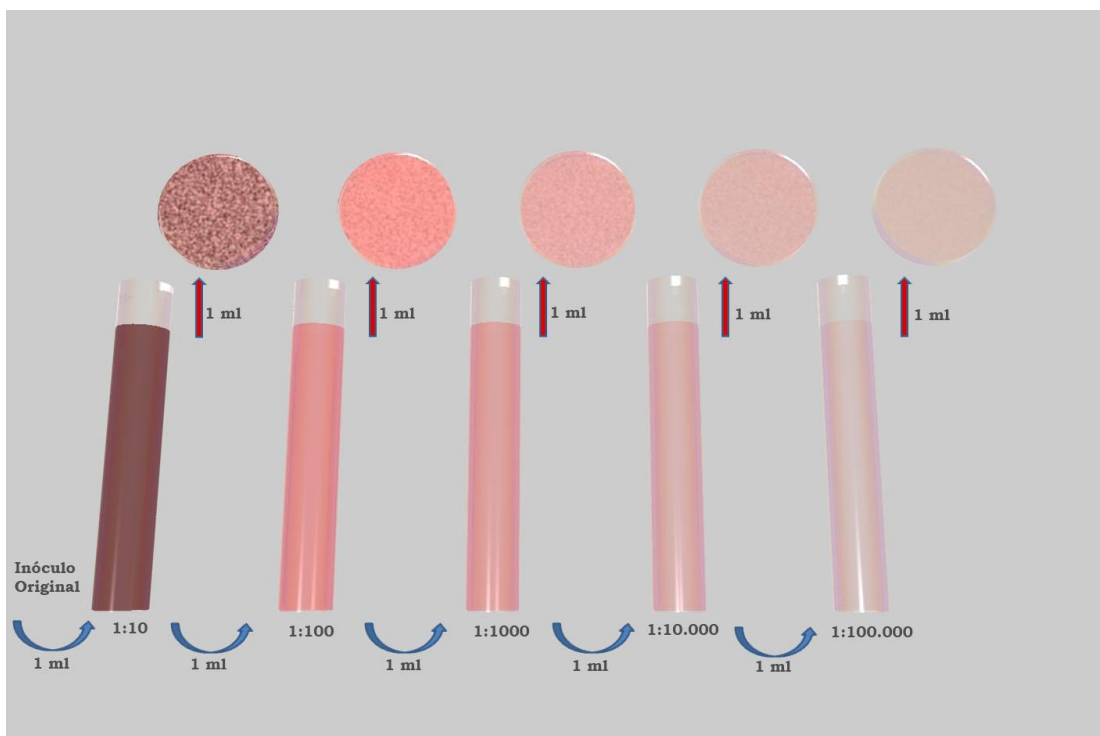


Figura 4.3 Representação do plaqueamento em meio sólido

Fonte: De La O, 2009

Dessa forma, o número de colônias assim determinado poderá ser utilizado na determinação de bactérias presentes nos Bancos de Células (Tortora *et al.*, 2000).

4.3.2.4 Crescimento da cultura

Uma das abordagens mais comuns no estudo do crescimento bacteriano é a obtenção de curvas de crescimento. Estas são representações gráficas do aumento do número de bactérias em um determinado período de tempo, que devem ser repetidas 3 vezes, sob as mesmas condições, para se obter um parâmetro estatisticamente confiável.

A curva de crescimento da Figura 4.4 representa as quatro fases do crescimento populacional bacteriano em uma situação próxima da real quando uma população de bactérias cresce em um ambiente fechado (modelo baseado no cultivo da bactéria *E. coli* em um meio de cultura rico e sob condições aeróbicas).

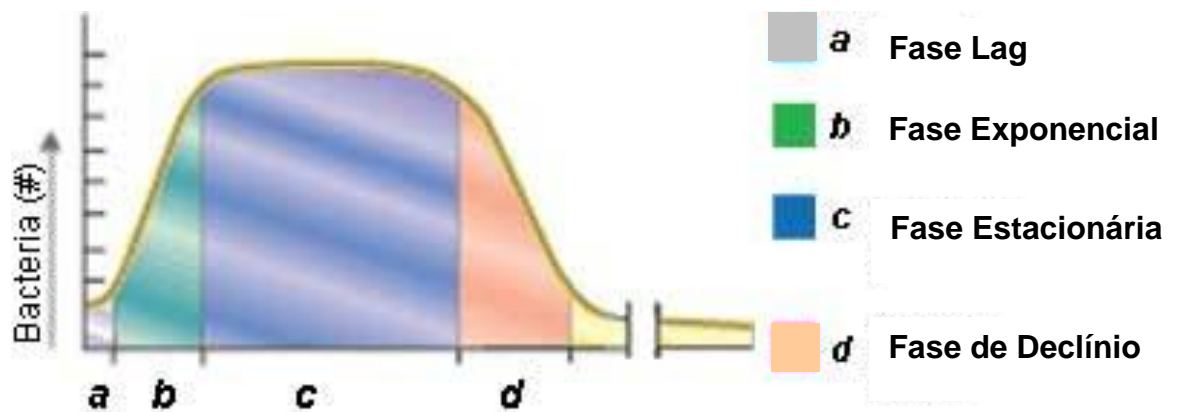


Figura 4.4 Curva de crescimento bacteriano

Fonte: Delaval, 2009

a) Fase Lag

Fase de adaptação metabólica ao novo ambiente; o metabolismo celular está direcionado para sintetizar as enzimas requeridas para o crescimento nas novas condições ambientais encontradas pelas células. O número de células não aumenta nesta fase, podendo até mesmo decrescer. A duração dessa fase depende das condições ambientais nas quais as células se encontravam anteriormente. A fase lag será tão mais longa quanto maiores as diferenças de composição do ambiente anterior ou se a população for constituída de bactérias esporuladas (Gava, 2002).

b) Fase Exponencial

Fase na qual o número de células da população dobra a cada geração. Esta taxa de crescimento não pode ser mantida indefinidamente em um sistema fechado. Após um determinado período de crescimento exponencial, as condições ambientais tornam-se desfavoráveis pela escassez de nutrientes essenciais, acúmulo de metabólitos tóxicos e limitação de espaço. À medida que a disponibilidade de nutrientes diminui as células se tornam menos capazes de gerar ATP (Adenosina Trifosfato) e a taxa de crescimento se reduz. A duração da fase exponencial é altamente variável dependendo tanto das características genéticas da bactéria quanto das condições ambientais (Gava, 2002).

c) Fase Estacionária

Fase em que a taxa de crescimento diminui significativamente devido às condições limitantes do meio. As células continuam metabolizando e se dividindo, mas parte das células torna-se inviável e a taxa de divisão celular é muito próxima da taxa de morte celular, o que mantém constante o número de células viáveis na população. A curva de crescimento atinge um platô. A duração da fase estacionária depende do balanço entre a taxa de divisão celular e o número de células que vão se tornando inviáveis (morte celular ou incapacidade de se dividir) devido às condições ambientais tornarem-se progressivamente desfavoráveis (Gava, 2002).

d) Fase de Declínio

Fase em que as células perdem a capacidade de se dividir, a taxa de morte celular torna-se maior que a taxa de divisão e o número de células viáveis decresce exponencialmente até a completa extinção da população. Nesta fase muitas células assumem formas incomuns. Em bactérias formadoras de esporos sobrevivem mais esporos que células vegetativas. A duração desta fase é variável dependendo tanto das características genéticas da bactéria quanto das condições ambientais (Gava, 2002; Madigan *et al.*, 2002).

4.3.2.5 Estabilidade plasmideal

Sugere-se que a estabilidade plasmideal seja monitorada no BCM e no BCT. Para o segundo esta deve ser cuidadosamente acompanhada na fase de subcultivo e na fase de produção, em intervalos determinados, até o final da produção.

A estabilidade plasmideal é definida como a capacidade da célula de manter seus plasmídeos. Dada a sua particularidade, ela é considerada um dos fatores mais importantes que determinam a habilidade de uma célula recombinante de expressar seus genes. Assim sendo, ela pode ser afetada por diversos componentes, tais como:

- a) Velocidade específica de crescimento das células hospedeiras e das células sem plasmídeo;
- b) Características genotípicas da cepa;
- c) Características estruturais do plasmídeo;
- d) Estresse do meio provocado nas células;
- e) Condições ambientais pré-existentes.

Dessa forma, deve-se considerar certa probabilidade (p) de perda do vetor a cada geração (duplicação celular).

Existem dois tipos básicos de instabilidade dos plasmídeos:

- a) Instabilidade de segregação, que é a perda do plasmídeo durante a divisão celular devida a uma má distribuição dos plasmídeos entre célula mãe e filha durante a divisão. Técnicas empregadas para evitar este tipo de instabilidade gênica tem sido o uso de seqüências de partição nos vetores, além do uso de vetores de alto número de cópias. Paradoxalmente, plasmídeos de alto número de cópias podem gerar instabilidade na cultura devido aos efeitos da superexpressão gênica. A melhor forma de evitar este efeito consiste em utilizarem-se vetores com promotores indutíveis, concomitantemente com o uso de cultura a alta densidade celular em batelada alimentada.
- b) Instabilidade estrutural, que é a perda causada por mudanças estruturais do plasmídeo, devido a deleções ou rearranjos do ADN, o que

pode acarretar a perda das funções genéticas desejadas. Geralmente, plasmídeos de grande tamanho, tendem a serem muito mais instáveis do que plasmídeos pequenos. Outro fator importante a ser levado em consideração é que vetores cujos genes de interesse estão sob controle de promotores de alta expressão, geralmente apresentam efeito adverso na estabilidade de vetores recombinantes, devido a dois fatores: a) um aumento da freqüência de transcrição induzida pelos promotores fortes que podem reduzir a eficiência da replicação plasmideal; b) elevada expressão do gene clonado perturba o metabolismo celular, reduzindo as taxas de crescimento celular das células com plasmídeo (Ayub, 2000; Zhang *et al.*, 1996).

4.3.2.6 Cinética da perda de plasmídeos em culturas com microrganismos recombinantes

O desenvolvimento de modelos matemáticos para descrever a instabilidade de plasmídeos em culturas microbianas é uma ferramenta que ajuda em muito o entendimento deste processo e a otimização das condições de operação de biorreatores com vistas a maximizar a produção celular e a expressão de genes clonados (Cooper *et al.*, 1987; Imanaka e Aiba, 1981; Satyagal e Agrawal, 1989; Zabriskie e Arcuri, 1986).

A teoria para o estudo da instabilidade de plasmídeos (Imanaka e Aiba, 1981) é resumida a seguir. A expressão que calcula a taxa (relação) entre células recombinantes (X^+) e células que perderam o vetor (X^-), é dada por:

$$\frac{X^-}{X^+} = \left[\frac{\mu^- / \mu^+}{2 - \sigma} \right]^n \frac{X_0^-}{X_0^+} + \left[\frac{\sigma}{2 - \sigma} \right] \frac{1 - \left[\frac{\mu^- / \mu^+}{2 - \sigma} \right]^n}{1 - \left[\frac{\mu^- / \mu^+}{2 - \sigma} \right]}$$

Onde σ é o número de células sem plasmídeo originadas das células com plasmídeo por geração (coeficiente de segregação), μ é a velocidade específica de crescimento das células e n o número de gerações.

4.3.2.7 Seqüenciamento do ADN

Visando o estabelecimento e manutenção do BCM e BCT, é fundamental que as seguintes regiões tenham o seu ADN seqüenciado:

4.3.2.7.1 Vetor plasmideal isolado e vetor presente no BCM

- a) Região que codifica o produto recombinante;
- b) Regiões flanqueadoras (promotores e indutores) e junções de inserção;
- c) Seqüenciamento a fim de analisar inserções e deleções.

4.3.2.7.2 Vetor plasmideal presente no BCT

- a) Região codificadora do produto recombinante

O método mais utilizado para a identificação de bases do ADN e o seu seqüenciamento é o método de terminação da cadeia, também conhecido por método didesoxi ou de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Ressalta-se que os métodos automatizados utilizam como referência a mesma técnica, no entanto fornecem respostas mais rápidas e seguras, uma vez que hoje existem várias ferramentas de alinhamento para comparação da seqüência gerada com a seqüência original clonada (Berg *et al.*, 2004).

4.3.2.8 Seqüenciamento da proteína formada

Na fase posterior à produção, a literatura sugere que a seqüência de aminoácidos da proteína deva ser determinada pela degradação de Edman e sua massa molar confirmada por meio da espectrofotometria de massa (Berg *et al.*, 2004; Farmacopéia Britânica, 2007; USP, 2008).

4.3.2.9 Confirmação da estrutura secundária da proteína

É sabida que a atividade biológica de uma proteína encontra-se diretamente relacionada à sua estrutura conformacional (Berg *et al.*, 2004).

Sendo assim, é de grande importância a confirmação da estrutura secundária da proteína obtida após a produção. Esta pode ser estimada por meio da técnica de dicroísmo circular (Woody, 1994).

4.3.2.10 Confirmação da estrutura terciária da proteína

Segundo a literatura pesquisada, a estrutura terciária de uma proteína, mais conhecida como estrutura 3D, pode ser determinada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e/ou Cristalografia de Raios X (Berg *et al.*, 2004).

4.3.2.11 Determinação da atividade biológica

Não há dúvidas de que este é um dos ensaios mais importantes quando nos referimos aos produtos derivados da tecnologia do ADN recombinante (USP, 2008).

No caso do IFN- α humano recombinante preconiza-se a avaliação da atividade antiviral em uma linhagem celular humana diplóide epitelial ou em linhagem celular humana de carcinoma de pulmão (USP, 2008).

O referido ensaio é desenvolvido por meio da incubação das referidas células, com o IFN- α em placas de microtitulação, as quais são subseqüentemente desafiadas com o vírus da encefalomiocardite (USP, 2008).

4.3.2.12 Pureza no BCM e BCT

Tais quais os medicamentos farmoquímicos, a ausência de contaminação por bactérias e fungos é um parâmetro que deve ser avaliado no BCM e no BCT.

Segundo o ICH (1995b), o desenvolvimento de testes específicos para detecção de agentes adversos nos bancos de células deve levar em consideração a literatura científica, fonte, métodos e materiais utilizados durante o cultivo, além de outros organismos presentes no laboratório.

Pérez e Prieto (2007) sugerem o método de coloração de Gram como um artifício para detecção de bactérias adversas à cultura. Contudo, no intuito de assegurar a ausência de contaminação, um programa de monitoramento do ambiente deve ser colocado no local de preparo dos Bancos de Células (Schiff, 2005).

4.3.2.13 Características genóticas e fenóticas

As características genóticas e fenóticas deverão ser verificadas na célula hospedeira, no BCM e no BCT (restabelecido, na fase de subcultivo, na fase de produção e no final da batelada).

O genótipo indica o estado genético do ADN em um organismo, enquanto que o fenótipo de uma cepa é um comportamento observado da constituição do genótipo (New England BioLabs, 2009).

Inúmeros marcadores genóticos que afetam diretamente características fenóticas já foram identificados para *E. coli* (New England BioLabs, 2009; MMBR, 2009; Promega, 2009).

No entanto, sabe-se que cada cepa de *E. coli* possui características genóticas específicas e devem ser bem estudadas para verificar, caso a caso, quais seriam os marcadores mais importantes de serem avaliados.

Apresentamos na tabela 4.11 algumas sugestões de marcadores genóticos de *E. coli* consideradas importantes.

Tabela 4.11 Marcadores genóticos de *E. coli*

Nome	Descrição	Efeito da mutação
<i>ara-14</i>	mutação no metabolismo da arabinose	bloqueia o catabolismo da arabinose
<i>dam</i>	mutação no ADN da enzima adenina metilase	bloqueia a metilação de resíduos na seqüência 5'...G ^m ATC...3'
<i>LysS</i>	o plasmídio pLysS se integra no genoma da célula hospedeira	células portadoras deste plasmídeo produzem a lisozima T7, um inibidor natural da ARN polimerase T7. Bloqueia a transcrição de seqüências que estão sob o controle do promotor da T7 ARN polimerase (Studier, 1991)
<i>galK</i> <i>gyrA96</i>	mutação na galactoquinase mutação na ADN girase	bloqueia o catabolismo da galactose confere resistência ao ácido nalidíxico
<i>lacIq</i>	superprodução da proteína do repressor <i>lac</i>	eleva substancialmente os níveis da proteína do repressor <i>lac</i> , inibindo a transcrição do promotor <i>lac</i>

Fonte: Promega, 2009

4.3.2.14 Preparação de 3 lotes do Ingrediente Farmacêutico Ativo

Este procedimento é muito importante, pois é necessário para caracterização do IFA e verificação da reprodutibilidade do processo.

Cada etapa deve ser realizada de acordo com normas específicas referentes a cada operação. Devem ser mantidos registros de todos os processos realizados, a fim de se realizar um estudo de validação e para uma futura rastreabilidade.

4.3.2.15 Periodicidade de análise do BCM e BCT

Procuramos exaustivamente este tópico na literatura, no entanto não conseguimos obter respostas conclusivas. Desta forma deixamos registrada a experiência do CIGB/Cuba, aprovada conforme a legislação vigente (CECMED) naquele país que recomenda no caso do IFN- α 2b humano recombinante que o BCM seja checado a cada 4 anos e o BCT a cada 2 anos.

4.4 4ª etapa: Biogênicos/Biossimilares e Requisitos para os Bancos de Células

Em vista do levantamento bibliográfico realizado a respeito do posicionamento das Agências Regulatórias na questão de biogênicos/biossimilares - apresentado na Introdução deste trabalho - podemos verificar que esse assunto é muito polêmico e que ainda não se dispõem de ferramentas e parâmetros eficazes para classificar um produto biotecnológico como um “biogênico”.

Isso faz com que as Agências Regulatórias decidam por si só qual termo adotar para novos biofármacos que estão surgindo no mercado após a expiração das patentes dos medicamentos inovadores.

Podemos notar que, de uma forma geral, as Agências Regulatórias dos países em desenvolvimento, como Argentina e México, tendem a adotar uma postura de considerar o produto biotecnológico “cópia” do inovador um verdadeiro biogênico.

Por outro lado, notamos que as Agências Regulatórias dos países desenvolvidos, como EUA e dos integrantes da União Européia, procuram adotar uma postura mais cautelosa no registro dos produtos biotecnológicos. Tais Agências consideram os biofármacos registrados após a expiração das patentes dos medicamentos inovadores, apenas como um biossimilar, apesar de terem atribuídos, de uma maneira geral, termos diferentes para a classificação dos mesmos. Além disso, avaliam caso a caso e determinam parâmetros diferentes para o registro dos

biofármacos, dependendo da complexidade da molécula e grau de conhecimento da mesma, por exemplo.

Essa postura adotada pelos países em desenvolvimento pode ser devido à imaturidade no assunto ou à percepção de que a entrada dos biogênicos no mercado beneficiará as classes econômicas mais desfavorecidas do país, que normalmente são as predominantes.

Pensar que os “biogênicos” terão uma disparidade tão grande de preço, conforme ocorre com os medicamentos químicos de referência e os genéricos, é pura ilusão, de acordo com Nothenberg (2008), que acredita que a diferença de preço entre o biofármaco de referência e o biossimilar deverá estar situada na faixa de 10% – 20%, enquanto que esta mesma medida se situa entre 40% – 80% no caso dos medicamentos químicos.

Importante comentar que apenas a EMEA possui normas específicas para o cadastramento dos interferons alfas recombinantes biossimilares (EMEA, 2006a; EMEA, 2006b). Sendo que os interferons alfas 2b recombinantes que solicitarem o cadastramento nessa Agência devem realizar o exercício de comparação com o produto Intron A[®], considerado o biofármaco de referência.

Considerando ainda o levantamento bibliográfico, notamos que apenas a EMEA (que adota a classificação de biossimilar) estabelece os Requisitos a serem cumpridos pelo fabricante no que diz respeito aos Bancos de Células de procariotos, que estão descritos em: Diretriz 2001/83/EC do Parlamento e Conselho Europeu; ICH Tópico Q5B e ICH Tópico Q5D (ICH, 1995a; ICH, 1995b; Parlamento e Conselho Europeu, 2001).

Como essas normas foram consultadas na elaboração do questionário integrante deste trabalho, diversas diretrizes estabelecidas por essas regulamentações constam nos Requerimentos Fundamentais apresentado na 3ª etapa.

5 Conclusões/Perspectivas

O emprego de biofármacos no tratamento de inúmeras doenças é uma realidade do mundo atual e sua crescente demanda vem acompanhada de várias exigências estabelecidas pelos Marcos Regulatórios, que se preocupam com a saúde e bem-estar da população.

Por outro lado, existem ainda poucas normas estabelecidas mundialmente no que tange os produtos biotecnológicos, comparadas às legislações relativas aos medicamentos farmoquímicos. E isso é bem notável no Brasil, que está começando a instituir diretrizes direcionadas à fabricação e controle de biofármacos.

Podemos ainda afirmar que a pesquisa não pôde ser validada por parte das Agências Regulatórias. Mas, como tivemos contato com as opiniões da comunidade científica, podemos pressupor que os itens estabelecidos no referido trabalho provavelmente serão aqueles selecionados pelas referidas Agências.

Dessa forma, o presente trabalho pode ser considerado como um passo importante para a compreensão e a determinação de parâmetros considerados impactantes no que se refere ao processo produtivo de moléculas obtidas por meio da tecnologia de ADN recombinante, pois:

- a) Propuseram requerimentos fundamentais relacionadas ao BCM, que é o instrumento primordial na fabricação de produtos derivados da tecnologia do ADN recombinante, diretrizes essas não especificadas ainda em legislação brasileira. Além disso, o estudo qualitativo contou com a participação de pesquisadores experientes da área de biologia molecular, isto é, os itens na foram escolhidos ao acaso;
- b) Encontra-se diretamente relacionado a um processo de transferência de tecnologia, o qual beneficiará milhões de brasileiros, e irá nortear a proposta de Bio-Manguinhos para as Agências Regulatórias envolvidas nesse processo

(ANVISA e CECMED) no que tange ao traslado e estudo de estabilidade do referido banco de células;

- c) O levantamento bibliográfico feito permitiu uma melhor visualização do panorama mundial relacionado à questão de registro de biogênicos e biossimilares, a qual não está contemplada em nossa legislação;
- d) A identificação do Estabelecimento e Estudo de Estabilidade de um Banco de Células no registro de um produto biogênico/biossimilar;
- e) A obtenção de um conhecimento vasto sobre o tema, o que nos permitirá ampliar a pesquisa, vislumbrando a possibilidade de determinar também os requisitos importantes relacionados a Banco de Células de Mamíferos, uma vez que a Instituição possui projetos utilizando células de mamífero para desenvolvimento ou mesmo produção de proteínas de uso farmacêutico.

Podemos afirmar que este trabalho pode contribuir inicialmente na elaboração de uma normativa/requerimentos que contenham as diretrizes relacionadas a Banco de Células de organismos procaríotos. Além disso, reconhecemos que os parâmetros propostos pelo presente trabalho não esgotaram as possibilidades para definir com total clareza a segurança, qualidade e utilização do produto. Sabe-se que tal determinação é possível somente após a realização de testes pré-clínicos e clínicos dos quais se destacam os de não-inferioridades, recomendados por diversas Agências Regulatórias.

Concluindo, podemos afirmar que o estudo qualitativo contempla as diretrizes a serem seguidas pelo fabricante no registro de um produto biossimilar, de acordo com o que já foi estabelecido mundialmente. Além disso, os requerimentos elencados podem servir de apoio na demonstração de similaridade. Isto é, na comparação que deve ser realizada entre o produto de referência e sua cópia (EMEA, 2005a; EMEA, 2005b).

6 Referências Bibliográficas

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. **Imunologia celular e molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2003.

Alreck PL, Settle RB. **The survey research handbook: guidelines and strategies for conducting a survey**. 2 ed. New York: McGraw-Hill; 1995.

Antunes OAC. **Interfaces com a indústria**. Quím Nova 2005; 28: S64-S75.

ANVISA. **Resultado da Consulta de Produtos de Empresas – Medicamentos: Alfainterferona 2a, Alfainterferona 2b, Interferon alfa 2a recombinante e Interferon alfa 2b humano recombinante**. [online]. Brasília, Brasil; 2009 [capturado 08 abr 2009]. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/rconsulta_produto_internet.asp

Astolfi-Filho S, Pereira JO, Xavier MAS, Sanquino ECB, Santos EBP, Borges LS. **Noções básicas de tecnologia do DNA recombinante**. Manaus; 1996. [Apostila – Universidade do Amazonas].

Atkinson W, Wolfe C, Hamborsky J, McIntyre L, eds. **Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases**. 11 ed. Washington DC: Public Health Foundation; 2009.

Axtell RC, Steinman L. **Type 1 interferons cool the inflamed brain**. Immunity 2008; 28: 600-602.

Ayub MAZ. Aspectos do uso de microrganismos recombinantes em tecnologia de bioprocesso. In: **Microrganismos recombinantes em biotecnologia**. Rio Grande do Sul; 2000. p 1-16.

Bateson W. **Mendel's Principles of Heredity**. London: Cambridge University Press; 1909

Beale AJ. **Choice of cell substrate for biological products**. Adv Exp Biol Med 1979; 118: 83-97.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. **Bioquímica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2004.

Billiau A. **Interferons: The pathways of discovery. II. Immunomodulatory, *in vivo* and applied aspects**. J Clin Virol 2007; 39: 241-265.

BioJob. **Human growth hormone**. [online]. 2008 [capturado 01 out 2008]. Disponível em: [http://www.biojobblog.com/human-growth-hormone\(1\).jpg](http://www.biojobblog.com/human-growth-hormone(1).jpg)

Bio-Manguinhos. **Interferon alfa 2b humano recombinante**. [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2008c [capturado 15 nov 2008]. Disponível em: http://www.fiocruz.br/bio/media/monografia_interferon.pdf

_____. **Desenvolvimento tecnológico**. [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2008a [capturado 18 set 2008]. Disponível em: http://www.bio.fiocruz.br/interna/desenvolvimento_tecno.htm

_____. **Biofármacos – Distribuição nacional**. [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2008b [capturado 18 set 2008]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/bio/cqi/cqilua.exe/sys/start.htm?sid=193>

_____. **Vacina contra poliomielite**. [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2008d [capturado 10 set 2008]. Disponível em: http://www.bio.fiocruz.br/interna/vacinas_poliomelite.htm

_____. **Vacina tríplice viral**. [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2008e [capturado 10 set 2008]. Disponível em: http://www.bio.fiocruz.br/interna/vacinas_triplice_viral.htm

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. **Cellular responses to interferon-gamma**. Annu. Rev. Immunol 1997; 15: 749-795.

Bolívar F, Rodriguez RL, Betlach MC, Boyer HW. **Construction and characterization of new cloning vehicles I. Ampicilin-resistant derivatives of the plasmid pMB9**. Gene 1977; 2(2): 75-93.

Boyd HWJ, Wetfall R. **Pesquisa mercadológica: texto e caso**. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas; 1964.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº 34, de 28 de setembro de 2007. **Dispõe sobre Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C**. Diário Oficial da União nº 194, 8 out 2007.

_____. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria do Desenvolvimento da Produção. Fórum de Competitividade de Biotecnologia. **Estratégia Nacional de Biotecnologia – Política de Desenvolvimento da Bioindústria**. Brasília, jul 2006.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003. **Estabelece o regulamento técnico das Boas Práticas de Fabricação e Controle de Medicamentos**. Diário Oficial da União de 14/08/2003.

Buchner E. **Alcoholic fermentation without yeast cells**. Tübingen 1897.

Bud R. **History of 'biotechnology'**. Nature 1989; 337 (6202):10.

Butler M. **Animal cell cultures: recent achievements and perspective in the production of biopharmaceuticals**. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68: 283-291.

Cadeias Carbônicas. **Fórmula estrutural da fluoxetina**. [online]. Brasil; 2009 [capturado 06 abr 2009]. Disponível em: http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://3.bp.blogspot.com/_e3BZrA0pC2s/SayaMIW6qI/AAAAAAAAAABY/QNrZiPMBX50/s200/FLUOXETINA.gif&imgrefurl=http://legendaunderground.blogspot.com/2009_03_01_archive.html&usq=FoxQKjbWilpmsUX5LP0QSFw9CiE=&h=94&w=200&sz=10&hl=pt-BR&start=6&siq2=3O_dAQMuH85XOhrL7_OuAg&um=1&tbnid=XhCKcF04kOwYtM:&tbnh=49&tbnw=104&prev=/images%3Fq%3Dfluoxetina%2Bformula%2Bestrutural%26hl%3Dpt-BR%26sa%3DN%26um%3D1&ei=usraSY-GJ5_EtqfC4pCACA

Câmara da Indústria Farmacêutica do Chile. **La Biotecnología**. [online]. Santiago, Chile; 2009 [capturado 15 jan 2009]. Disponível em: <http://www.cifchile.cl/biotecnologia.php>

Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V *et al*. **Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil**. Braz J Med Biol Res 2005; 38: 41-49. Erratum in: Braz J Med Biol Res 2006; 39: 419.

Capanema LXL, Palmeira Filho PL. Indústria farmacêutica brasileira: reflexões sobre sua estrutura e potencial de investimentos. In: Torres Filho ET & Puga FP (eds), **Perspectivas do investimento 2007/2010**. Rio de Janeiro: BNDES; 2007; P.163-206.

Carnevalli JA, Cauchick Miguel PA. **Desenvolvimento da pesquisa de campo, amostra e questionário para realização de um estudo tipo survey sobre a aplicação do QFD no Brasil** [apresentação ao XXI Encontro Nacional de Engenharia de Produção; 2001; Salvador, Brasil].

Cather JC, Cather JC, Menter A. **Update on botulinum toxin for facial aesthetics**. *Dermatol Clin* 2002; 20 (4): 749-761.

CECMED (*Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos*). **Productos Biológicos. Regulaciones Internacionales Relacionadas com la Producción y Control Adoptadas en Cuba**. Habana: Circular N^o 3/2000.

Cervo AL, Bervian PA. **Metodologia Científica**. 3 ed. São Paulo: McGraw-Hill; 1983.

Chagas ATR. **O questionário na pesquisa científica**. [online]. São Paulo, Brasil; 2008 [capturado 04 ago 2008]. Disponível em: <http://www.vrnet.com.br/pauline/docs/instituicoes/textos/O%20Question%E1rio%20na%20pesquisa%20cient%EDfica.pdf>

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. **Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome**. *Science* 1989; 244 (4902): 359-362.

Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C *et al*. **Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2451-2455.

Cooper NS, Brown ME, Caulcott CA. **A mathematical method for analysing plasmid stability in microorganisms**. *J Gen Microbiol* 1987; 133: 1871-1880.

Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B. **Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications**. 3 ed. London: Informa Healthcare; 2007.

CTNBio. **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**. [online]. Brasília, Brasil; 2009 [capturado 19 agos 2009]. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/2.html>

da Fonseca JC, Brasil LM. **Hepatitis C virus infection in the Amazon Brazilian Region [in Portuguese]**. Rev Soc Bras Med Trop 2004; 37(Suppl 2):1-8.

Dane FC. **Research Methods**. California: Brooks-Cole Publishing Company; 1990.

Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR. **JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins**. Science 1994; 264: 1415-1421.

De La O, MAH. **Operações unitárias no processo de fermentação para a produção de biofármacos** [apresentação ao XVIII CONEEQ; 2009; Florianópolis, Brasil].

Delaval. **Curva de crescimento bacteriano**. [online]. São Paulo, Brasil; 2009 [capturado 15 jan 2009]. Disponível em: http://www.delaval.com.br/NR/rdonlyres/6CE38E28-99F3-4C5E-8118-6C8BDA58B469/0/FIG3_16.jpg

EEC (*European Economic Community*). **Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant DNA Technology**. London: Directive 75/318/EEC 1994.

_____. **Production and Quality Control of Cytokine Products Derived by Biotechnological Processes**. London: Directive 75/318/EEC 1990.

EMA. (*European Medicines Agency*). **Concept paper on similar biological medicinal products containing recombinant alpha-interferon. Annex to the guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology derived proteins as active substance – (non) clinical issues**. London: EMA/CHMP/BMWP/7241/2006b.

_____. **Guideline on similar medicinal products containing recombinant interferon alpha**. London: EMA/CHMP/BMWP/102046/2006a.

_____. **Guideline on similar biological medicinal products**. London: EMA/CHMP/437/2004.

EuropaBio. **Biological and Biosimilar Medicines**. 2005.

FAO (*Food and Agriculture Organization*). **Statement on Biotechnology**. Roma: 2000.

Fardelone LC, Branchi BA. **O setor de biofármacos e as oportunidades para o Brasil**. Rev. FAE 2006; 9 (2): 29-38.

Farmacopéia Britânica. **British Pharmacopeia**. London: 2007.

FDA (*Food and Drug Administration*). **Guidance for Industry: Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases**. Silver Spring: 2006.

_____. **PTC in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use**. Silver Spring: 1997.

_____. **PTC Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals**. Silver Spring: 1993.

FIFARMA (*Federación Latinoamericana de la Industria Farmacéutica*). **Documento oficial de posición de la Federación Latinoamericana de la Industria Farmacéutica**. México: FIFARMA; 2006.

Friebe P, Bartenschlager R. **Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication**. J Virol 2002; 76 (11): 5326-5338.

Friebe P, Boudet J, Simorre JP, Bartenschlager R. **Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication**. J Virol 2005; 79 (1): 380-392.

Gava AJ. **Princípios de tecnologia de alimentos**. 1 ed. São Paulo: Nobel; 2002.

Gil AC. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 3 ed. São Paulo: Atlas; 1991.

Goeddel DV, Yelverton E, Ullrich A, Heyneker HL, Miozzari G, Holmes W *et al*. **Human leukocyte interferon produced by *E. coli* is biologically active**. Nature 1980; 287: 411-416.

Goldsmith D, Kuhlmann M, Covic A. **Through the looking glass: the protein science of biosimilars**. Clin Exp Nephrol 2007; 11: 191-195.

Goode WJ, Hatt PK. **Métodos em Pesquisa Social**. 4 ed. São Paulo: Nacional; 1972.

Grachev V. **World Health Organization attitude concerning the use of continuous cell lines as substrate for production of human virus vaccines**. In: Mizrahi A (ed.). Advances in biotechnological processes. Viral Vaccines 1990; New York: Wiley-Liss; 14: 37-67.

Greiner JW, Guadagni F, Noguchi P, Pestka S, Colcher D, Fisher PB *et al*. **Recombinant interferon enhances monoclonal antibody-targeting of carcinoma lesions *in vivo***. Science 1987; 235 (4791): 895-898.

Gresser I, Bourali C. **Antitumor effects of interferon preparations in mice**. J Nat Cancer Inst 1970; 45: 365-376.

Grilo MLT, Magalhães PJ. **Glossário para Químicos de termos usados em biotecnologia**. Quím Nova 1994; 17(4): 342-353.

Grupo Parlamentario do PRI no Senado. **La que contiene proyecto de decreto por el que se reforma el artículo 222 de la Ley General de Salud**. [online]. México; 2008 [capturado 28 jan 2009]. Disponível em: http://www.pri.senado.gob.mx/index.php?ido=4&opc=2&senador=Sen.%20Moreno%20Uriegas%20%20Mar%EDa%20de%20los%20%20C1ngeles&obj_id=1276&tabla_id=Iniciativa

Hayflick L, Plotkin S, Stevenson R. **History of the acceptance of human diploid cell strains as substrates for human virus vaccine production**. Dev Biol Stand 1987; 68: 9-17.

Health Canada. **Draft Guidance for Sponsors: Information and Submission Requirements for Subsequent Entry Biologics (SEBs)**. Ottawa: HC; 2008.

Hermes Pardini. **Vacina inativada contra poliomielite (VIP, IPV, “Salk”)**. [online]. Belo Horizonte, Brasil; 2008 [capturado 12 set 2008]. Disponível em: http://www.hermespardini.com.br/imagens/atualiz_manual_23.pdf

Hilleman MR. **Cell line saga – an argument in favor of production of biologics in cancer cells**. Adv Exp Biol Med 1979; 118: 47-58.

_____. **Cells, vaccines, and the pursuit of precedent.** NCI Monogr 1968; 29: 463-468.

Hoofnagle JH. **Course and Outcome of Hepatitis C.** Hepatology 2002; 36 Suppl 1: 21-29.

Hopps HE, Petriccioni JC, eds. **Abnormal cells, new products and risks.** Gaithersburg, MD: Tissue Culture Association; 1985.

Houdebine LM. **Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals.** Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2009; 32: 107-121.

Hsu HH, Wright TL, Luba D, Martin M, Feinstone SM, Garcia G *et al.* **Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction.** Hepatology 1991; 14 (5): 763. (Resumo)

Hulse JH. **Biotechnologies: past history, present state and future prospects.** Trends Food Sci Technol 2004; 15: 3-18.

Hunt I. **From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression.** Protein Expr Purif 2005; 40: 1-22.

ICH (*The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*). **Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process: Q5E.** Geneva: ICH; 2004.

_____. **The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Quality – M4Q(R1). Quality Overall Summary of Module 2. Module 3: Quality.** Geneva: ICH; 2002.

_____. **Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cell Lines Used for Production of r-DNA Derived Protein Products: Q5B.** Geneva: ICH; 1995a.

_____. **Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products: Q5D.** Geneva: ICH; 1995b.

Imanaka T, Aiba S. **A perspective on the application of genetic engineering: stability of recombinant plasmid.** Ann NY Acad Sci 1981; 369:1-14.

INHRR (*Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*). **Anexo a las Normas de la Junta Revisora de Productos Farmacéuticos: Proyecto de Norma de los Productos Biológicos**. Caracas; 2008.

INVIMA (*Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos*). **Normatividad Medicamentos**. [online]. Bogotá, Colômbia; 2009 [capturado 19 jan 2009]. Disponível em: <http://www.invima.gov.co/Invima//normatividad/medicamentos.jsp?codigo=182>

Isaacs A, Lindenmann J. **Virus interference. I. The interferon**. Proc R Soc Lond Ser B 1957; 147: 258-267.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. **Imunobiologia – O sistema imune na saúde e na doença**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.

Jenner E. **An inquiry into the causes and effects of the variole vaccine, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of The Cow Pox**. 2 ed. London: Sampson Low; 1800.

Kim L. **Imitation to innovation – the dynamics of Korea's technological learning**. Boston: Harvard Business School; 1997.

Koenig GL. **Viability of and Plasmid Retention in Frozen Recombinant *Escherichia coli* over Time: a Ten-Year Prospective Study**. Appl Environ Microbiol 2003; 69 (11): 6605-6609.

Koren E, Zuckerman LA, Mire-Sluis AR. **Immune responses to therapeutic proteins in humans – clinical significance, assessment and prediction**. Curr Pharm Biotechnol 2002; 3 (4): 349-360.

Kovarik P, Sauer I, Schaljo B. **Molecular mechanisms of the anti-inflammatory functions of interferons**. Immunobiology 2008; 212 (9-10): 895-901.

Krause CD, Pestka S. **Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives**. Pharmacol Ther 2005; 106 (3): 299-346.

Krieger N, Steiner W, Mitchell D. **Frontiers in biocatalysis**. Food Technol Biotechnol 2004; 42(4): 219-221.

Lead Discovery. **Global Biotech Market Analysis and Forecasts, 2008-2023**. [online]. East Sussex; 2008 [capturado 15 abr 2009]. Disponível em: https://www.leaddiscovery.co.uk/reports/1293/Global_Biotech_Market_Analysis_and_Forecasts_20082023

Lederberg J. **Infectious History**. Science 2000; 288(5464): 287-293.

Lemes EMB. **Expressão de proteínas heterólogas**. Rio de Janeiro; 2007. [Apostila da disciplina de Bacteriologia Aplicada à Produção de Vacinas e Insumos – Curso do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos de Bio-Manguinhos – FIOCRUZ].

Levin J. **Estatística aplicada a ciências humanas**. 2 ed. São Paulo: Harbra; 1987.

Lim AC, Zhou Y, Washbrook J, Titchener-Hooker NJ, Farid S. **A decisional-support tool to model the impact of regulatory compliance activities in the biomanufacturing industry**. Comput Chem Eng 2004; 28: 727-735.

Machado LM, Maia GZA, Labegalini ACFB, orgs. **Pesquisa em Educação: passo a passo**. 1 ed, v 2. Marília: M3T Tecnologia e Educação; 2007.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. **Brock biology of microorganisms**. 10 ed. Upper Saddle River: Pearson Education LTD; 2002.

Maeda S, McCandliss R, Gross M, Sloma A, Familletti PC, Tabor JM *et al*. **Construction and identification of bacterial plasmids containing nucleotide sequence for human leukocyte interferon**. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77(12): 7010-7013.

Mahmoud K. **Recombinant protein production: strategic technology and a vital research tool**. Res J Cell Mol Biol 2007; 1: 9-22.

Malhotra NK. **Pesquisa de marketing: uma orientação aplicada**. Porto Alegre: Bookman; 2001.

Marconi MDA, Lakatos EM. **Técnicas de pesquisa: planejamento e execução de pesquisas, amostragens e técnicas de pesquisas, elaboração, análise e interpretação de dados**. 3 ed. São Paulo: Atlas; 1996.

Martínez LH. **Perspectivas de Registro dos Produtos Biológicos como Genéricos** [Apresentação ao Seminário Internacional: Perspectivas para o Fortalecimento dos Mercados de Medicamentos Similares e Genéricos em Países em Vias de Desenvolvimento; 2003 fev 13; Brasília, Brasil].

Mattar FN. **Pesquisa de marketing: edição compacta**. São Paulo: Atlas; 1996.

_____. **Pesquisa de marketing: metodologia, planejamento, execução e análise**. 2 ed, v.2. São Paulo: Atlas; 1994.

McCoy M. **Enzymes Ascendant**. Chemical & Engineering News mar 2004; p. 23.

Messing J. **Cloning in M13 phage or how to use biology at its best**. Gene 1991; 100: 3-12.

Mett V, Farrance CE, Green BJ, Yusibov V. **Plants as biofactories**. Biologicals 2008; 36: 354-358.

MMBR (*Microbiology and Molecular Biology Reviews*). **Table 1: E. coli genes and replication- or phage-related sites**. [online]. Washington; 2009 [capturado 11 fev 2009]. Disponível em: <http://mمبر.asm.org/cgi/content/full/62/3/814/T1>

Moreira H, Caleffe L. **Metodologia da pesquisa para o professor pesquisador**. Rio de Janeiro: DP&A; 2006.

Morrow JF, Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Goodman HM, Helling RB. **Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *Escherichia coli***. Proc Nat Acad Sci USA 1974; 71(5): 1743-1747.

MSPAS (*Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de la Republica de Guatemala*). **Registro sanitario de referencia de productos farmacéuticos. Documentos que acompañan la solicitud**. Guatemala: Formularios F-MC-g-011 Ver 2; 2008.

Mullin R. **A New Battlefield in Biologics**. Chemical & Engineering News may 2004; p. 26-37.

Nagata S, Taira H, Hall A, Johnsrud L, Streuli M, Ecsödi J *et al*. **Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity**. Nature 1980; 284: 316-320.

Nascimento AKCL. **Desenvolvimento de um vetor bifuncional para a bactéria endofítica *Enterobacter agglomerans* e *Escherichia coli***. Manaus; 2006. Mestrado [Dissertação em Biotecnologia] – Universidade Federal do Amazonas.

Neto JAS. **Dinamização da Transferência Vertical de Tecnologia: Diagnóstico e Proposição de uma Alternativa**. In: Marcovitch J (coord.). Administração em Ciência e Tecnologia. São Paulo: Edgar Blücher; 1983.

New England BioLabs. **Genetic Markers**. [online]. New England, Estados Unidos da América; 2009 [capturado 10 fev 2009]. Disponível em: http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/genetic_markers.asp

Nothenberg M. **Advento de biogênicos tarda e pode falhar**. Química e Derivados 2008; 477.

Oliveira M. **A Fermentação**. [online]. Bahia, Brasil; 2007 [capturado 17 set 2008]. Disponível em: http://cesbafa.blogspot.com/2007_10_01_archive.html

Oliveira SL. **Tratado de metodologia científica: Projetos de pesquisas, TGI, TCC, monografias, dissertações e teses**. São Paulo: Pioneira; 1997.
Orsenigo L. **The Emergence of Biotechnology**. New York: St Martin's Press; 1989.

Ortaldo JR, Mason A, Rehberg E, Moschera J, Kelder B, Pestka S *et al*. **Effects of recombinant and hybrid recombinant human leukocyte interferons on cytotoxic activity of natural killer cells**. J Biol Chem 1983; 258 (24): 15011-15015.

Pádua EMM. **Metodologia da pesquisa: abordagem teórico-prática**. 10 ed. Campinas: Papirus; 2004.

Parasuraman A. **Marketing research**. 2 ed. Reading: Addison Wesley Publishing Company; 1991.

Parlamento e Conselho Europeu. **Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001**. Strasbourg: 2001L0083; 2001.

Passos ADC. **Doenças emergentes e hepatite C**. Cad Saúde Pública 1999; 15 (2): 226-227.

PDB (*Protein Data Bank*). **Images for 1RH2**. [online]. Piscataway, United States; 2008 [capturado 18 set 2008]. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1RH2>

Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. **Structural biology of hepatitis C virus**. *Hepatology* 2004; 39 (1): 5-19.

Pérez DDPG, Prieto LMR. **Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado com inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus***. Bogotá; 2007. Graduação [Monografia em Microbiologia Industrial] – Pontificia Universidad Javeriana – Facultad de Ciencias.

Pestka S, Krause CD, Walter MR. **Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors**. *Immunol Rev* 2004; 202: 8-32.

Pestka S. **The Interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn**. *J Biol Chem* 2007; 282 (28): 20047-20051.

Petricciani JC, Hopps HE, Chapple PJ, eds. **Cell substrates**. New York: Plenum; 1979.

Petricciani J, Sheets R. **An overview of animal cell substrates for biological products**. *Biologicals* 2008; 36: 359-362.

Piper JM, Wen TTS, Xenakis EMJ. **Interferon therapy in primary care**. *Prim Care Update Ob/Gyns* 2001; 8 (4): 163-169.

Portal Saúde. **Medicamentos de Dispensação Excepcional**. [online]. Brasília, Brasil; 2008 [capturado 29 set 2008]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/texto_excepcionais.pdf

Possas CA. **Inovação e Regulação na Biotecnologia: Desafios para a Integração Intercontinental**. [trabalho apresentado em mesa redonda na Conferência Brasil e União Européia Ampliada; 2004; Rio de Janeiro, Brasil].

Promega. **Technical Reference: Genetic Markers in E. coli**. [online]. Madison; Estados Unidos da América; 2009 [capturado 10 fev 2009]. Disponível em: <http://www.promega.com/techserv/techref/genetic.markers.ecoli.htm>

Rader RA. **Paucity of Biopharma Approvals Raises Alarm: Lower Numbers, Novelty, and Economic Impact Indicate Problems** (update this article). Gen Eng Biotechnol News 2008; 28(6).

Radhakrishnan R, Walter LJ, Hruza A, Reichert P, Trotta PP, Nagabhushan TL *et al.* **Zinc mediated dimer of human interferon- α 2b revealed by X-ray crystallography.** Structure 1996; 4(12): 1453-1463.

Rai M, Padh H. **Expression systems for production of heterologous proteins.** Curr Sci 2001; 8: 1121-1128.

Registro Sanitário de Produtos Biológicos. **Instructivo SRPB-R: Solicitud para el registro sanitario de productos ADN recombinante, anticuerpos monoclonales y terapeuticos.** [online]. Caracas, Venezuela; 2009 [capturado 28 jan 2009]. Disponível em: <http://mail.inhrr.gov.ve:7474/pb/index.php>

Reichert JM. **Biopharmaceutical approvals in the US increase.** Regul Aff J 2004; jul: 1-7.

Roche Brasil. **Medicamentos biológicos.** [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2007 [capturado 02 nov 2007]. Disponível em: <http://www.roche.com.br/NR/rdonlyres/27273F4A-1D0B-4FE4-9DD2-8951FB89EE6E/6488/medicamentosbiologicos1.pdf>

Rodrigues JAR, Moran PJS, Conceição GJA, Fardelone LC. **Recent advances in the biocatalytic asymmetric reduction of acetophenones and α,β -unsaturated carbonyl compounds.** Food Technol Biotechnol 2004; 42(4): 295-303.

Rosini N, Mousse D, Spada C, Treitinger A. **Seroprevalence of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in Southern Brazil, 1999-2001.** Braz J Infect Dis 2003; 7:262-267.

Rudio FV. **Introdução ao projeto de pesquisa científica.** Petrópolis: Vozes; 1978.

Saavedra I, Quiñones L. **Intercambiabilidad de medicamentos de origen biológico (biofármacos): Consideraciones acerca de La aprobación de formulaciones biosimilares (biogénicos) en Chile.** Rev Méd Chile 2006; 134: 1583-1588.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74(12): 5463-5467.

Satyagal VN, Agrawal PA. **A generalized godel of plasmid replication**. Biotechnol Bioeng 1989; 33: 1135.

Schellekens H. **When biotech proteins go off-patent**. Trends Biotechnol 2004; 22(8): 406-410.

_____. **Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects**. Clin Ther 2002; 24: 1720-1740.

Schiff LJ. **Review: production, characterization, and testing of banked mammalian cell substrates used to produce biological products**. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2005; 41: 65-70.

Schwartz M. **The life and works of Louis Pasteur**. J Appl Microbiol 2001; 91: 597-601.

Scott A. **Biologics**. Chemical & Engineering News may 2004; p.21-25.

Scripts. **Yearbook**. Reino Unido: Vinita Chambore; 2005; n° 21, v.1, p. 197-206.

Shirgaonkar IZ, Lothe RR, Pandit AB. **Comments on the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure and highspeed devices**. Biotechnology 1998; 14: 657-660.

Siagris D, Christofidou M, Theocharis GJ, Pagoni N, Papadimitriou C, Lekkou A *et al*. **Serum lipid pattern in chronic hepatitis C: histological and virological correlations**. J Viral Hepat 2006; 13: 56-61.

Sofer G, Zabriskie DW. **Biopharmaceutical Process Validation**. New York: Marcel Dekker; 2000.

Sørensen PS. **Neutralising antibodies to interferon- β – measurement, clinical relevance, and management**. J Neurol 2006; 253 (suppl 6): VI/16-VI/22.

Stark GR. **How cells respond to interferons revisited: From early history to current complexity**. Cytokine Growth Factor Rev 2007; 18: 419-423.

Storck WJ. **Earnings rise again at biotech firms.** Chemical & Engineering News nov 2004; p. 22-23.

Studier FW. **Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system.** J Mol Biol 1991; 219 (1): 37-44.

Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R *et al.* **Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection.** Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99 (24): 15669-15674.

Sundman M. **Lessons from healthcare: are pharma deals relevant to industrial biotech?** Ind Biotechnol 2005; 1: 88-91.

Symposium on Diploid Cells. Minimum requirements of the establishment of a HDCS to be used for the production of human virus vaccines and minimum requirements for the production of human virus vaccines in HDCS. In: **Proceedings of the symposium on the characterization and uses of human diploid cell strains.** Opatija, Yugoslavia: Permanent Section of Microbiological Standardization; 1963.

Terapia Biológica. Su realidad científica y social. Rev Colomb Reumatol 2007; 14(1): 7-10 (Editorial).

Thiel KA. **Biomanufacturing, from bust to boom...to bubble?** Nat Biotechnol 2004; 22: 1365-1372.

TGA (*Therapeutic Goods Administration*). **Non-clinical guidelines: European Union guidelines adopted in Australia.** [online]. Symonston ACT, Australia; 2009 [capturado 29 jan 2009]. Disponível em: http://www.tga.gov.au/docs/html/euguide/euad_nonc.htm#nonclinicalsimilar

Tognetti MAR. **Metodologia da Pesquisa Científica.** [online]. São Carlos, Brasil; 2006 [capturado 05 ago 2008]. Disponível em: http://sbi-web.if.sc.usp.br/metodologia_pesquisa_cientifica.pdf

Tonson A. **Monitoramento e Operação de Cultivos de Células Animais em Sistemas de Perfusão.** São Paulo; 2000. Doutorado [Tese em Engenharia Química] – Universidade de São Paulo.

Torres FAG, Moraes LMP. **Proteínas Recombinantes Produzidas em Leveduras.** Biotecnol Ciênc Desenvol 2000; 12: 20-22.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed; 2000.

Triviños ANS. **Introdução à pesquisa em ciências sociais: A pesquisa qualitativa em educação**. São Paulo: Atlas; 1987.

Tupam Editores. **Hormonas e medicamentos usados no tratamento das doenças endócrinas**. [online]. Lisboa, Portugal; 2008 [capturado 12 set 2008]. Disponível em: <http://terapeutico.indice.pt/INDICEe/Grupos/g8/NovoMix.pdf>

USP (*United States Pharmacopeia*). **The Official Compendio of Standards**. Rockville: 2008; USP 31 – NF 26.

Van Wezel AL. **Microcarrier technology – present status and prospects**. Dev Biol Stand 1984; 55:3.

Villen RA. **Biotecnologia – Histórico e Tendências**. [online]. São Paulo, Brasil; 2008 [capturado 16 set 2008]. Disponível em: <http://www.hottopos.com/regeq10/rafael.htm>

Wade N. **Hybridomas: A Potent New Biotechnology**. Science 1980; 208 (4445): 692-693.

Walsh G. **Biopharmaceuticals: Approval Trends in 2007 – More than 70% of the products were produced in mammalian cells**. [online]. Los Angeles, USA; 2008 [capturado 8 mai 2009]. Disponível em: <http://biopharminternational.findpharma.com/biopharm/Manufacturing+Economics+Articles/Biopharmaceuticals-Approval-Trends-in2007/ArticleStandard/Article/detail/557248>

_____. **Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions**. Trends Biotechnol 2005; 23 (11): 553-558.

_____. **Second-generation biopharmaceuticals**. Eur J Pharm Biopharm 2004; 58: 185-196.

_____. **Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology**. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd; 2003. **Chapter 4: The cytokines – the interferon family**.

_____. **Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature**. Eur J Pharm Sci 2002; 15: 135-138. (Commentary)

Wang JT, Wang TH, Sheu JC, Lin JT, Chen DS. **Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with posttransfusion hepatitis and low efficiency of transmission among spouses.** J Med Virol 1992; 36(1): 28. (Resumo)

Watson JD, Crick FHC. **Molecular Structure of Nucleic Acids.** Nature 1953; 171 (4356): 737-738.

Weinberg JM, Saini R, Tutrone WD. **Biologic therapy for psoriasis – the first wave: infliximab, etanercept, efalizumab, and alefacept.** J Drugs Dermatol 2002; 1(3): 303-310.

Werner RG. **Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals.** J Biotechnol 2004; 113: 171-182.

WHO (*World Health Organization*). **Informal Consultation on Regulatory Evaluation of Therapeutic Biological Medicinal Products.** Geneva: WHO; 2007.

_____. **Guidelines for the production and quality control of candidate tetravalent dengue virus vaccines (live).** Annex 1. Geneva: WHO 2006; 932.

_____. **Requirements for the use of animal cells as *in vitro* substrates for the production of biologicals – Annex 4 (Addendum 2003).** Geneva: WHO 2005; 927.

_____. **Recommendations and guidelines for biological substances used in medicine and other documents (Annex 6).** Geneva: WHO 2004a; 924.

_____. **WHO Expert Committee on Biological Standardization.** Fifty-third Report. Geneva: WHO 2004b; 926.

_____. **Regulating biotechnology products.** Geneva: ICDRA; 2003.

_____. **Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (inactivated).** Geneva: WHO 2002; 910.

_____. **Hepatitis C.** [online]. Geneva; 2000 [capturado 17 fev 2009] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>

_____. **Requirements for the use of animal cells as *in vitro* substrates for the production of biologicals.** In: WHO Expert Committee on biological standardization. Forty-seventh report (WHO Technical Report Series). Geneva: WHO 1998; 878.

_____. **Guidelines for assuring the quality of pharmaceutical and biological products prepared by recombinant DNA technology.** Geneva: WHO 1991; 814.

_____. **Requirements for human interferons made by recombinant DNA techniques.** Geneva: WHO 1988; 771.

_____. **Acceptability of cell substrates for production of biologicals.** Report of a WHO Study Group. Geneva: WHO 1987a; 747.

_____. **Requirements for continuous cell lines used for biologicals production.** In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-sixth Report. Geneva: WHO 1987b; Annex 3, 745.

_____. **Requirements for Poliomyelitis Vaccine (Inactivated).** In: Requirements for Biological Substances. Manufacturing and Control Laboratories. Report of a WHO Expert Group. Geneva: WHO 1966; 323.

_____. **Requirements for Poliomyelitis Vaccine (Inactivated).** In: Requirements for Biological Substances: 1. General Requirements for Manufacturing Establishments and Control Laboratories; 2. Requirements for Poliomyelitis Vaccine (Inactivated). Report of a Study Group. Geneva: WHO 1959; 178.

Wikimedia. **Fluoxetine 3D.** [online]. 2008 [capturado 01 out 2008]. Disponível em: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f5/S-fluoxetine-3D-vdW.png>

Woodcock J. **Follow-on protein products.** [online]. Rockville, United States of America; 2007 [capturado 15 jan 2009]. Disponível em: <http://www.fda.gov/ola/2007/protein32607.html>

Woodcock J, Griffin J, Behrman R, Cherney B, Crescenzi T, Fraser B *et al.* **The FDA's assessment of follow-on protein products: a historical perspective.** Nat Rev Drug Discov 2007; 6: 437-442.

Woody RW. **Circular dichroism of peptides and proteins.** In: Nakanishi K, Berova N, Woody RW (eds). Circular dichroism: principles and applications. New York: VCH Publishers; 1994.

Zabriskie DW, Arcuri EJ. **Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms.** *Enz Microb Technol* 1986; 8: 706.

Zaha A, Ferreira HB, Passaglia LMP, orgs. **Biologia Molecular Básica.** 3 ed. Porto Alegre: Mercado Aberto; 2003.

Zhang Z, Moo-Young M, Chisti Y. **Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnol Adv* 1996; 14(4): 401-435.

VIII Anexos

ANEXO I

Questionário

Considerando:

- ✓ A Transferência de Tecnologia do *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología* (Cuba) para Biomanguinhos, para nacionalização da produção da Interferon alfa 2b Humano Recombinante.
- ✓ A importância de se garantir a qualidade e consistência do produto final obtido por meio de técnicas de DNA recombinante.

Responda o questionário a seguir, que tem como objetivo definir parâmetros de especificação para o registro sanitário do Banco de Células Primário em Biomanguinhos cujo objetivo é a Nacionalização da produção do Interferon alfa 2b Humano Recombinante.

1 – Qual (is) informação (ões) você considera importante (s) o produtor do biofármaco interferon alfa 2b humano recombinante possuir para registro sanitário no que diz respeito ao (à):

1.1 – Célula hospedeira: (Bloco A)

1 () descrição da espécie e subespécie.

2 () descrição das características genóticas e fenotípicas.

- 3 () descrição da patogenicidade, produção de toxinas e outras informações referentes ao biorisco, quando houverem.
- 4 () habitat natural.
- 5 () fonte de obtenção da célula (laboratório externo ou cultura própria).
- 6 () histórico da célula quanto seu emprego na produção de biofármacos.
- 7 () importantes referências bibliográficas da literatura científica referentes à célula em questão.
- 8 () método de preservação do banco de célula hospedeira.
- 9 () método originalmente utilizado para isolamento da bactéria.
- 10 () procedimento utilizado para o cultivo bacteriano, incluindo a descrição do meio de cultura.
- 11 () possibilidade de potencial contaminação cruzada com outros microorganismos.

1.2– Vetor Plasmidial: (Bloco B)

- 12 () identificação, origem e fonte de obtenção da célula de onde o gene que codifica a proteína foi obtido.
- 13 () identificação e detalhes quanto ao isolamento do gene que será clonado.
- 14 () métodos usados para construção do vetor plasmidial.
- 15 () descrição detalhada da montagem do vetor plasmidial.
- 16 () fonte de obtenção do vetor e histórico do mesmo.
- 17 () um mapa com a descrição e seqüência relevantes (promotores, terminadores de transcrição e/ou tradução, etc.) dos componentes do vetor que visam à expressão heteróloga de proteínas.
- 18 () mapa das enzimas de restrição – pelo menos dos sítios usados na construção do vetor.
- 19 () fonte e funções dos componentes do vetor, como origem de replicação, genes de resistência a antibióticos, promotores, indutores, dentre outros, caso haja.
- 20 () quais regiões do vetor foram seqüenciadas, seja pelo fabricante ou obtida por fontes literárias.
- 21 () se a proteína é expressa ou não como uma proteína de fusão.
- 22 () se o vetor expressa mais de uma proteína.
- 23 () descrição do método de transformação (inserção do vetor na célula bacteriana) que foi adotado.

- 24** () descrição completa da forma utilizada para amplificação do vetor, visando seqüenciamento futuro.
- 25** () método detalhado de seleção clonal utilizado, incluindo a caracterização da cultura de células.
- 26** () indicação se o vetor se encontra integrado no genoma ou extracromossomal.
- 27** () método de preservação do plasmídeo.

1.3 – Banco de Células Mestre: (Bloco C)

- 28** () se a célula é aprovada por Autoridades de Controle Sanitário Nacional para produzir o biofármaco.
- 29** () se o banco de células é preparado pelo próprio fabricante ou obtido de fontes externas.
- 30** () tamanho do banco de células preparado ou adquirido de fontes externas.
- 31** () procedimento detalhado de transformação, seleção, isolamento da colônia, clonagem, amplificação gênica, adaptação da bactéria ao meio e às condições de cultura específicos, incluindo outros, quando houver.
- 32** () origem, estocagem, utilidade e prazo de validade dos materiais utilizados na composição do banco de células.
- 33** () data de obtenção do banco de células.
- 34** () condições de estocagem do banco de células.
- 35** () origem, estocagem e expectativa de vida do banco de células.
- 36** () planejamento quanto ao uso do banco de células, considerando a viabilidade celular e expectativa de vida do referido banco.
- 37** () se existem condições de precauções de acidentes com as unidades dos frascos que constituem o banco de células, como: se estão situados em múltiplos congeladores e em localização distante (outro prédio, unidade de fabricação etc); se utilizam reforço de energia e se dispõem de sistema automático de controle de temperatura.
- 38** () gerenciamento da documentação de forma a permitir a rastreabilidade.
- 39** () número de passagens do banco de células mestre até obtenção dos bancos de células de trabalho.
- 40** () quantidade de bancos de células de trabalho oriundo de cada banco de células mestre.
- 41** () data de obtenção dos bancos de células de trabalho.

42 () periodicidade de análise, conforme o item 2.2 deste questionário.

1.4 – Banco de Células de Trabalho: (Bloco D)

43 () se o banco de células é preparado pelo próprio fabricante ou obtido de fontes externas.

44 () tamanho do banco de células preparado ou adquirido de fontes externas.

45 () origem, estocagem, utilidade e prazo de validade dos materiais utilizados na composição do banco de células.

46 () condições de estocagem do banco de células.

47 () planejamento quanto ao uso do banco de células, considerando a viabilidade celular e expectativa de vida do referido banco.

48 () se existem condições de precauções de acidentes com as unidades dos frascos que constituem o banco de células, como: se estão situados em múltiplos congeladores e em localização distante (outro prédio, unidade de fabricação etc); se utilizam reforço de energia e se dispõem de sistema automático de controle de temperatura.

49 () procedimentos detalhados usados durante o preparo do banco de células.

50 () número de passagens do banco de células de trabalho até a fase de cultivo no biorreator.

51 () gerenciamento da documentação de forma a permitir a rastreabilidade.

52 () periodicidade de análise, conforme o item 2.3 deste questionário.

2 – Qual (is) aspectos (s) você considera importante (s) ser (em) analisados (s) pelo fabricante do biofármaco interferon alfa 2b humano recombinante no (a) visando à manutenção periódica dos bancos de célula e do processo produtivo:

2.1 – Vetor Plasmidial: (Bloco E)

53 () seqüenciamento do DNA da região codificante do gene de interesse.

54 () seqüenciamento do DNA das regiões flaqueadoras (como promotores e indutores) e das junções de inserção.

55 () análise quanto inserções e deleções.

2.2 – Banco de Células Mestre: (Bloco F)

- 56 () número de cópias do vetor presente na célula.
- 57 () análise do vetor quanto à inserções e deleções.
- 58 () percentagem de células hospedeiras que retém o vetor.
- 59 () isolamento do vetor e seqüenciamento do DNA que codifica o produto recombinante.
- 60 () seqüenciamento das regiões flanqueadoras.
- 61 () pureza – ausência de contaminação: bactérias e fungos.
- 62 () identificação da bactéria por meio de características genotípicas e fenotípicas.
- 63 () estabilidade plasmidial sob condições de estocagem e restabelecido.
- 64 () viabilidade celular.

2.3 – Banco de Células de Trabalho: (Bloco G)

- 65 () verificação da presença do vetor na célula.
- 66 () pureza – ausência de contaminação: bactérias e fungos.
- 67 () determinação da idade celular *in vitro*.
- 68 () seqüenciamento do DNA que codifica o produto recombinante.
- 69 () seqüenciamento das regiões flanqueadoras.
- 70 () estabilidade plasmidial.
- 71 () identificação da bactéria por meio de características genotípicas e fenotípicas.
- 72 () viabilidade celular.

2.4 – Fase de Subcultivo: (Bloco H)

- 73 () freqüência de subcultivos.
- 74 () descrição dos materiais utilizados no subcultivo.
- 75 () estabilidade plasmidial.
- 76 () identificação da bactéria por meio de características fenotípicas.

2.5 – Fase de Produção (Bloco I)

- 77 () verificação do crescimento da cultura.
- 78 () verificação do rendimento do produto formado.

- 79 () estabilidade plasmídica em intervalos determinados, até o final da produção.
- 80 () número de cópias do plasmídeo na célula hospedeira.
- 81 () grau de retenção do plasmídeo na célula hospedeira.
- 82 () estratégias usadas para promover e controlar a expressão do gene de interesse.
- 83 () seqüenciamento do gene que codifica a proteína no final da batelada.
- 84 () identificação da bactéria por meio de características genotípicas e fenotípicas no final da batelada.

2.6 – Fase após a Produção: (Bloco J)

- 85 () seqüenciamento da proteína recombinante formada (estrutura primária da proteína).
- 86 () confirmação da estrutura secundária da proteína.
- 87 () confirmação da estrutura terciária da proteína.
- 88 () demonstração das características biológicas e/ou imunológicas esperadas.
- 89 () preparação de 3 lotes do Ingrediente Farmacêutico Ativo para sua caracterização e verificação da reprodutibilidade do processo.