PROPOSTA DE GUIA PARA O ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BANCOS DE CÉLULAS VISANDO À PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS

Rodrigo Martins Bretas[1] , Bernardo Luiz Moraes Moreira[2] , Brenda Gomes Valente[3] , Daniela Marreco Cerqueira[4] , Juliana Bertoli da Silva[5] , Marcelo Mario Matos Moreira[6] , Marcos Fernando Galves da Silva[7] , Maria Fernanda Reis e Silva Thees[8] , Neemias Silva de Andrade[9] , Raimundo Nonato Vieira Junior[10] , Silmara Cristiane da Silveira[11] , Laura Gomes Castanheira[12]

RESÚMEN

Productos biológicos, como proteínas recombinantes y vacunas virales, son ampliamente usados en medicina y pueden ser obtenidos a partir de bancos de células. Estos son sustratos empleados como plataformas biotecnológicas para producción industrial, e deben ser adecuadamente caracterizados para exhibir autenticidad, estabilidad y pureza. Ocurrieron algunos incidentes los años pasados, como la contaminación cruzada de líneas celulares y el descubrimiento de infección por SV40 y retrovirus aviario. Particularmente, la descubierta de circovirus porcino en vacunas contra retrovirus en 2010 provocó gran preocupación cuanto a la seguridad de biológicos, y las medidas para evaluar el riesgo.

Basado en el estudio de documentos internacionales, y dada la ausencia de regulación Brasileña específica, el presente trabajo sugiere un guía para satisfacer dicha necesidad del país. Tal documento debe orientar la industria nacional, afirmando que los bancos de células deben ser establecidos bajo las BPM, y caracterizados por pruebas validadas realizadas por laboratorios aprobados. La certificación incluye evaluación de identidad, manutención de características y ausencia de contaminantes como microorganismos, virus y retrovirus, prions y actividad tumorigénica u oncogénica. Estos pasos garantirán que al final se produzcan biológicos con debidas calidad, seguridad y eficacia.

Palabras-clave

productos biológicos, certificación, regulación.

[1] Especialista, ANVISA
[2] Doutor, ANVISA
[3] Mestre,ANVISA
[4] Doutora, ANVISA
[5]Mestre, ANVISA
[6] Especialista,ANVISA
[7] Especialista, ANVISA
[8] Especialista, ANVISA
[9] Mestre, ANVISA
[10] Farmaceutico, ANVISA
[11] Especialista, ANVISA
[12] Mestre, ANVISA

INTRODUÇÃO

Os produtos biológicos são uma classe de medicamentos com aplicação em inúmeras enfermidades do ser humano, e se diferenciam dos sintéticos em função da sua origem e dos processos de fabricação empregados. Exemplos incluem os alergênicos, probióticos e insumos extrativos como heparina (1). O presente trabalho está focado, contudo, naqueles obtidos a partir de células animais, como proteínas recombinantes de uso terapêutico e vacinas virais.

Produtos biotecnológicos são gerados a partir de células modificadas geneticamente (e.g. por transfecção) a fim de expressarem uma proteína de interesse médico (2). Já o processo fabril das vacinas virais envolve a infecção e multiplicação de vírus em células susceptíveis, a ponto de coletar partículas que atuem como antígeno (3). Em ambos os casos, é necessário o estabelecimento de um banco de células[1] homogêneo e bem caracterizado quanto aos seus aspectos de autenticidade, ausência de contaminações e estabilidade (4).

Em 1967, em meio a um momento de franco crescimento na área de cultura de células e tecidos, ocorreu um acidente com relação à identidade das culturas. Devido a erros na manipulação, nas boas práticas e técnica asséptica, células da linhagem tumoral HeLa, que possuem grande capacidade proliferativa, contaminaram diversas outras linhagens em diversos centros de pesquisa ao redor do mundo. Somente em 1977 tal contaminação cruzada foi confirmada, e o acidente possui capacidade de invalidar resultados gerados nos laboratórios. A partir deste momento, os cientistas começaram a se preocupar com a autenticidade das células cultivadas em seus institutos, bem como a dar mais atenção aos cuidados para prevenir tais acidentes (5).

A maior preocupação, do ponto de vista histórico, sempre esteve centrada na segurança dos produtos biológicos, exemplificado na possível presença de contaminantes e dos próprios resíduos das células (como proteínas e ácidos nucléicos), e os efeitos adversos potenciais que eles impõem à saúde dos pacientes (6). Medicamentos de origem biológica são capazes de transmitir doenças, como já ocorreu no caso de infecções virais por vírus como HIV e hepatite B através de hemoderivados (4); e os próprios substratos celulares podem conter agentes contaminantes intrínsecos (como retrovírus integrados ao genoma da célula hospedeira) ou introduzidos de forma inadvertida. Exemplos de problemas passados com contaminações virais incluem a detecção de SV40 em vacinas contra pólio e retrovírus aviário endógeno em vacinas produzidas em ovos embrionados de galinha. O risco da presença de príons (agentes da encefalopatia espongiforme transmissível) e do grau de pureza de novos substratos para vacinas levanta discussões entre produtores e reguladores.

A imunização contra o vírus da pólio, causador da paralisia infantil, é realizada pela aplicação da vacina oral na forma atenuada (que contém o vírus viável) ou inativada – composta pelo vírus inviável. O processo de fabricação desta última inclui o uso de formaldeído para inativar o agente infeccioso, o que gera um produto injetável. No entanto, mesmo com esta etapa no processo, foi detectada a contaminação desta vacina por vírus símio (SV40), um agente identificado somente no ano de 1960, e isto gerou preocupações a respeito do risco hipotético do desenvolvimento de câncer em humanos. Com o acompanhamento, foi visto que, embora os sujeitos de pesquisa clínica que receberam o produto contaminado tenham desenvolvido anticorpos contra o SV40, não houve evidências do desenvolvimento de tumores em função da exposição – mas, mesmo assim, foi desenvolvida uma nova versão da vacina, usando insumos livres desse contaminante.

[1] Exceto quando forem usadas culturas de células primárias, que, por definição, são mantidas apenas em sua primeira passagem *in vitro*, logo não podem ser estocadas como bancos nem extensivamente certificadas, como ocorre em algumas vacinas virais (5).

Algumas vacinas obtidas através da multiplicação de partículas virais em ovos embrionados também apresentaram problemas relativos à pureza. As metodologias analíticas usadas no início não detectavam contaminações nas vacinas derivadas destes modelos animais; no entanto, com a criação de uma técnica em 1996, que investiga a enzima transcriptase reversa com maior sensibilidade (PERT), foi demonstrada a contaminação por retrovírus aviário endógeno (EAV). Os estudos aprofundados revelaram que EAV é um vírus defectivo que produz partículas incapazes de infectar culturas de células, uma evidência confirmada pelo histórico de segurança do uso de vacinas geradas neste substrato.

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

A empresa conduziu experimentos e confirmou a presença do contaminante viral nos intermediários do processo de produção, no banco de células de trabalho (células Vero, uma linhagem contínua derivada de rins de macacos), na semente de vírus que derivou a vacina e no produto terminado. A própria FDA realizou ensaios e também confirmou a presença do contaminante na vacina. Em março de 2010, a Agência Americana recomendou a suspensão temporária do uso das vacinas contra o rotavírus, inclusive uma também atenuada e oral, produzida por outro fabricante. Após testes efetuados pela empresa e FDA, foram identificados fragmentos genéticos correspondentes às cepas PCV-1 e 2 nesta segunda vacina.

Deste momento em diante, foram conduzidas uma extensiva avaliação do risco e uma investigação a respeito da implicação do uso continuado da vacina. Considerados os dados clínicos e de pós-comercialização desde seu registro, foi considerado que os benefícios superam os riscos relativos ao seu uso nos programas de imunização, tendo em vista sua grande importância na redução de casos da doença. Mesmo assim, foi exposta a necessidade por maior caracterização dos substratos celulares e materiais de partida usados na obtenção de medicamentos biológicos, com relação à detecção de contaminação por agentes adventícios; e que devem ser usados métodos analíticos emergentes e mais sensíveis.

A partir de análise laboratorial e considerando os devidos aspectos históricos, foi demonstrado que as células Vero são muito susceptíveis à infecção pelo PCV-1. A descoberta de culturas destas células contaminadas na ATCC ocorreu no ano de 1974, e é possível que isto se deva ao uso da enzima tripsina (uma protease inespecífica derivada de porcos) contaminada com o vírus, pois somente em 1995 se começou a tratar este reagente com radiação UV.

A vacina inativada, por outro lado, poderia apresentar algumas vantagens sobre as que contêm o vírus atenuado (ainda vivo e viável). Suas etapas de inativação poderiam ser capazes de inativar PCV ou outros agentes adventícios, desde que devidamente demonstrado através de estudos de validação de processo, o que aumenta a segurança do uso do produto. Os resultados discutidos pela FDA indicam que para a vacina inativada, foram encontradas sequências do vírus no banco de células, na semente do vírus e na etapa da coleta, porém não no frasco final, fortalecendo a idéia de que o contaminante presente no início foi inativado ao longo das etapas de fabricação.

Fica claro, com a exposição destes exemplos, que a avaliação do risco potencial em um produto biológico deve ser realizada considerando a certificação dos bancos de células (e que também inclui os demais reagentes, insumos e matérias biológicos de partida), bem como a validação do processo de fabricação, dado que este pode conter etapas de redução (remoção/inativação) de agentes contaminantes. A produção de novos substratos celulares deve considerar os riscos relativos ao fenótipo tumorigênico (em especial de linhagens estabelecidas), infectividade teórica (como pela contaminação por príons) e a possibilidade de ação oncogênica de materiais como DNA, proteínas ou vírus presentes nas células (4). A evolução dos testes para detecção de vírus em produtos como vacinas evoluiu com

o tempo, aproximadamente recapitulando o próprio histórico de descoberta dos vírus.

METODOLOGIA

Foi realizado um levantamento bibliográfico das regulamentações publicadas no cenário internacional a respeito da geração de bancos de células e os testes necessários para sua certificação. Os documentos disponíveis constam nos endereços eletrônicos das seguintes autoridades e grupos:

- Organização Mundial da Saúde
- *Food and Drug Administration*
- *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

Estes guias e orientações foram analisados e confrontados a fim de suprir a lacuna legislativa que existe no Brasil a respeito do tema.

RESULTADOS

O arcabouço jurídico Brasileiro acerca do tema abordado inclui duas regulações importantes. A Lei 6360/1976, também conhecida por "Lei da Vigilância Sanitária" (7), define que os medicamentos devem possuir identidade, atividade, qualidade, pureza e inocuidade determinadas por comprovação científica e analítica.

A Resolução 55/2010 expõe, de forma mais detalhada, os requisitos para o registro de produtos biológicos no país. Ela solicita informações sobre o substrato celular usado para produzir vacinas e proteínas recombinantes, dados da procedência, identidade, pureza e estabilidade deste banco, bem como a caracterização da informação genética em linhagens modificadas (1).

No entanto, existe uma lacuna regulatória quanto ao racional e procedimentos necessários a fim de estabelecer bancos de células, bem como caracterizá-los, a fim de servirem como plataforma tecnológica para a produção de biológicos. Neste sentido, é proposto um guia com base nos documentos da OMS (4), FDA (8) e ICH (6), com os detalhamentos expostos a seguir, dentre os quais alguns pontos foram pormenorizados.

A geração de um banco a partir de uma semente celular deve ser realizada em adesão às Boas Práticas de Fabricação (BPF), o que inclui as validações, qualificações e calibrações necessárias (9). A manipulação deve ocorrer em fluxo laminar grau A, dentro de uma sala limpa classificada de grau C, no mínimo (10). Vários outros aspectos devem ser observados, como rastreabilidade dos reagentes e registro dos procedimentos; a adesão às BPF deve ser verificada por inspeção pela Autoridade Sanitária.

Os testes de caracterização devem seguir metodologias validadas, quando aplicável (11). Os laboratórios devem possuir um Sistema de Qualidade operante, avaliado mediante acreditação ou reconhecimento quanto às Boas Práticas Laboratoriais por Autoridade Competente.

Os diversos testes aplicáveis incluem a determinação da identidade, estabilidade e pureza. A autenticidade de uma linhagem celular pode ser verificada no nível de espécie por cariologia e análise de isoenzimas; e no nível de indivíduo por testes genéticos como DNA *fingerprinting* ou *profiling*, ou ensaios imunológicos como HLA (4, 6, 8). Células modificadas geneticamente para a produção de biofármacos devem adicionalmente ser caracterizadas quanto à estrutura do inserto e propriedades da expressão protéica (12). A estabilidade consiste em avaliar a manutenção das características de identidade de uma célula após seu descongelamento e ao fim da fermentação (4, 8).

A avaliação da pureza inclui testes de esterilidade quanto aos agentes microbianos e micoplasma. A redução do risco da presença de príons está focada no controle dos reagentes derivados de ruminantes. Já a contaminação viral pode ser extensivamente investigada por métodos *in vitro*, *in vivo*, bioquímicos, moleculares e por microscopia eletrônica. Por fim, o estudo do potencial tumorigênico das células e oncogênico de seus resíduos também é importante (4, 6, 8).

DISCUSSÃO

O guia proposto deve ser debatido com os setores interessados, como representantes da indústria e academia. Sua publicação deve

ocorrer através de uma Instrução Normativa (IN), de acordo com o disposto no Regimento Interno da Anvisa[2] e as Boas Práticas Regulatórias (13). A IN é uma peça regulatória útil para operacionalizar detalhes técnicos e metodológicos de um assunto; e tem caráter normativo a fim de orientar o setor regulado.

A implementação das BPF ao se estabelecer um banco de células, bem como sua certificação de forma confiável, irão proporcionar substratos qualificados em termos de identidade, pureza e estabilidade, capazes de produzir biológicos com qualidade, eficácia e segurança para uso humano.

AGRADECIMENTOS

A toda a equipe da Coordenação de Produtos Biológicos e Hemoterápicos (CPBIH/Anvisa), ao Dr. Marcos Freire e Dra. Luciane Gaspar (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

REFERÊNCIAS

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

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

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

(4) Organização Mundial da Saúde (OMS). Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks (draft version). Geneva: WHO; mai 2010. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/cells/Cell_Substrates_for_public_consultation_HK_4_May2.pdf>. Acesso em 11/05/2011.

(5) Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6ª ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2010. Cap. 11: Primary cultures . p. 163-186.

(6) The International Conference on Harmonisation of Technical Requirementes for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products Q5D. 16 jul 1997. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5D/Step4/Q5D_Guideline.pdf>. Acesso em 11/05/2011.

(7) Brasil. Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 24 set. 1976. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L6360.htm>. Acesso em 11/05/2011.

(8) Food and Drug Administration (FDA). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Guidance for industry: characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious diseases (versão final). Rockville, feb. 2010. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM202439.pdf>. Acesso em 11/05/2011.

(9) Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada nº 17 de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário

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

Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 abr. 2010; Seção 1, n.73, p.94.

(10) Organização Mundial da Saúde (OMS). Environmental monitoring of clean rooms in vaccine manufacturing facilities - draft document: points to consider for manufacturers of human vaccines. Genebra: WHO, 27 fev 2011. Disponível em: <http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/env_monitoring_cleanrooms_draft.pdf>. Acesso em 11/05/2011.

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

(12) The International Conference on Harmonisation of Technical Requirementes for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Quality of biotechnological products: analysis of the expression construct in cells used for production of r-DNA derived protein products Q5B. 30 nov. 1995. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5B/Step4/Q5B_Guideline.pdf>. Acesso em 11/05/2011.

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