Eduardo Alfredo Adami

Desenvolvimento da produção da vacina contra uma possível gripe pandêmica A(H7N9)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção de Título de Mestre em Biotecnologia

São Paulo
2017

Eduardo Alfredo Adami

Desenvolvimento da produção da vacina contra uma possível gripe pandêmica A(H7N9)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan / IPT para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lee Ho

Versão orginal

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e informação Biomédica

Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade de São Paulo

Adami, Eduardo Alfredo.
Desenvolvimento da produção da vacina contra uma possível gripe pandêmica A(H7N9) / Eduardo Alfredo Adami ; Paulo Lee Ho. São Paulo, 2017.

79 p.
Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.

1. A(H7N9) 2. Pandemia 3. . Vacina contra A(H7N9) I. Ho, Paulo Lee. Desenvolvimento da produção da vacina contra uma possível gripe pandêmica A(H7N9)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): **Eduardo Alfredo Adami**

Título da Dissertação: **Desenvolvimento da produção da vacina contra uma possível gripe pandêmica A(H7N9)**

Orientador(a): **Prof. Dr. Paulo Lee Ho**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou
( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
.....
Nome:
.....
Instituição:
.....

Examinador(a): Assinatura:
.....
Nome:
.....
Instituição:
.....

Presidente: Assinatura:
.....
Nome:
.....
Instituição:
.....

Av Vital Brasil 1500 - Casa 82
05503-900 São Paulo SP
T +55 11 3723-2132
ceuaib@butantan.gov.br
www.butantan.gov.br

butantan

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Produção de vacina contra a Gripe Pandêmica", **protocolo n° 1301/14**, sob a responsabilidade de Paulo Lee Ho – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 17/8/2016.

This is to certify that the proposal "Production vaccines flu pandemic", **protocol n° 1301/14**, under the responsibility of Paulo Lee Ho – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 8/17/2016. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 10/2014 - 07/2017	**N° de animais/espécie**	**Observação**
Laboratório de Influenza	Sem adição de animais	Extensão de prazo

São Paulo, 18 de agosto de 2016

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa Claudia, minha filha Manuela e ao meu filho Lucas, eles são a razão de tudo na minha vida.

Ao meu pai Erminio e a minha mãe Aparecida, que são os meus exemplos na vida e me ensinaram a ter determinação e a nunca desistir do que o coração manda fazer.

A minha família e aos amigos, que sem medir esforços sempre incentivaram e estiveram presentes quando eu precisei.

Muito deste trabalho se deve às pessoas envolvidas, impossível descrever de forma detalhada todos os que merecem estar aqui. Então, de uma forma geral, agradeço a toda a equipe do Laboratório de Influenza e todos os laboratórios e setores que compõem a cadeia produtiva da vacina de Influenza. Agradeço também ao Laboratório de Biotecnologia e o apoio da Diretoria do Instituto Butantan, tanto a anterior quanto a atual.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Lee Ho, que desde o começo acreditou em mim mais do eu mesmo e me incentivou e conduziu até chegar aqui.

RESUMO

ADAMI, E. A. **Desenvolvimento da produção da vacina contra uma possível gripe pandêmica A(H7N9)**. 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

No mês de março de 2013 foram reportados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) os primeiros casos de infecções humana pelo vírus Influenza aviário A(H7N9). Em maio de 2017 já haviam sido registrados 1439 casos. As infecções em humanos causadas por esse vírus são associadas a consideráveis níveis de mortalidade e morbidade. A vacinação é atualmente o meio mais efetivo para prevenir as infecções e as severas complicações na saúde humana causada pelo vírus da Gripe. Desenvolver e produzir vacinas contra a Gripe pandêmica é a estratégia principal para uma resposta contra a pandemia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Este projeto produziu os bancos de vírus H7N9, um lote piloto e três lotes industriais em condições (BPF) dos monovalentes utilizados para a produção da vacina candidata contra a gripe pandêmica, A(H7N9). Esses lotes foram caracterizados, avaliados em relação aos padrões de qualidade e testados quanto à imunogenicidade em ensaios com camundongos.

Palavras-chave: A(H7N9). Pandemia. Vacina contra A(H7N9).

ABSTRACT

ADAMI, E. A. **Desenvolvimento da produção da vacina contra uma possível gripe pandêmica A(H7N9)**. 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

In March 2013 it was reported by the World Health Organization (WHO) the first cases of human infections with avian influenza virus A (H7N9). In May 2017, 1439 cases have been reported. The infections in humans caused by this virus are associated with considerable morbidity and mortality levels. Vaccination is currently the most effective way to prevent infections and severe complications on human health caused by the flu virus. Developing and producing vaccines against pandemic influenza is the main strategy for a response to the pandemic (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). This project produce the seeds virus A(H7N9), a pilot batch and three industrial lots (GMP) of the monovalents used to produce the pandemic influenza vaccine candidate against A(H7N9). These batches were characterized, evaluated for quality standards and tested for immunogenicity in mouse assay.

Keywords: A (H7N9). Pandemic. Vaccine against H7N9.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Vírus da gripe visualizado por microscopia eletrônica 15
Figura 2 - O vírus da gripe e seus componentes..... 16
Figura 3 – Estrutura primára da hemaglutinina. A a E representam os cinco principais sítios antigênicos..... 20
Figura 4 - Diagrama esquemático do ciclo de replicação viral 22
Figura 5 - Curva epidêmica de infecção em humanos pelo H7N9 na China 26
Figura 6 – Demonstração da infecção viral única ou por dois vírus 29
Figura 7 – Resumo das etapas da produção da cepa a A/Shangai/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC-RG32A.3..... 36
Figura 8 - Fluxograma das etapas de produção do banco estoque 39
Figura 9 - Fluxograma das etapas de produção do banco trabalho 41
Figura 10 - Fluxograma das etapas de produção do lote piloto..... 43
Figura 11 – Esquema de um ensaio de hemaglutinação e inibição da hemaglutinação..... 53
Figura 12 - Representação da seleção do poço resultado do teste de inibição da hemaglutinina..... 59
Figura 13 – Gráfico representando os títulos obtidos para os grupos PBS, 45 µg, 15 µg, 7,5 µg e 3,75 µg aos 21 dias após uma dose e aos 42 após segunda dose..... 60
Figura 14 – Gel de eletroforese das etapas intermediárias de produção 67
Figura 15 – Representação gráfica dos títulos obtidos para os ensaios de Inibição da Hemaglutinação 69
Figura 16 – Linha do tempo com prazos estimados para produção da vacina 71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Análises farmacopeicas mandatórias 47
Quadro 2- Principais diferenças de produção entre o lote piloto e o lote industrial 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Organização do genoma do vírus da influenza 18
Tabela 2 - Registros dos resultados dos testes realizados com o produto final 57
Tabela 3 – Comparação entre A(H7N9) e A(H1N1) 63
Tabela 4 - Registros dos resultados dos testes realizados com o produto final do Lote 1 64
Tabela 5 - Registros dos resultados dos testes realizados com o produto final do Lote 2 64
Tabela 6 - Registros dos resultados dos testes realizados com o produto final do Lote 3 65
Tabela 7 - Resultados dos estudos de purificação e recuperação da hemaglutinina 66

LISTA DE SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF - Boas Práticas de Fabricação
CDC - Centers for Disease Control and Prevention
CEUAIB - Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan
cRNA - Ribonucleoproteínas complementares
CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
ELISA - Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
HA - Hemaglutinina
LA - Líquido Alantoico
M - Proteína M
MAPA - Ministério da Agriculta e Pecuária e Abastecimento
MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
mRNA - Ribonucleoproteínas mensageiras
NA - Neuraminidase
NB3 - Nível de Biossegurança 3
NBGE2 - Nível de Biossegurança em Grande Escala 2
NP - Núcleo Proteína
NS - Proteína Não estrutural
NS1 - Proteína Não Estrutural 1
NS2 - Proteína Não Estrutural 2
OGM - Organismo Geneticamente Modificado
OMS - Organização Mundial de Saúde
PA - Polimerase ácida
PB1 - Polimerase básica 1
PB2 - Polimerase básica 2
PBS - Buffer Solution Phosfate
PIP - Pandemic Influenza Preparedness
pNPP - Para-nitrofenil-fosfato
POP - Procedimentos Operacionais Padrões
RDE - Receptor Destroying Enzyme
RNA – Ribonucleoproteínas
SPF - Specific Pathogen Free

TEMED - Tetrametileno-diamina

vRNA - Ribonucleoproteínas virais

WHO - World Health Organization

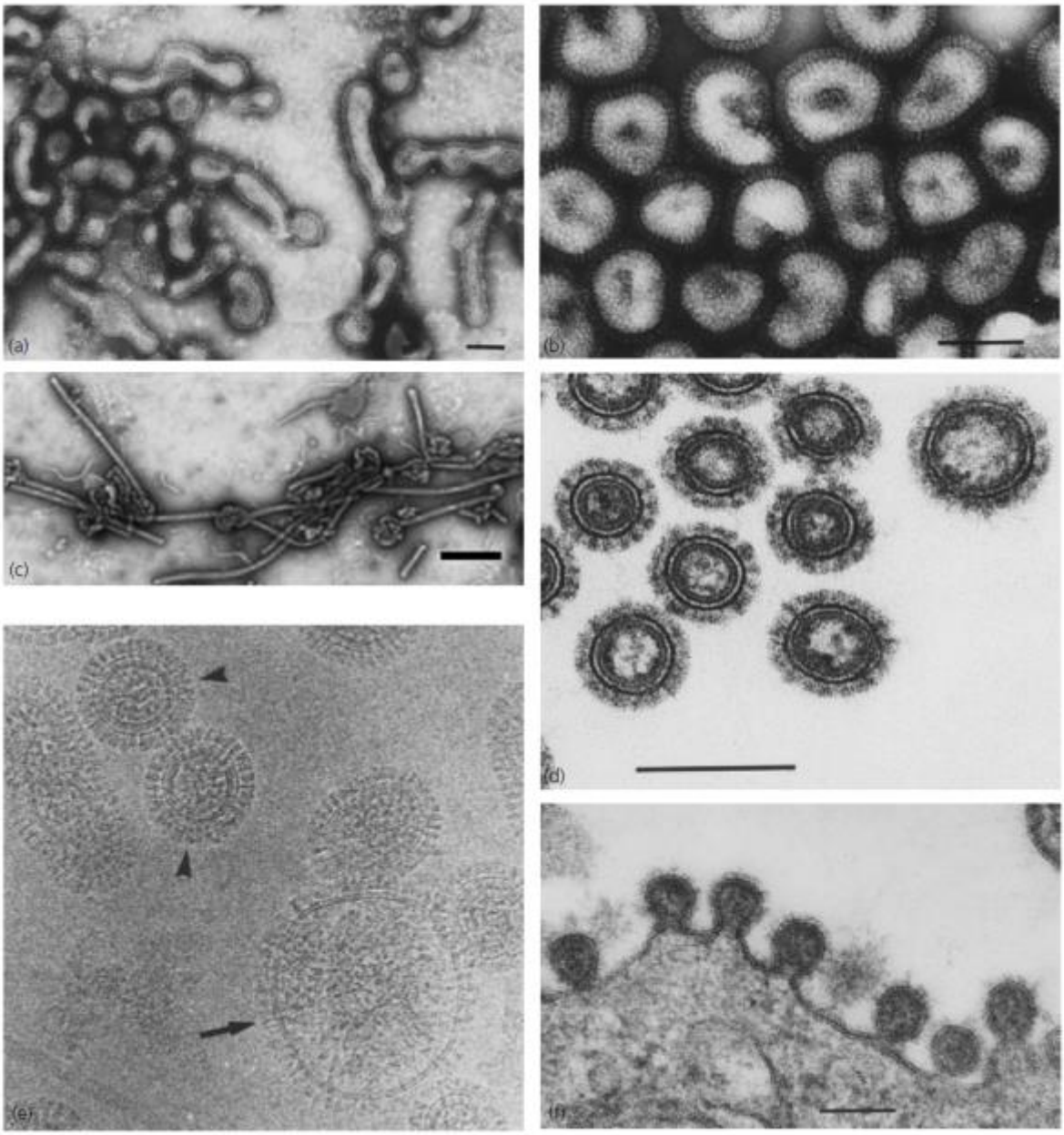
SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **15**
1.1 As pandemias causadas pelo vírus da gripe **24**
1.2 Principais ações contra uma pandemia **29**
1.3 História e evolução da vacina contra a gripe **31**
1.4 Geração das cepas pandêmicas **34**
2 MATERIAIS E MÉTODOS **36**
2.1 Produção dos bancos **36**
2.1.1 Produção do banco estoque (BE001/14) **37**
2.1.2 Produção do banco trabalho (BT001/14) **40**
2.2 Lote piloto **42**
2.2.1 Imunização em camundongos **45**
2.3 Produções do monovalente H7N9 em escala industrial e condições BPF **45**
2.4 Análises realizadas **47**
2.4.1 Análises farmacopeicas **47**
2.4.1.1 Testes físicos químicos **48**
2.4.1.1.1 Dosagem de proteína **48**
2.4.1.1.2 Dosagem de formaldeído **48**
2.4.1.1.3 Dosagem do detergente aniônico **48**
2.4.1.2 Testes de controle biológico **48**
2.4.1.2.1 Determinação do teor de hemaglutinina **49**
2.4.1.2.2 Dosagem de ovalbumina **49**
2.4.1.2.3 Inativação viral **50**
2.4.1.2.4 Identidade de hemaglutinina **50**
2.4.1.3 Testes de controle microbiológico **50**
2.4.1.3.1 Esterilidade **51**
2.4.1.3.2 Teste de endotoxina bacteriana **51**
2.4.2 Análises exploratórias **51**
2.4.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) **51**
2.4.2.2 Imunização em camundongos **52**
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO **54**
3.1 Produção dos bancos **54**
3.2 Lote piloto **55**

3.2.1 Lotes de produção em escala industrial **.....62**
4 CONCLUSÃO 73
REFERÊNCIAS.....74

1 INTRODUÇÃO

A gripe ou *influenza* é uma infecção viral que afeta principalmente as vias respiratórias, o nariz, a garganta, brônquios, e ocasionalmente os pulmões. Os sintomas geralmente duram cerca de uma semana, caracterizados pelo aparecimento súbito de febre alta, dores musculares, cefaleia, mal-estar, tosse, dor de garganta e rinites (WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO) 2014a).



(a) Vírus filamentoso. (b) Vírus esférico (escala 100 nm). (c) Vírus filamentoso. (d) Vírus seccionado para captura da imagem interna. (e) Vírus em alta resolução de microscopia eletrônica. (f) Vírus brotando pela membrana celular.

Figura 1- Vírus da gripe visualizado por microscopia eletrônica

Fonte: Cox et al.(2009)

O vírus da gripe pode infectar homens e animais, pertence à família O*rthomyxoviridae*, composta por cinco gêneros, sendo os mais importantes o *Influenza vírus A, Influenza vírus B* e *Influenza vírus C.* Apresenta massa molecular aproximadamente de 250000 KDa e densidade em solução de sacarose na faixa de 1,19 g/cm³. São sensíveis ao calor, solventes lipídicos, detergentes não iônicos, formaldeído, irradiação e agentes oxidantes (COX et al., 2009).

Os genomas dos vírus do tipo A e B possuem oito segmentos que codificam pelo menos 11 proteínas, enquanto o genoma do tipo C possui sete segmentos que codificam nove proteínas (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009).

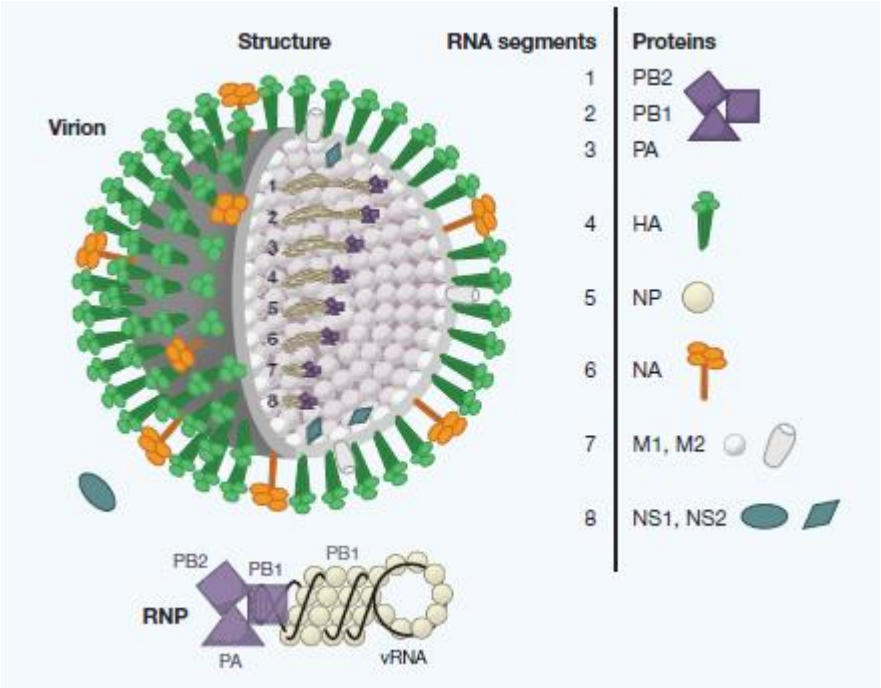


Figura 2 - O vírus da gripe e seus componentes
Fonte: Wendel; Matrosovich; Klenk (2015)

As partículas virais possuem de oito a nove proteínas estruturais diferentes, dependendo do gênero do vírus, dentre essas: Polimerase básica 2 (PB2) com massa molecular de 85,7 KDa (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009), Polimerase básica 1 (PB1), 86 KDa (LAMB; CHOPPIN, 1976), Polimerase ácida (PA), 85 KDa (FODOR et al., 2002), NP (Núcleo Proteína), 56 KDa. A NP é usada para distinguir os três gêneros: *Influenza A, B e C* (MARTINS, 2001). As proteínas M1, 27,8 KDa também são utilizadas para distinção dos três gêneros assim como a M2, 11 KDa, que participa da inserção das NP no núcleo da célula hospedeira (SCHROEDER et

al., 1994), e as proteínas Proteína Não Estrutural 1 (NS1), 26,8 KDa, (HALE et al., 2008), Proteína Não Estrutural 2 (NS2), 14,2 KDa (ROBB et al., 2009). A Hemaglutinina (HA) com 76 KDa que é muito estudada devido a sua importância na patogenicidade do vírus e para resposta imunológica no indivíduo (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009) e a Neuraminidase (NA) 50 KDa que é responsável pelo processo de clivagem de ácidos siálicos, impedindo que as partículas virais geradas no processo de infecção fiquem imobilizadas na superfície das células infectadas (MARTINS, 2001).

Tabela 1 - Organização do genoma do vírus da influenza

Número do segmento*a	Tamanho RNA viral (nt)	Proteína codificada IA	IB	Peso Molecular	Descrição e Função
1	2341	PB2	PB2	85.700	Componentes da polimerase viral
2	2341	PB1, PB1-F2	PB1	86.500	
3	2233	PA	PA	84.200	
4	1778	HA	HA	61.500	Glicoproteína de superfície, medeia a fixação do vírus às células; é ativado por clivagem, e possui atividade de fusão em pH ácido.
5	1565	NP	NP	56.100	Associada ao RNA viral e às polimerases. Estrutura helicoidal.
6	1413	NA	NA, NB	50.000	Enzima neuraminidase. Permite a expansão da infecção por facilitar o acesso da partícula viral à superfície das células alvo.
7	1027	M1	M1	27.800	Proteína da matriz, principal componente do vírion, reveste o lado interno do envoltório.
		M2	BM2	11.000	Proteína de membrana integral, canal de íons, de mRNA processado.
8 *c	890	NS1	NS1	26.800	Não estrutural, inibe a exportação nuclear de mRNA
		NS2 *b	NS2	14.200	Componente menor de vírions, função desconhecida.

*a. Os segmentos de RNA são numerados de acordo com seus tamanhos decrescentes.
*b. As massas moleculares das glicoproteínas HA e NA podem sofrer variações chegando a 76,000 e 56,000 KDA respectivamente.

Fonte: Adaptado de Brooks et al. (2013)

Atualmente já foram reconhecidos dezesseis tipos de HA e nove tipos de NA. A combinação dessas duas proteínas da superfície viral dá origem aos diferentes subtipos virais. Esses subtipos virais em sua maioria podem ser encontrados em seus hospedeiros naturais (reservatório): as aves terrestres e aquáticas. Esses vírus podem adaptar-se para infectar seres humanos (RESA-INFANTE, P. et al., 2011).

A análise de variantes virais possibilitou a identificação de cinco sítios antigênicos na região HA1 da hemaglutinina, denominados pelas letras A a E, que são passíveis de sofrer mutações, sendo, portanto, as regiões de maior variabilidade da HA. Esses sítios estão dispostos sobre a sua superfície e estão envolvidos na neutralização viral pelos anticorpos. Já outras regiões são mais conservadas em todos os vírus isolados, cuja sequência foi estabelecida, concluindo-se que são necessárias para que a molécula mantenha a sua estrutura e função (BROOKS et al. 2013; MARTINS, 2001; MURPHY; WEBSTER, 2001; WILEY; WILSON; SKEHEL, 1981) (Figura 3).

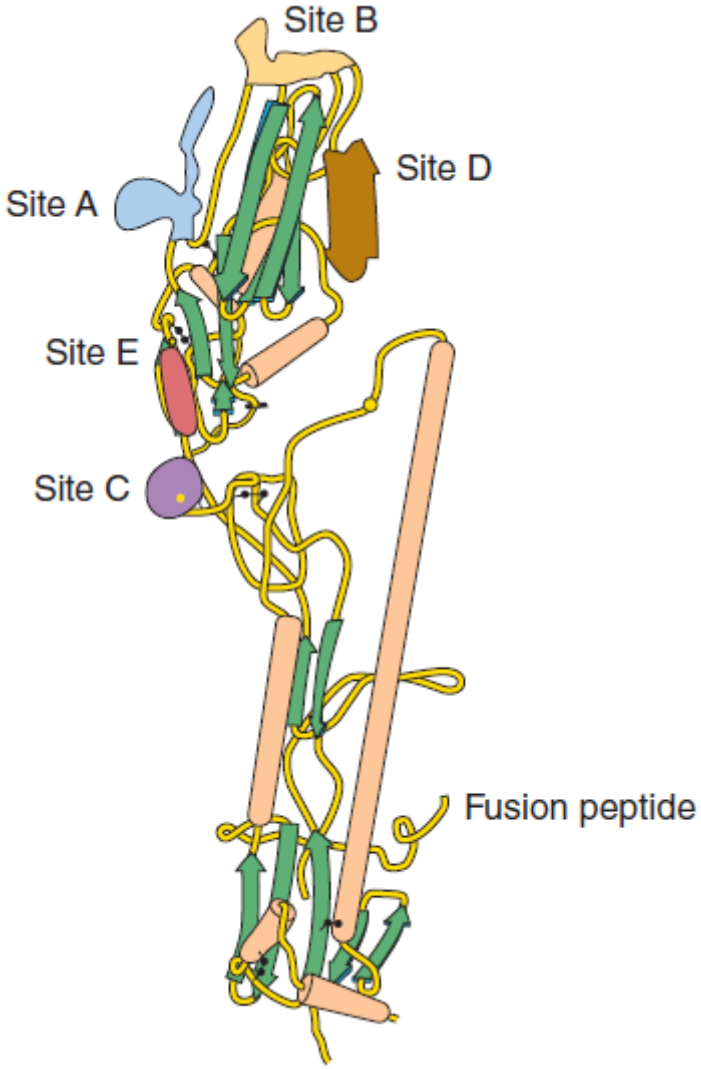


Figura 3 – Estrutura primária da hemaglutinina. A a E representam os cinco principais sítios antigênicos
Fonte: Brooks et al. (2013)

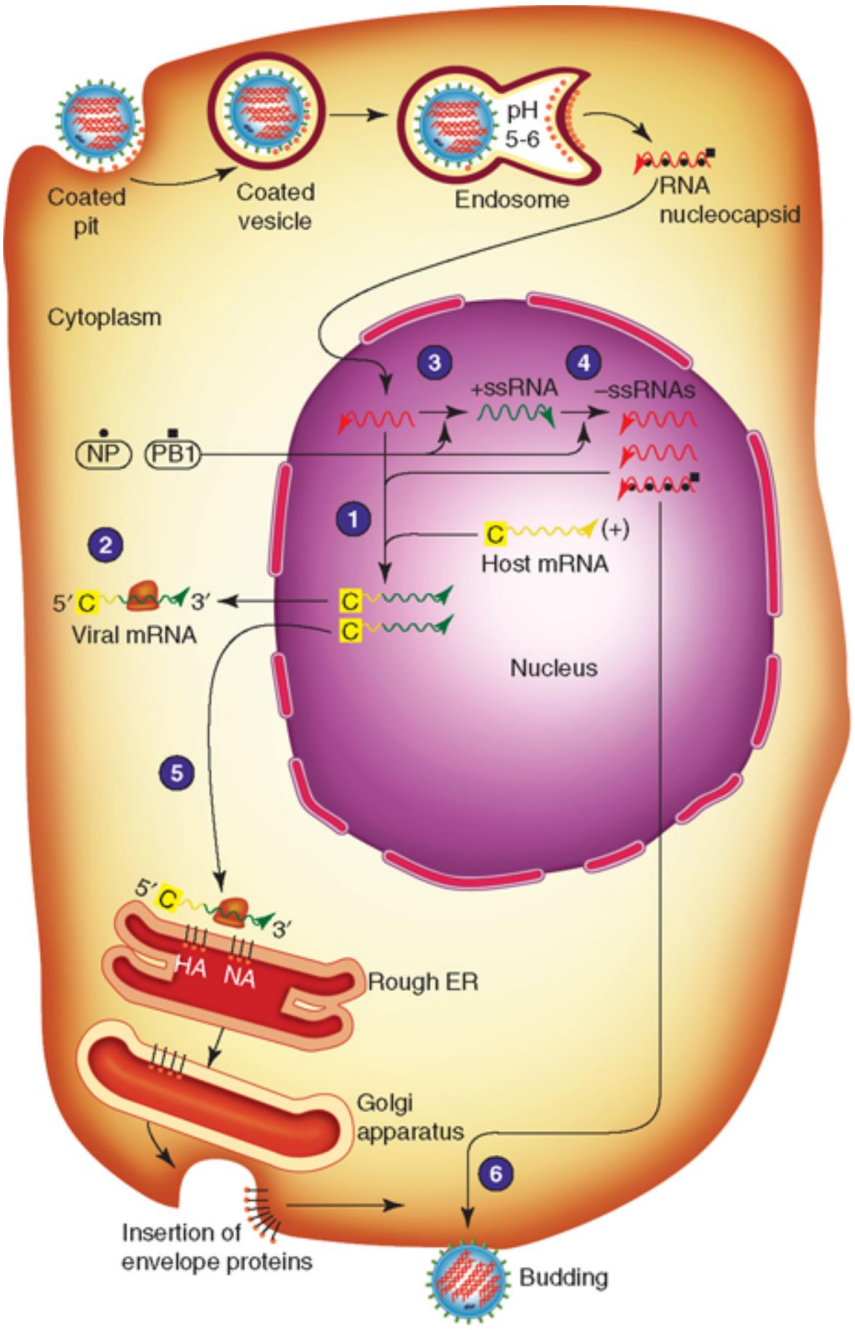
A hemaglutinina e a neuraminidase são proteínas imunogênicas (ZHOU et al., 2017), sendo a hemaglutinina o primeiro alvo da neutralização por anticorpos (FORLEO-NETO et al., 2003; PONTORIERO et al., 2003).

Os vírus da gripe são parasitas intracelulares obrigatórios e só podem se replicar em células vivas uma vez que utilizam todo o maquinário celular para realizar a replicação. Este é um processo que ocorre em várias etapas nas células dos hospedeiros: em primeiro lugar, o vírus precisa entrar na célula; em seguida, produzir cópias de ribonucleoproteínas (RNA) e proteínas, montar os componentes

das novas partículas virais e então sair da célula hospedeira (SMITH; HELENIUS, 2004).

O início do ciclo replicativo ocorre quando o vírus entra em contato e liga-se com a célula alvo através da afinidade da hemaglutinina com a mucoproteína (receptor) presente na superfície das células epiteliais, geralmente da mucosa nasal, garganta e pulmões, que possuem ácido siálico (SMITH; HELENIUS, 2004).

A ligação entre o vírus e a célula se dá devido à capacidade de a hemaglutinina viral reconhecer as moléculas de Ácido 5-N-acetilneuramínico (ácido siálico) presente na superfície celular. Após essa ligação, a partícula viral é internalizada na célula por meio da formação de endossomas. Ao ser formado o endossoma começa um processo natural de acidificação (pH~5,0). Essa alteração de pH provoca uma alteração na conformação da hemaglutinina, que rompe o envelope viral assim como a superfície da parede do endossoma, expondo no citoplasma celular as proteínas e ribonucleoproteínas virais (vRNA). A acidificação do meio também tem um papel fundamental na ruptura do complexo formado pela proteína M1 e os vRNA virais que são grandes demais para passar pelos poros do núcleo celular. A passagem dos ions H+ para a parte interna do vírus é possibilitada pelo canal iônico presente no envelope viral, M2. Após expostos no citoplasma celular, os vRNA são importados para o núcleo celular, onde se inicia a replicação, formando as ribonucleoproteínas mensageiras (mRNA) (RNA mensageiro) que dependem da catálise de polimerases, e após essa formação é exportado do núcleo para o citoplasma e servirá de base para a síntese proteica nos retículos endoplasmáticos rugosos. Concomitante ao processo descrito, e também no núcleo celular, ocorre a formação das ribonucleoproteínas complementares (cRNAs) que formarão os novos vRNAs. Os vRNAs são exportados do núcleo para o citoplasma, onde ocorre a formação das novas partículas virais que se unem à membrana plasmática da célula, finalizando a formação do capsídeo viral e pela saída da célula (WHITTAKER, 2001).



(1) Após a ligação mediada por receptores entre o vírus e a célula, ocorre a endocitose da partícula viral e posterior exposição do RNA viral no citoplasma. A seguir, ocorre o rompimento do capsídeo viral e da membrana do endossoma pela hemaglutinina, o material genético viral é então internalizado no núcleo celular. (2) Proteínas necessárias para a transcrição do RNA são sintetizadas no citoplasma e internalizadas no núcleo, principalmente a NP e PB1. A PB1 é fundamental para a síntese de novas partículas de RNA (-ssRNA). (4) Parte dessas moléculas de RNA serve como modelo para a síntese de mais moléculas que mais tarde servirão para formação de partículas virais, e parte é transcrita como RNAm, que realiza a síntese de proteínas estruturais no retículo endoplasmático celular. (5) Tradução e inserção das proteínas virais na parede celular, estas que farão a formação de novas partículas virais. (6) Genoma viral sendo “empacotado” e a liberação das novas partículas virais.

Figura 4 - Diagrama esquemático do ciclo de replicação viral
Fonte: Brooks et al. (2013)

Por possuir RNA segmentado, o vírus da gripe é extremamente passível de sofrer mutações e gerar cepas com variações antigênicas que podem não apresentar nenhuma proteção por anticorpos gerados por cepas anteriores. Para esses casos somente quando estão envolvidas as sequências genéticas da HA e NA. Essas alterações podem ocorrer por duas vias, *drift* ou *shift.* A primeira delas, a alteração tipo *drift,* engloba alterações menores que podem levar um longo prazo para estabelecer mudanças capazes de alterar uma cepa, basicamente tratam de alterações acumuladas no código genético viral que podem ocorrer durante as replicações por erros nas sequências de aminoácidos nas formações das novas proteínas. Já as alterações tipo shift compreendem alterações maiores, que podem ocorrer quando há infecção conjunta de uma mesma célula por diferentes cepas virais. Nesses casos pode haver troca de vRNA entre espécies, gerando novas espécies com mistura dos oito segmentos. Esses casos normalmente ocorrem em um curto espaço de tempo e misturam cepas virais de humanos com cepas aviárias ou suínas (BROOKS et al., 2013).

Transmitido facilmente, o vírus pode passar de pessoa a pessoa por meio de aerossol, gotículas de saliva e secreções, produzidas por pessoas infectadas quando tossem ou espirram. A gripe tende a se espalhar rapidamente em epidemias sazonais (WHO, 2014a).

Em humanos o vírus da gripe sazonal normalmente tem seu ciclo de infecção na parte superior do sistema respiratório. Contudo, em humanos com doenças causadas por bactérias pode ocorrer a infecção do trato respiratório inferior, ocasionando, por exemplo, bronquite crônica ou enfisemas. Bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e diversos bacilos gram negativos produzem proteases extracelulares e inflamações que podem potencializar a ação da há, causando um agravamento da infecção no trato superior, podendo assim gerar infecções mais sérias, como a mortal pneumonia (WHITTAKER, 2001).

Salvo casos de epidemias nas quais o tempo de produção da vacina pode comprometer a imunização, a vacinação anual contra a gripe é o mais efetivo método para prevenção da doença. A vacinação com o tipo viral mais atualizado definido pelos setores de vigilância é recomendada para todos os indivíduos maiores de 6 meses que não tenham contraindicação (FIORE et al., 2010).

Estudos de ordem econômica sobre a vacinação contra a gripe indicam que ela reduz ou minimiza os custos com tratamentos de saúde, como pronto atendimento e internações hospitalares, perdas de produtividade e morbidade dos indivíduos infectados (FIORE et al., 2010).

Foi estimado que o custo econômico anual da gripe sazonal nos Estados Unidos pode ser de US$ 87,1 bilhões, incluindo US$ 10,4 bilhões em custos médicos diretos. Estudos sobre a vacinação contra a gripe nos Estados Unidos, entre pessoas com idade ≥ 65 anos, têm estimado uma redução substancial em hospitalizações e mortes (FIORE et al., 2010). A maioria dos infectados recupera-se dentro de 1-2 semanas, sem a necessidade de tratamento médico (WHO, 2014a).

O vírus da gripe pode causar doença entre pessoas de todos os grupos etários, contudo, as taxas de infecções são maiores entre as crianças. Durante os meses de epidemias, os riscos de problemas com saúde mais agudos e mortes por gripe sazonal são mais elevados entre os adultos com idade ≥ 65 anos, crianças menores de 2 anos e pessoas de qualquer idade que estejam sob tratamento médico severo e que sofram complicações nas condições de saúde devido à gripe (FIORE et al., 2010).

Os casos de gripe estimados nos EUA são de 25 a 50 milhões por ano, gerando 150 mil casos de hospitalização e 30 a 40 mil mortes. Se essas estimativas fossem extrapoladas para o cenário mundial, os casos de gripe estariam na ordem de 1 bilhão de infectados, 3 a 5 milhões de casos severos que requerem hospitalizações e 300 a 400 mil casos de morte (WHO, 2014b).

Epidemias e surtos de gripe ocorrem com diferentes padrões sazonais, dependendo da região do mundo. Em zonas de clima temperado, as epidemias sazonais geralmente começam no final do outono e têm o pico no final do inverno. Nas zonas tropicais, os padrões sazonais parecem ser menos pronunciados (WHO, 2014b).

1.1 As pandemias causadas pelo vírus da gripe

As principais pandemias do vírus da gripe do século XX ocorreram em 1918, 1957 e 1968. Os locais prováveis do aparecimento desses vírus foram, respectivamente, e Espanha, alguns países da Ásia, principalmente Hong Kong. Os

subtipos virais caracterizados nessa época foram: H1N1, H2N2 e H3N2 (KILBOURNE, 2006).

A grande pandemia de 1918, que ficou conhecida como Gripe Espanhola, causou aproximadamente 50 milhões de mortes pelo mundo todo, mas o impacto dessa pandemia não ficou limitado somente aos anos de 1918-1919. Todos os vírus do tipo A que acometem humanos (com exceção das infecções causadas pelos subtipos aviários H5N1 e H7N9) que causaram e causam doenças atualmente são descendentes do vírus H1N1 dessa época (TAUBENBERGER; MORENS, 2006).

As pandemias de 1957 e 1968 foram responsáveis por aproximadamente um milhão de mortes cada.

A mais recente epidemia ocorreu no ano 2009 com a cepa A/H1N1, que se espalhou por praticamente todo o mundo em poucas semanas. Em 11 de junho de 2009, a Organização Mundial de Saúde (OMS) elevou o nível de alerta pandêmico mundial para a fase 6 (última fase), caracterizando uma pandemia, com evidência de transmissão comunitária disseminada do vírus da gripe A/H1N1, novo subtipo viral em pelo menos dois continentes. Essa ação foi motivada pela rápida propagação do vírus e não pela gravidade da doença (DUARTE et al., 2009).

A sazonalidade de ocorrências de pandemias relacionadas ao vírus da gripe na nossa história demonstra que pandemias futuras são inevitáveis. Dessa forma, hoje há uma preocupação mundial sobre como poderemos responder a uma crise dessa magnitude. Uma forma de se preparar é poder predizer qual cepa seria a causadora da pandemia, ganhando assim tempo para combater as infecções com a administração de vacina que necessariamente precisa ser preparada com o tipo especifico de vírus.

A vacinação é atualmente o meio mais efetivo para prevenir as infecções e as severas complicações na saúde humana causadas pelo vírus da gripe. Desenvolver e produzir vacinas contra a gripe pandêmica é a estratégia principal para uma resposta contra a pandemia (WHO, 2016b).

Dessa forma a OMS tem desenvolvido programas de vigilância sanitária mundiais para acompanhar a prevalência dos vírus da gripe. Relatórios dessas vigilâncias têm demostrado que há cepas prevalentes em aves que têm infectado humanos com frequência, tornando-se potenciais cepas pandêmicas.

Em março de 2013, por exemplo, foram reportados pela OMS os primeiros casos de infecções humanas pelo vírus Influenza aviário A(H7N9). Em março de

2017 já haviam sido registrados 1307 casos e destes foram associados 489 casos fatais (WHO, 2014b).

Quatro picos de infecção por H7N9 foram reportados entre 2013 até setembro de 2016. Estudos mostraram que as características do vírus e sua epidemiologia não sofreram alterações significativas. Houve, inclusive, declínios na quantidade de casos durante esse período. Mas, a partir de setembro de 2016, observou-se, além de uma antecipação das infecções em humanos, um aumento no número de casos. Em 9 de Janeiro de 2017 já haviam sido reportados pela WHO 106 casos ocorridos somente em dezembro, número muito acima aos 4 períodos anteriores de vigilância similares (Figura 5).

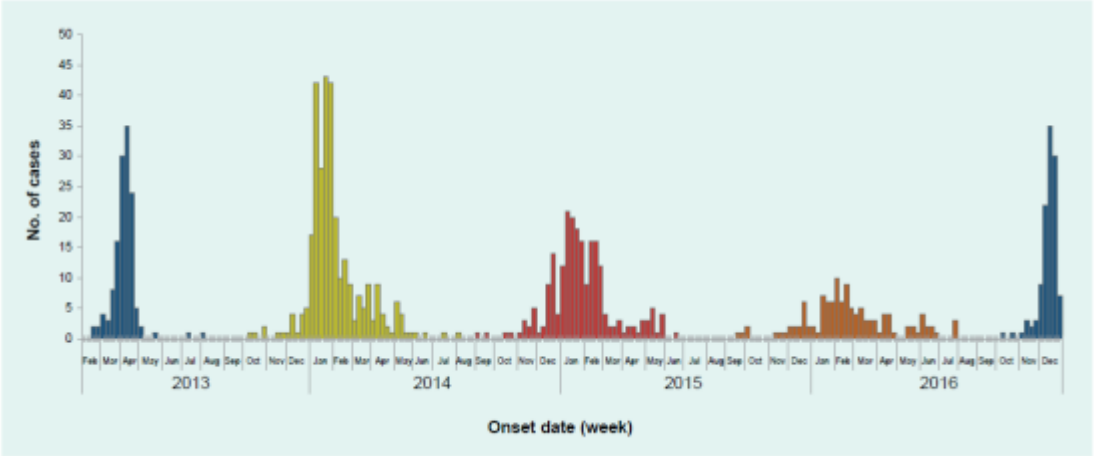


Figura 5 - Curva epidêmica de infecção em humanos pelo H7N9 na China
Fonte: Zhou et al. (2017)

Esse aumento de casos verificado em dezembro de 2016 tem sido intensivamente investigado, mas estudos recentes não encontraram um fato que justifique por completo. Em relação à transmissão entre humanos não foram encontradas alterações significativas que suportem essa hipótese. Os casos de infecções em aves passam por uma vigilância menos eficiente, e tampouco foram encontradas alterações significativas. Uma hipótese é a de que o Ano Novo Chinês, que ocorreu próximo ao período relatado, possa ter aumentado o consumo de carne de aves, aumentando assim a exposição da população (WHO, 2016a).

As infecções em humanos causadas por esse vírus são associadas a consideráveis níveis de mortalidade e morbidade. Esse rápido aumento nos

números de casos em um curto período de tempo alarmou os centros de vigilância sobre o potencial pandêmico do vírus A(H7N9). Atualmente não há registros de transmissão do vírus de humanos para humanos, mas, em contrapartida, a imunidade da população contra o vírus é considerada praticamente nula e o vírus demonstrou considerável habilidade em causar doença severa (TANNER; TOTH; GUNDLAPALLI, 2015).

A contínua prevalência do vírus H7N9 no meio ambiente, até o momento contido na China, mesmo que não comprovada a transmissão entre humanos, passou a ser considerada preocupante principalmente após os trabalhos de Herfst (2012). Esse estudo mostrou que a cepa de A/H5N1 de alta patogenicidade que gerou mortes devido à contaminação de humanos pelas aves, principalmente na China nos anos 2003 e 2004, em que ainda não foram diagnosticadas transmissões entre mamíferos, adaptou-se a essa função após algumas alterações genéticas causada por mutações na HA e PB2 das cepas virais após passagens em ferretes. Concluiu-se que a cepa A/H5N1 pode adaptar-se por meio de mutações e passar a ser transmitida entre mamíferos, o que causaria uma pandemia com uma cepa letal.

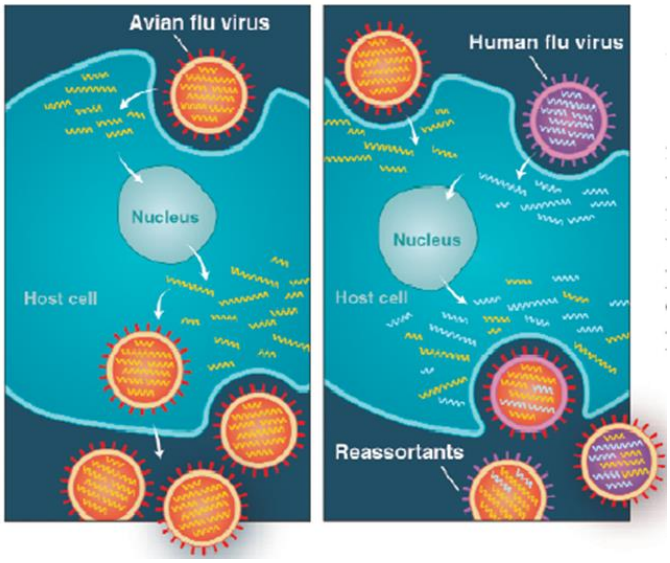
A adaptação que pode tornar um vírus aviário transmissível entre humanos está ligada principalmente ao início do ciclo de infecção viral com a interação da hemaglutinina do vírus da gripe com o ácido siálico celular; em função disso, essa interação tem sido intensivamente estudada.

A HA pode possuir sequências de aminoácidos que as deixam com conformações mais reativas a diferentes moléculas. No caso das infecções em aves, a HA da cepa viral aviária é mais susceptível a interagir com a molécula α-2,3 galactose que se encontra ligada ao ácido siálico das células de aves (SHINYA et al., 2006).

Tem sido demonstrado que as cepas virais que acometem humanos possuem afinidade de interação com a molécula α-2,6 galactose. Essa molécula está presente nas células do epitélio do trato respiratório superior, o que faz com que as cepas virais adaptadas dessa forma sejam transmitidas mais facilmente por gotículas de espirros ou contato. Porém, também é descrita a presença da molécula α-2,3 galactose em células do trato respiratório humano inferior, traqueia e brônquios. Tal fato faz com que os humanos possam infectar-se tanto por cepas aviárias como por cepas humanas (VAN RIEL et al., 2006).

A ligação ao receptor celular humano parece ocorrer preferencialmente em unidades de ácido siálico (5-N-Acetil Neuramínico), enquanto que em porcos e cavalos, a ligação é mediada por unidades de N-Glicolil Neuramínico. Também foi descrito que a ligação aos ácidos siálicos terminais podem ocorrer em resíduos ligados a galactoses por ligação α2,6 ou α2,3 (SHINYA et al., 2006; VAN RIEL et al., 2006) e que essa especificidade está ligada ao aminoácido da posição 226 da proteína HA. Quando o aminoácido nessa posição é uma Leu, a HA tem uma especificidade para a ligação α2,6 (humanos), e quando é um Glu, a preferência é para a ligação α2,3 (aves e cavalos). Ácidos siálicos com ligação α2,6 e α2,3 estão presentes na traqueia de porcos, fazendo que este animal possa ser infectado tanto por linhagens humanas como aviárias da gripe (WHITTAKER, 2001). É importante também destacar que a co-infecção de distintos vírus em uma única célula hospedeira poderá gerar novas linhagens virais por mecanismo de combinação genética entre os diversos segmentos genômicos virais (*reassortants*), podendo levar à criação de uma cepa pandêmica em potencial (Figura 6).

(A) (B)



(A) Quando um único vírus da influenza infecta uma célula, os oito segmentos genômicos do vírus são replicados e transmitidos novamente para os novos vírus. (B) Quando dois vírus diferentes infectam a mesma célula, pode ocorrer a combinação dos oito segmentos de cada vírus, resultando na formação de novos vírus (reassortants).

Figura 6 – Demonstração da infecção viral única ou por dois vírus
Fonte: Baseado em Enserink (2004)

O vírus da gripe A(H7N9) estudado nesta dissertação tem circulado entre humanos e aves desde 2013, sendo até o momento considerado uma zoonose transmitida por aves. O vírus da gripe é extremamente mutante, e a constante exposição em humanos pode ocasionar uma alteração genética que torne a hemaglutinina mais suscetível a infecções no trato respiratório superior, ou seja, possibilitaria a interação com a α-2,6 galactose, podendo assim ocasionar o início de uma pandemia.

1.2 Principais ações contra uma pandemia

A OMS estabelece um plano que classifica a sequência de fatos que podem ocorrer em uma pandemia. As fases são divididas em números de 1 a 6 que estabelecem níveis mais baixos, 1 e 2 quando são identificados vírus da gripe que prevalecem em animais (reservatórios naturais) e os primeiros casos de infecções humanas. As fases 3 e 4 compreendem períodos nos quais já são verificados casos

em que há humanos contaminados que conviveram com humanos que possuíam o vírus (*cluster*) até a comprovação de transmissão entre humanos. Para as fases 5 e 6 são feitas avaliações geográficas estabelecendo os limites de contágio entre países e, no caso mais severo, entre continentes (WHO, 2017).

As classificações dessas fases têm o principal intuito de estabelecer uma sequência de ações para o combate à pandemia, que irá exigir, além da vacinação, uma combinação de estratégias em métodos farmacêuticos e profiláticos. Dentre os principais meios profiláticos podemos destacar desde atitudes mais simples, como o hábito de lavar as mãos frequentemente, até a utilização de máscaras e uma mobilização social para o isolamento das pessoas, como, por exemplo, o fechamento de creches e escola, centros de saúde e outras situações que possam aglomerar as pessoas. Protocolos de isolamentos em quarentena também podem ser adotados. Dentre os métodos farmacêuticos, além da vacinação, podemos destacar o uso de antivirais. Em casos de epidemias existem duas classes de antivirais principais que podem ser utilizados como alternativa emergencial para o tratamento e/ou profilaxia das infecções causadas pelo vírus da gripe (SINGH; PANDEY; MITTAL, 2010).

A primeira classe de antivirais são inibidores dos canais formados pela proteína viral M2, como a amantadina (Symmetrel; EndoPharmaceuticals, Chads Ford, PA) e a rimantadina (Flumadine; Forest Pharmaceuticals, St Louis, MO), que só possuem efeito contra os vírus da gripe tipo A. Nos últimos anos, o vírus da gripe vem demonstrando uma resistência aos inibidores dos canais M2, com um aumento da taxa de resistência verificado em escala mundial de 1,9% para 12,3% (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, (CDC) 2010a). A segunda classe é formada por inibidores de Neuraminidase, oseltamivir (Tamiflu; Roche Laboratories, Nutley, NJ) e zanamivir (Relenza; GlaxoSmith-Kline, ResearchTriangle Park, NC), que possuem efeito sobre os *Influenza virus A* e *B* (OXFORD; LAMBKIN, 1998).

O tratamento antiviral ainda é considerado uma técnica cara quando utilizada em larga escala, além disso, apresenta restrições para crianças e mulheres grávidas por manifestar efeitos colaterais (CDC, 2010b). Entretanto, em casos de epidemias provocadas por vírus emergentes, a manufatura e a distribuição das vacinas podem demorar de 6 a 8 meses, sendo mais eficaz, nesses casos, o uso dos antivirais para a contenção das epidemias (LONGINI JUNIOR et al., 2004).

As análises de novos vírus subtipos do H7N9 demonstraram alterações genéticas em sítios da Neuraminidase específicos para a ação dos antivirais demonstrando assim que esses subtipos virais possuem baixa sensibilidade ao medicamento (WHO, 2016a).

Considerando que a vacinação é atualmente o meio mais efetivo para prevenir as infecções e as severas complicações na saúde humana causadas pelo vírus da gripe, desenvolver e produzir rapidamente vacinas contra a gripe pandêmica é a estratégia principal para uma resposta contra a pandemia (WHO, 2016b).

1.3 História e evolução da vacina contra a gripe

Pesquisas para o desenvolvimento da vacina contra gripe iniciaram-se desde o isolamento do vírus humano da gripe em 1933. Em 1945, a primeira licença para produção de vacina contra a gripe foi concedida nos Estados Unidos da América (CROVARI; ALBERTI; ALICINO, 2011).

As primeiras vacinas licenciadas utilizavam cepas de vírus cultivadas em ovos de galinha embrionados, que eram inativadas com formol. Eram purificadas e concentradas por meio da técnica de adsorção/eluição em eritrócitos. Essa técnica não possibilitava a expansão da escala de produção e outros métodos utilizados não apresentavam rendimento satisfatório (CROVARI; ALBERTI; ALICINO, 2011).

Novas técnicas de produção foram desenvolvidas, dentre elas, os métodos de clarificação do líquido alantoico colhido dos ovos embrionados que continham o vírus cultivado por centrifugação, e o método de purificação por meio de centrifugações zonais de fluxo continuo em gradiente de sacarose, que possibilitaram o aumento da escala de produção e pureza das suspensões virais preparadas (CROVARI; ALBERTI; ALICINO, 2011).

As primeiras vacinas licenciadas que continham a suspensão viral inativada por formol foram chamadas de *inactivated whole-virus* e demonstravam uma boa tolerância entre adultos e idosos, mas provocavam reações em crianças e adolescentes. Devido a isso, foi licenciada a vacina chamada de *split-vírus vaccines* em 1968 nos Estados Unidos da América. Nesse tipo de vacina, as partículas virais são rompidas pela ação de detergentes e a composição da vacina é formada por fragmentos do vírus, RNA, proteínas do núcleo viral e proteínas residuais dos ovos;

essa vacina provoca uma satisfatória imunização com reduzidas reações adversas (ZUCKERMAN et al., 2009).

Durante a década de 1960, a vacina do tipo *live attenuated influenza vaccines,* que utiliza cepas virais atenuadas por meio da variação de temperaturas – *cold-adapted tempetura-sensitive (ca/ts)* - foi largamente utilizada na Rússia (CHURSOV et al., 2012).

Novas gerações de vacinas licenciadas, produzidas a partir da cultura do vírus da gripe em células, têm apresentado boa tolerância e satisfatória imunogenicidade quando comparadas a vacinas cultivadas em ovos embrionados (FREY et al., 2010).

As vacinas derivadas de cultura em células apresentam algumas vantagens, tais como a opção de se estocar congeladas as células utilizadas para o cultivo, possibilitando um suprimento estratégico em casos de pandemias, o que seria mais rápido que a obtenção de ovos para a produção tradicional (FREY et al., 2010).

A adaptação das cepas virais em células é mais rápida do que a adaptação em ovos: leva em torno de um a três meses para a finalização contra cinco a seis meses para adaptação em ovos (SINGH; PANDEY; MITTAL, 2010).

Outras vantagens são o fato de que vacinas derivadas de cultura em células não possuem contraindicação para pacientes alérgicos a ovos, e o menor risco de contaminação química e microbiana (FREY et al., 2010).

Por outro lado, o cultivo em células ainda não possui processos bem estabelecidos de padronização na produção de reagentes e apresenta o risco de inserção de agentes adventícios, tais como resíduos de DNA celular (SINGH; PANDEY; MITTAL, 2010).

Além da utilização da cultura em células na produção da vacina, essa técnica permitiu no passado a adaptação de cepas vacinais de alta patogenicidade em aves como o A/H5N1 a ovos embrionados (utilizados na produção da vacina), pois o vírus é letal aos embriões e provoca baixos rendimentos da vacina (ANDRADE et al., 2009).

Esse tipo de adaptação das cepas vacinais H5N1 foi feito por meio da metodologia de genética reversa. Para tanto, são selecionados plasmídeos codificadores de proteínas estruturais de vírus, adaptados para o crescimento em ovos, como o vírus A/PR8/34 e plasmídeos de codificação do HA e NA do vírus selvagem H5N1. Esses plasmídeos selecionados são transfectados em células

VERO, onde ocorre a formação da nova cepa. Após seleção da cepa vacinal, o vírus é amplificado por meio de passagens em ovos embrionados (WHO, 2003).

Após comprovações de que basicamente duas proteínas da superfície viral – Hemaglutinina e Neuraminidase – induzem a imunidade protetora necessária, criou-se a vacina chamada *subunit-virus vaccine*, composta somente por essas duas proteínas. Essas vacinas possuem uma grande tolerância entre todas as faixas etárias, mas um reduzido poder de imunogenicidade (CROVARI; ALBERTI; ALICINO, 2011).

Atualmente, a vacina majoritariamente utilizada no mundo é do tipo *split-virus vaccine,* administrada anualmente em populações de maior risco no início do inverno em países do hemisfério norte e sul (ZUCKERMAN et al., 2009).

Na produção desse tipo de vacina, o vírus é inoculado em ovos de galinha embrionados de 10-11 dias e o líquido alantoico é colhido, clarificado, purificado e concentrado em gradiente de sacarose por centrifugações zonais. A suspensão viral purificada é fragmentada com detergente e inativada com formaldeído (MIYAKI et al., 2010).

As vacinas contra a gripe produzidas em ovos contêm quantidades variáveis de proteínas residuais do ovo. Por ser uma das proteínas mais importantes nos ovos embrionados, a ovoalbumina pode ser usada como marcador, representando a quantidade de proteínas derivadas dos ovos presentes na vacina. No entanto, quantidades residuais da proteína no produto final podem estar associadas a reações adversas, visto que se trata de um agente sensibilizante do sistema imune. Assim, vacinas contra a gripe produzidas em ovos embrionados acabam não sendo apropriadas para indivíduos com histórico de alergia a componentes do ovo (JAMES et al.,1998; KÜRSTEINER et al., 2006).

A imunização anual com a vacina contra a gripe pode causar imunidade contra a ovoalbumina devido à repetida administração de doses que contêm as proteínas dos ovos, o que pode provocar irritação local, reações sistêmicas e a redução da tolerância ao produto (KÜRSTEINER et al., 2006).

Junto com a evolução das vacinas contra a gripe, os métodos para a avaliação da pureza da vacina também têm sido constantemente atualizados, limitando cada vez mais os níveis de ovalbumina contaminante (CROVARI; ALBERTI; ALICINO, 2011).

1.4 Geração das cepas pandêmicas

A técnica mais tradicional para a geração das cepas para a produção da vacina de gripe sazonal é a técnica *reassortant.*

Essa técnica consiste em infectar ovos de galinha embrionados com cepas diferentes, normalmente a cepa que se tem interesse em gerar imunidade e outra cepa com adaptação para crescimento em ovos. Esse método produz novas cepas, pois quando há infecção conjunta de diferentes tipos virais ocorrem mutações do tipo **shift** que geram partículas virais com os diferentes segmentos de vRNA misturados.

A cepa de interesse deve conter principalmente as informações genéticas para a formação da HA e NA, que são as proteínas reconhecidas primordialmente pelo sistema imune, e as quais se deseja proteger com a vacinação, e os demais segmentos de vRNA que possuam a origem da melhor cepa adaptada em ovos de galinha, por exemplo, a cepa A/Puerto Rico/34.

Portanto, a combinação genética ideal esperada é a 6:2, na qual seis genes seriam provenientes da cepa melhor adaptada para crescimento em ovos e os outros dois principais (expressam a HA e NA) provenientes da cepa circulante de interesse para a produção da vacina. Após esse processo, os vírus formados são caracterizados e isolados de forma a prover a melhor cepa com as características desejadas (WEBBY et al., 2004)

No caso de pandemias nas quais a geração das cepas vacinais necessita ser em um curto prazo de tempo para o adiantamento do início da produção da vacina, a técnica *reassortant* acaba tornando-se inviável devido ao tempo de seleção das cepas, que podem chegar a 254 tipos diferentes ($2^8 – 2 = 254$, sendo 2 tipos virais e oito diferentes segmentos), podendo esse processo chegar a 6 meses. Outro fator é a alta patogenicidade das cepas em ovos, pois apresentam os segmentos de vRNA da HA e NA que normalmente são isolados de aves, o que pode dificultar a sua replicação.

Devido a isso novas técnicas têm sido avaliadas e a mais relevante até o momento é a técnica de genética reversa, que possibilita a obtenção de cepas para a produção da vacina em um menor prazo (aproximadamente 3 meses).

A técnica de genética reversa consiste em isolar o vírus de interesse vacinal e extrair o seu RNA viral. O RNA viral dos genes da Hemaglutinina e Neuraminidase

da cepa pandêmica e os demais genes da cepa atenuada são então clonados por meio de RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) para um cDNA (DNA complementar). Por meio dessa técnica também é possível reduzir a virulência dessas cepas durante a etapa de clonagem na qual são utilizados *primers* específicos para a remoção de aminoácidos polibásicos do gene da hemaglutinina, que são associados a maior virulência destas cepas, quando existentes, possibilitando assim a obtenção de cepas mais atenuadas e melhores adaptadas em ovos de galinha. Os clones de cDNAs são então transfectados em células VERO e após a formação das cepas vacinais clonadas, são amplificadas em ovos embrionados de 10 – 11 dias (HOFFMANN et al., 2002; WEBBY et al., 2004).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão abordados os materiais e os métodos utilizados para produzir a vacina contra o H7N9 e os métodos utilizados para a avaliação.

2.1 Produção dos bancos

A cepa utilizada neste trabalho foi a A/Shangai/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC-RG32A.3 que foi gerada por meio da técnica de genética reversa. O código genético do vírus aviário de interesse vacinal utilizado para a geração dos clones de DNA da Hemaglutinina e Neuraminidase foi o A/Shanghai/2/2013 e o da cepa adaptada a ovos de galinha que forneceu os clones para a PB2, PB1, PA, NP, Proteína M (M) e Proteína Não estrutural (NS) foi a A/Puerto Rico/8/1934 conforme descrição a seguir:

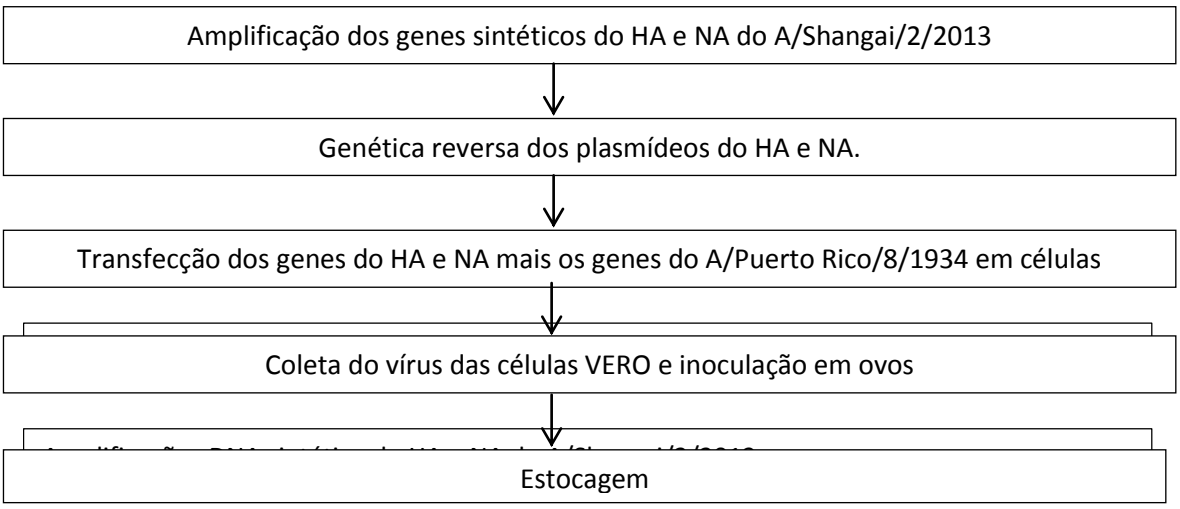


Figura 7 – Resumo das etapas da produção da cepa a A/Shangai/2/2013(H7N9)- PR8-IDCDC-RG32A.3
Fonte: Elaborado pelo autor

Após serem criadas, as cepas são submetidas pelos laboratórios de referência a testes específicos para verificação da patogenicidade e se aprovadas são consideradas *candidate vacines vírus* (CVV). Os testes principais são o sequenciamento do gene da hemaglutinina e da neuraminidase após as passagens em células e em ovos de galinha embrionados para confirmar a identidade com a cepa que gerou os clones. São realizados, também, ensaio em ovos de galinhas para verificar se a cepa causa mortalidade nos embriões, teste de patogenicidade

em *ferrets* e ensaios para determinar a estabilidade do gene da hemaglutinina após diversas passagens em ovos.

A cepa A/Shangai/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC-RG32A.3 foi considerada uma CVV pois apresentou resultados satisfatórios nas análises acima descritas.

A cepa foi disponibilizada para o Instituto Butantan pelo CDC, através da OMS pelo programa ***Pandemic Influenza Preparedness (PIP) framework.*** A importação foi deferida pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), órgão pertencente ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) do Brasil, conforme o parecer técnico n° 3770/2013.

A cepa foi classificada como um Organismo Geneticamente Modificado (OGM) de vírus influenza, sendo portando necessário realizar a manipulação em laboratório com nível de biossegurança adequado. Para este projeto foram seguidas as recomendação emitidas pela OMS e da CTNBio.

Para esses tipos de cepas é recomendada pela WHO a manipulação em pequena escala laboratorial em nível de biossegurança 3 (NB3) e para escalas industriais em nível de biossegurança em grande escala 2 (NBGE2). Essas foram as classificações seguidas nos trabalhos desenvolvidos com essa cepa (WHO, 2013).

A produção dos bancos e do lote piloto foi realizada no laboratório Piloto de Influenza no Instituto Butantan, que é um laboratório de pequena escala e que foi classificado pela CTNBio como NB3, e a produção em escala Industrial ocorreu no Laboratório de Influenza, que possui classificação NBGE2.

2.1.1 Produção do banco estoque (BE001/14)

O processo de produção dos bancos é feito em duas etapas. Primeiro é gerado o banco estoque, que consiste na inoculação manual com seringa e agulha da CVV em diferentes diluições em ovos embrionados de galinha SPF (*specificpathogenfree*) com 10 a 11 dias, conforme recomendação da European Phamacopoeia (2004). Após inoculação os ovos são incubados (33 a 37 °C) por aproximadamente 60 horas, para que ocorra a replicação viral nos embriões e na cavidade alantoide. Após o período de incubação, os embriões são sacrificados por resfriamento em câmara fria (2 a 6 °C) por no mínimo 24 horas. As cascas dos ovos resfriados são abertas com tesoura e o líquido alantoico (LA) que contém o vírus é coletado por aspersão, utilizando-se pipetadores automáticos.

O LA é testado através do título de hemaglutinação, este ensaio se baseia na capacidade da hemaglutinina viral de aglutinar hemácias. O teste consiste em misturar 25 µL de hemácias (neste trabalho foram usadas hemácias de cobaia) a 1% com as amostras que passam por uma diluição seriada em placa de petri, ficando com o volume final de 50 µL. Após a mistura deve-se aguardar por uma hora e verificar onde houve precipitação ou não das hemácias. A leitura do resultado é feita pela maior diluição onde houve precipitação das hemácias, ou seja, não houve vírus suficiente para causar a hemaglutinação que impede que as hemácias precipitem.

Para selecionar a cepa com maior crescimento em ovos, além do título de hemaglutinação, são avaliados também o volume de LA coletado por ovo em cada diluição e a quantidade de ovos com embriões mortos. A diluição selecionada será a que apresentar maior título de hemaglutinação, menos embriões mortos e maior volume de LA coletado.

Após a seleção, o LA é então distribuído em criotubos e congelado em temperaturas menores que -70 °C (conforme Figura 8).

A produção do banco estoque BE001/14 gerado neste trabalho iniciou-se pelo processo de ovoscopia, que consiste na estimulação do embrião por feixe de luz para a verificação da vitalidade e presença de veias com sangue. São feitas então a pesagem dos ovos e a medição dos embriões de alguns ovos controles para a determinação da idade gestacional de 10 a 11 dias dos embriões no lote de ovos. Após a seleção dos ovos foram inoculados 0,2 mL da cepa viral, A/Shangai/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC-RG32A.3, diluída em tampão de inóculo nas diluições 10^{-2} a 10^{-5} com 20 ovos para cada diluição. Juntamente com os ovos inoculados foram incubados 10 ovos sem inocular, para controle de crescimento dos ovos, e 10 ovos inoculados somente com o tampão de inóculo, para o controle da inoculação. Após a incubação os ovos são novamente ovoscopiados para a detecção de embriões mortos e em seguida são resfriados em câmara fria. Após o resfriamento foram selecionados os ovos inoculados que apresentaram melhor título, menor quantidade de embriões mortos e maior volume de LA. O LA selecionado foi coletado, aliquotado e estocado em temperaturas menores que – 70 °C (Figura 8).

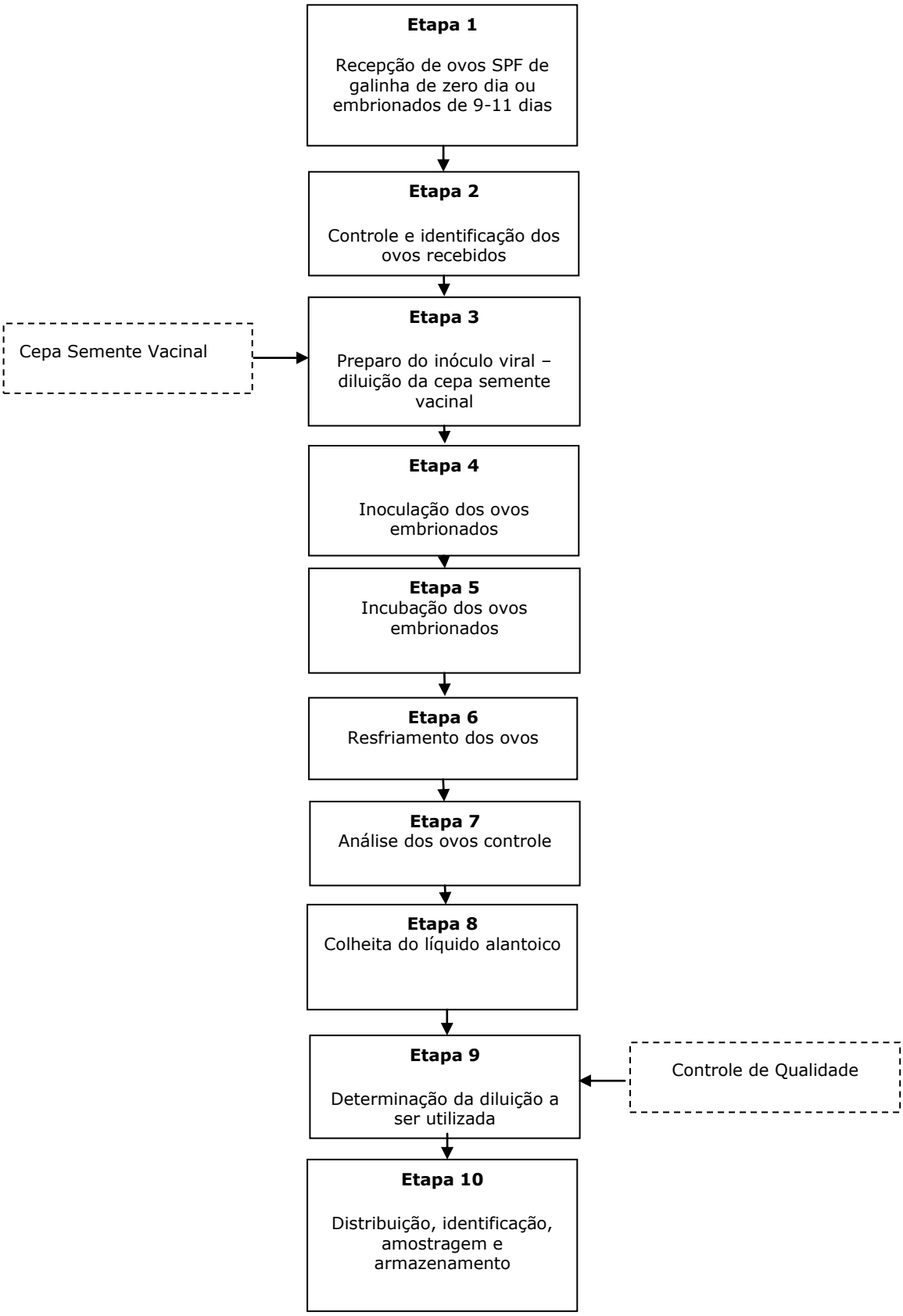


Figura 8 - Fluxograma das etapas de produção do banco estoque
Fonte: Elaborado pelo autor

2.1.2 Produção do banco trabalho (BT001/14)

A segunda etapa consiste na obtenção do banco trabalho (BT001/14) e definição da melhor diluição que será utilizada na produção dos lotes de vacina.

Inicialmente foram inoculados 10 ovos com as diluições de 10^{-2} a 10^{-5} partindo do LA selecionado do banco estoque, BE001/14. Essa inoculação é um teste para a verificação da melhor diluição a ser utilizada na produção do BT001/14.

O BE001/14 foi então inoculado no volume de 0,2 mL por ovo na diluição definida previamente conforme o teste descrito no item anterior. Foram utilizados 464 ovos pré-ovoscopiados para a verificação da vitalidade e idade gestacional de 10 a 11 dias. Para a produção do banco trabalho é necessária uma quantidade maior de ovos para obter um maior volume de LA para a produção de uma quantidade maior de criotubos.

Os ovos foram incubados a (33 a 37 °C) por aproximadamente 60 horas, bem como 10 ovos para controle de crescimento e 10 ovos para o controle do tampão de inóculo. Após esse período são resfriados (2 a 6 °C) por 24 horas.

Após o resfriamento, os ovos passam pelo processo de ovoscopia novamente e o LA é coletado e selecionado da mesma forma que no banco estoque.

Nessa fase há uma clarificação do líquido por meio de centrifugação (15 minutos, 12.250 g) e uma concentração do LA de aproximadamente 7 a 10 vezes do volume inicial por meio de ultracentrifugação em gradiente de sacarose (3 horas, 33.800 g).

Esse concentrado é diluído com *Buffer Solution Phosfate* (PBS), filtrado em membrana 0,22 µm para a esterilização e, em seguida, o produto é envasado em criotubos e congelado a temperaturas menores que -70 °C (Figura 9).

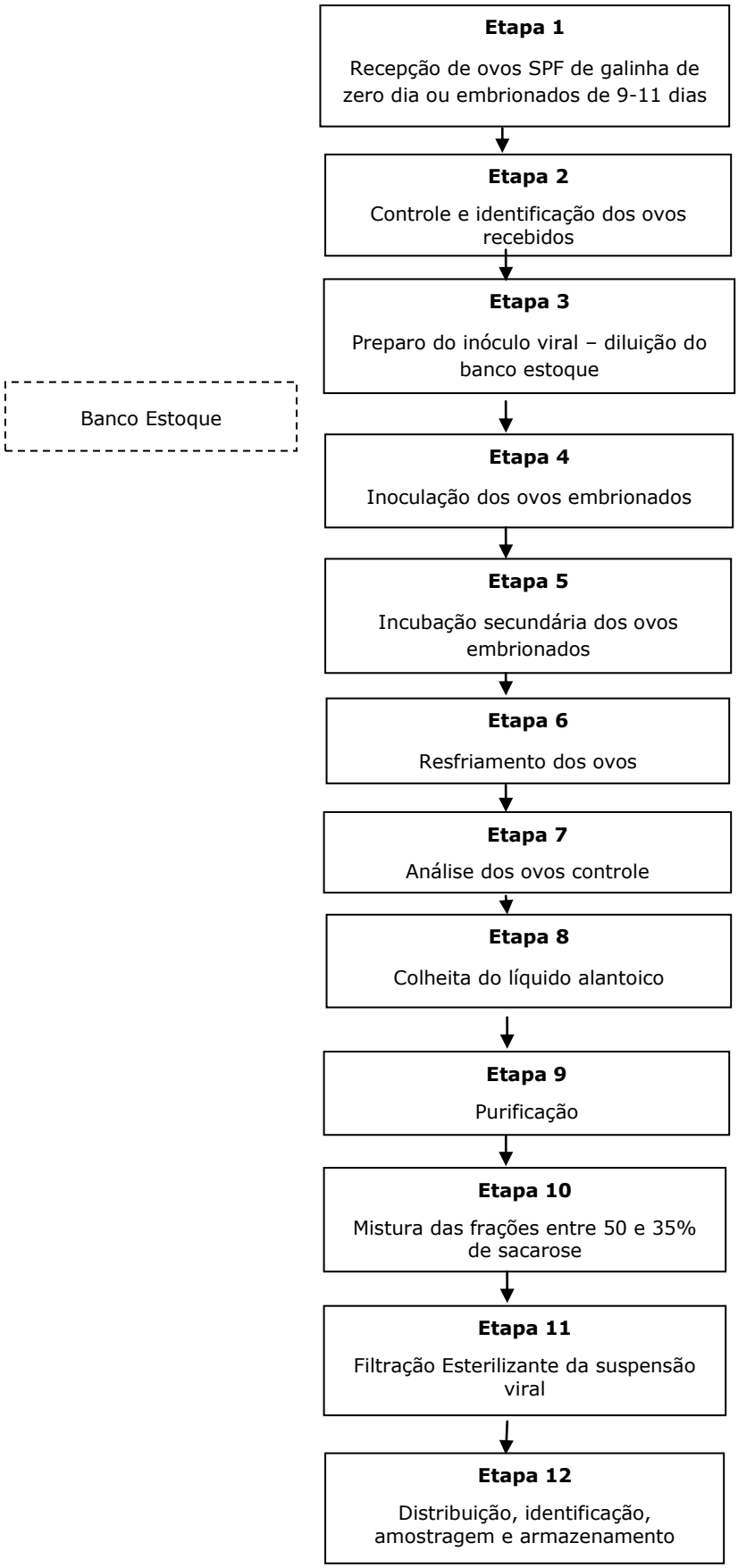


Figura 9 - Fluxograma das etapas de produção do banco trabalho
Fonte: Elaborado pelo autor

2.2 Lote piloto

Foi produzido um lote piloto com o objetivo de avaliar o BT001/14 produzido, gerar dados, ganhar experiência, possibilitar uma estimativa para a produção em escala industrial e para a obtenção da vacina para testes iniciais e pré-clínicos.

Esse lote foi produzido buscando reproduzir em escala menor as mesmas etapas e técnicas utilizadas na produção em escala industrial. Podemos dividir essas etapas em duas principais, sendo a primeira a fase que compreende a inoculação viral nos ovos, a incubação dos ovos, o resfriamento dos ovos e a coleta do LA, e a segunda etapa consiste na clarificação e purificação viral, fragmentação das partículas virais, inativação e filtração final esterilizante.

Na primeira fase de inoculação, os ovos, após verificação da vitalidade, foram inoculados manualmente com inóculo viral preparado com o BT001/14 diluído na diluição pré-eleita na produção do banco, os ovos foram incubados a 33 a 35 °C por 60 horas, bem como os ovos controle de crescimento e controle do tampão de inóculo. Após o período de incubação, os ovos foram resfriados em câmara fria em 4 °C por 24 horas.

O LA foi coletado por aspersão do líquido por uma pipeta sorológica de 10 mL acoplada a uma bomba de vácuo com um reservatório intermediário para a coleta. Esse LA foi filtrado em gaze e diluído em tampão de citrato de sódio a uma proporção de uma parte de tampão citrato para cada três partes de LA. Esse líquido na sequência foi clarificado por centrifugação em frascos (15 minutos, 12.250 g). Após a clarificação, o líquido foi separado dos sedimentos e foi concentrado através de filtração tangencial. O produto foi purificado por centrifugação em gradiente de sacarose. O vírus purificado foi fragmentado por adição de detergente aniônico e agitação constante por uma hora. Após a fragmentação, o produto foi inativado por adição de formaldeído. Durante a filtração o produto é diluído com PBS para possibilitar o arraste do volume adsorvido no filtro e para a padronização dos monovalentes.

FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO PILOTO

ETAPA 1:
Recepção dos ovos embrionados

ETAPA 2:
Controle dos ovos embrionados na recepção e transferência

ETAPA 3:
Preparo do inóculo viral

ETAPA 4:
Inoculação dos ovos embrionados

ETAPA 5:
Incubação e resfriamento dos ovos embrionados e inoculados

ETAPA 6:
Colheita do líquido alantoico

ETAPA 7:
Clarificação do líquido alantoico

ETAPA 8:
Concentração do líquido alantoico clarificado

ETAPA 9:
Distribuição do líquido alantoico concentrado

ETAPA 10:
Ultracentrifugação zonal 1 em gradiente de sacarose

continua

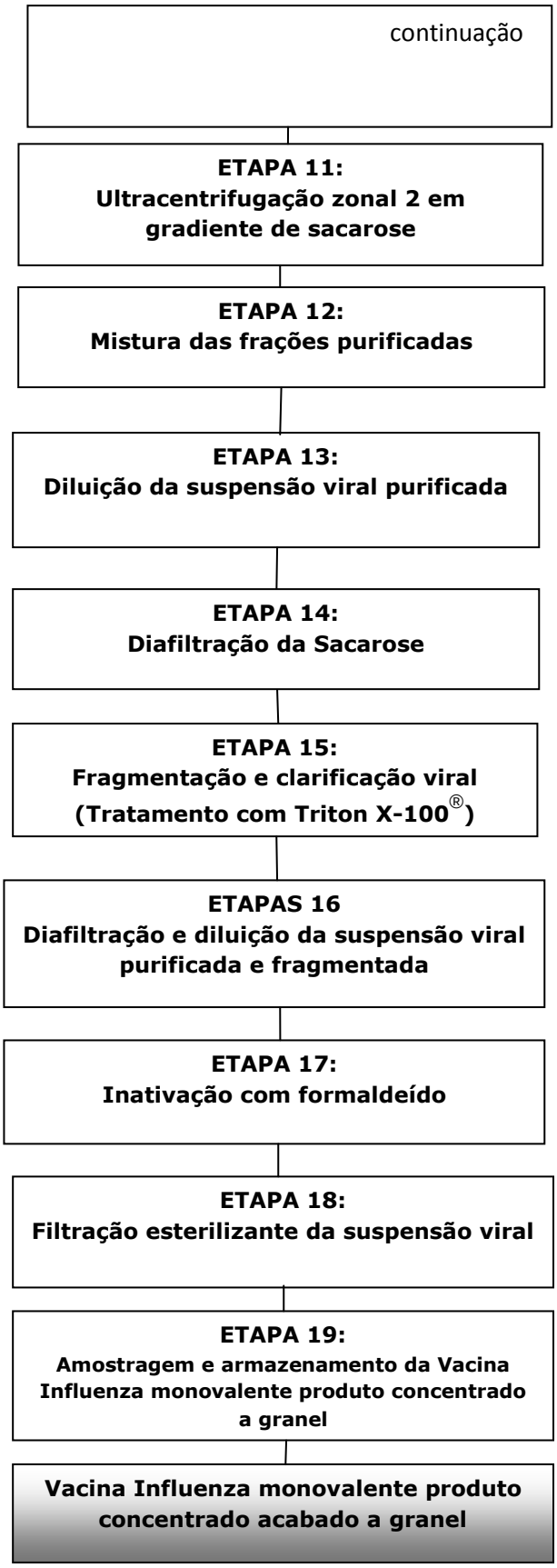


Figura 10 - Fluxograma das etapas de produção do lote piloto
Fonte: Elaborado pelo autor

Os testes realizados para o controle de qualidade do monovalente produzido neste lote piloto são os mesmos realizados no lote de produção em escala industrial e serão descritos ao final do capítulo **Materiais e métodos**.

2.2.1 Imunização em camundongos

A vacina também foi testada quanto à imunogenicidade em camundongos para a comparação entre os títulos de anticorpos com diferentes doses de hemaglutinina. Para esse experimento foram adotadas as formulações com 3,75 µg, 7,5 µg, 15 µg e 45 ug e um grupo inoculado com PBS como grupo negativo, cada grupo constituído por cinco animais.

Os animais foram imunizados por via subcutânea no dia zero com uma dose de 300 µL, que foi aplicada em duas parcelas de 150 µL por flanco de cada animal.

Aos 21 dias, os animais foram sangrados através do plexo venoso retro orbital e imunizados novamente com mais uma dose de 300 µL, que foi aplicada em duas parcelas de 150 µL por flanco de cada animal.

Aos 42 dias os animais foram sangrados novamente através do plexo venoso retro orbital e então sacrificados por asfixia com CO_2.

O protocolo de aprovação do experimento pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) foi o protocolo n° 1301/14.

As amostras de sangue coletadas foram tratadas individualmente para a extração do soro. O sangue foi incubado em estufa por 37 °C por 30 minutos, em seguida foi mantido em geladeira a 4 °C *overnight*. No dia seguinte, o sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 8 minutos a 4 °C para a separação do coágulo do soro. Em seguida, o soro foi coletado para novos tubos e congelado a -20 °C até o momento de uso.

O teste utilizado para o estabelecimento dos títulos dos anticorpos foi o teste de inibição da hemaglutinina (HAI) conforme será descrito ao final deste capitulo.

2.3 Produções do monovalente H7N9 em escala industrial e condições BPF

Foram produzidos três lotes em escala industrial e condições de Boas Práticas de Produção com 144.480 ovos/lote. Esses lotes foram realizados para a

qualificação dos processos de produção e para gerar vacina contra o H7N9 para ensaios e registros.

Os lotes foram produzidos no Laboratório de Influenza, que possui classificação de nível de biossegurança em grande escala 2 (NBGE2) concedido pela CTNBio e é certificado em Boas Práticas de Fabricação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Os lotes foram produzidos seguindo o processo de produção que foi transferido pela Sanofi Pasteur mediante acordo com o Instituto Butantan de Transferência de Tecnologia. Nesse mesmo Laboratório é produzida a Vacina de Influenza Sazonal Trivalente Fragmentada e Inativada composta pelos vírus tipo H1N1, H3N2 e B. Os controles de qualidade também seguiram o esquema de amostragem que consta no registro de produção da vacina sazonal.

O processo de produção é composto por 19 etapas, similar ao processo empregado na produção do lote piloto (Figura 10), que levam em torno de 10 dias, desde a recepção dos ovos até a obtenção do concentrado da vacina chamado de Monovalente de vírus Influenza concentrado a granel.

Nas etapas iniciais do processo ocorre a recepção dos ovos embrionados de galinha com 10 a 11 dias, controles de qualidade por amostragem e, após liberação do lote, inicia-se o processo de inoculação automática do inóculo viral nos ovos. O vírus utilizado no preparo do inóculo foi o BT001/14.

Após a etapa de inoculação os ovos foram incubados em incubadoras com controle de temperatura (33 °C a 35 °C) e umidade, (70 a 90%) para possibilitar o crescimento do embrião e a replicação viral. Após o período de incubação, os ovos são resfriados a 4 °C para que ocorra a morte do embrião. Após essa etapa, os ovos são abertos por lâmina cortante em equipamento e processo automatizado e invertidos por meio de um sistema de bandejas para que ocorra o escoamento do LA, que é coletado através de funis com tela filtrante e direcionado para um tanque. Após a coleta do líquido, o restante dos ovos é direcionado para a trituração e descontaminação por meio de tratamento térmico.

O LA coletado passa pelo processo de clarificação por centrifugação industrial contínua para a remoção de resíduos de casca, pedaços de membrana ou embrião. Em seguida, o líquido é concentrado através do processo de ultrafiltração tangencial.

O concentrado é então submetido à etapa de purificação que tem o objetivo de concentrar o produto e realizar a separação das partículas virais dos demais

componentes. A purificação é realizada através de ciclos de ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

Após a obtenção do vírus purificado, este é submetido ao processo de fragmentação viral com detergente aniônico. O produto fragmentado é então clarificado através de centrifugação continua para a eliminação do capsídeo viral que contém as nucleoproteínas. Após essa etapa o produto é submetido a um processo de diafiltração através de ultrafiltração para eliminação do excesso de detergente.

O produto é então filtrado através de membrana clarificante (0,45 µm) para a redução de biocarga e inativado a seguir com formaldeído sob agitação constante.

Após o processo de inativação o produto é filtrado através de membrana esterilizante (0,22 µm), são realizadas amostragens para análises de controle e o produto é estocado (KON et al., 2016).

2.4 Análises realizadas

Neste capítulo serão descritas as análises realizadas neste projeto e essa descrição será dividida em duas partes, as análises farmacopeicas, que são as análises obrigatórias para liberação dos monovalentes, e as análises exploratórias, que foram incluídas neste trabalho para melhor avaliação dos processos intermediários e eficácia do monovalente.

2.4.1 Análises farmacopeicas

Conforme o Quadro 1, são descritas as análises mandatórias na Farmacopeia Europeia para a liberação do monovalente.

Quadro 1 - Análises farmacopeicas mandatórias

Testes Físico-químicos	**Testes de Controle Biológico**	**Testes de Controle Microbiológico**
pH	Determinação do teor de hemaglutinina	Endotoxina
Octoxynol-9 (Triton X-100)	Dosagem de ovalbumina	Esterilidade
Formaldeído	Controle de inativação viral	
Dosagem de Proteína	Identidade de hemaglutinina	
Aspecto		

Fonte: Elaborado pelo autor

2.4.1.1 Testes físico- químicos

As análises físico-químicas compreendem a avaliação de reações químicas com base nos fenômenos físicos detectáveis e mensuráveis por dispositivos.

2.4.1.1.1 Dosagem de proteína

Para dosagem de proteína foi utilizado o método de Lowry. Nesse método as amostras, bem como a curva padrão de soroalbumina bovina são misturadas ao reagente de Folin, que reage com as proteínas e colore as soluções com diferentes intensidades proporcionalmente à concentração de proteínas. Após a reação, é possível medir a absorbância da amostra por meio da espectrofotometria. Os valores obtidos são então comparados à curva padrão e a dosagem é estabelecida (LOWRY et al., 1951).

2.4.1.1.2 Dosagem de formaldeído

O formol residual foi dosado através de titulação e análise espectrofotométrica (412 nm) da solução após reação com solução de ácido tricloroacético 2,5% e o reagente de Hantzsch. Os valores obtidos na análise das amostras foram interpolados por meio de gráfico com a curva padrão obtida pelos mesmos procedimentos (NASH, 1953).

2.4.1.1.3 Dosagem do detergente aniônico

A dosagem de Triton X-100 foi feita através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (HEINIG; VOGT, 1997).

2.4.1.2 Testes de controle biológico

Nestes tópicos foram listadas as análises que verificam os fenômenos biológicos com os testes realizados *in vitro* e *in vivo*.

2.4.1.2.1 Determinação do teor de hemaglutinina

A determinação do teor de hemaglutinina é baseada na reação in vitro de antígeno-anticorpo por imunodifusão radial simples.

Gel de ágar a 1% (p/V) contendo soro anti-hemaglutinina específico para a cepa em teste é distribuído em uma placa de vidro ou em um filme plástico com superfície hidrofílica sobre uma superfície perfeitamente nivelada.

Após o mínimo de 2 horas à temperatura de 2 °C a 8 °C em câmara úmida, são feitos 49 orifícios equidistantes (4 mm de diâmetro) no gel.

A amostra em teste e a hemaglutinina de referência são diluídas em triplicata e são tratadas com detergente zwiteriônico para ruptura das partículas virais necessária para permitir a difusão apropriada do antígeno. Preenchem-se os orifícios do gel com 20 µL das soluções de antígeno e da vacina em teste. A distribuição nos orifícios deve ser aleatória.

Incubam-se as placas em câmara úmida por 16 h a 20 h, à temperatura de 20 - 25ºC sobre uma superfície perfeitamente nivelada. Após lavagem em solução fisiológica e secagem, procede-se a coloração com azul de Coomassie a 0,15%.

Os diâmetros perpendiculares dos halos de precipitação para cada um dos orifícios são medidos com o auxílio de lupa graduada. Calcula-se o teor de hemaglutinina pela comparação entre as curvas (diâmetro médio para cada diluição em função das diluições) das amostras em teste e do antígeno de referência, utilizando método de regressão múltipla ou por comparação de coeficientes angulares –*sloperatio* (WOOD et al., 1977; WHO, 2005).

2.4.1.2.2 Dosagem de ovalbumina

A determinação do teor de ovalbumina foi baseada na reação antígeno-anticorpo usando o ensaio de *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA) de captura.

Imunoglobulina G (IgG) de cabra anti-ovalbumina é fixado na fase sólida (placa) e após a adição da amostra e do padrão, esta captura a ovalbumina contida na amostra e na curva padrão.

Um segundo anticorpo IgG de coelho anti-ovalbumina é então fixado à ovalbumina retida anteriormente na placa. Um terceiro soro de cabra contendo anti-

IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina é então adicionada e se liga ao segundo anticorpo. A fosfatase alcalina é então revelada pela incubação de um substrato específico (para-nitrofenil-fosfato – pNPP) que libera um produto (para-nitrofeinl) colorido na sua reação de hidrólise. A leitura espectrofotométrica é feita em comprimento a 405nm, e é proporcional à concentração da ovalbumina presente na amostra e na curva padrão. A comparação da curva dose-resposta da amostra e da curva padrão permite calcular a concentração da ovalbumina na amostra (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004).

2.4.1.2.3 Inativação viral

É realizada a inoculação da vacina em ovos para a confirmação da inativação viral por meio do teste de hemaglutinação. O protocolo prevê duas passagens em ovos e o LA da segunda passagem deve ser titulado pelo ensaio de hemaglutinação. Para a vacina ser considerada negativa não pode haver hemaglutinação, indicando assim que não há partícula viral ativa uma vez que não houve replicação viral nos ovos embrionados (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004).

2.4.1.2.4 Identidade de hemaglutinina

Neste teste a proteína de interesse é desafiada perante padrões de anticorpos de cepas similares e pelo anticorpo especifico. Após a reação é realizada a hemaglutinação com eritrócitos em diluições seriadas para a confirmação da reação entre o antígeno e o anticorpo. A amostra que se ligou ao anticorpo inibe a hemaglutinação. Os títulos obtidos com a proteína a ser testada são então comparados com os padrões de antígenos. Para se considerar uma identidade positiva para uma cepa, o produto em teste deve apresentar resposta positiva em até duas diluições de diferença em relação aos antígenos de referência das cepas utilizadas na comparação (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004).

2.4.1.3 Testes de controle microbiológico

Os testes microbiológicos compreendem os estudos que avaliamos micróbios bem como seus constituintes.

2.4.1.3.1 Esterilidade

Neste teste avalia-se a presença de microrganismos através da incubação do produto em placas de Petri com meio de cultura para crescimento microbiano para a verificação da presença ou não de contaminantes microbiológicos (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004).

2.4.1.3.2 Teste de endotoxina bacteriana

A presença de endotoxina bacteriana é feita através do método cinético turbidimétrico após a reação com o reagente que contém olisado de amebócito de *Limuluspolyphemus*, que reage com a endotoxina formando uma coloração amarelada, que pode ser medida bem como o tempo de reação e utilizada para quantificar as concentrações de endotoxinas bacterianas (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004).

2.4.2 Análises exploratórias

Estão incluídas neste tópico as análises que foram inseridas no projeto para avaliar características da vacina produzida.

2.4.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Nesse método, o gel é obtido pela polimerização de acrilamida (CH2=CH-CO-NH2) e N´,N1-metileno-bis-acrilamida, reagente bifuncional que favorece o estabelecimento de ligações cruzadas na presença de catalizadores, geralmente persulfato de amônio e TEMED (tetrametileno-diamina). Com a polimerização, formam-se poros cujo tamanho pode ser ajustado, variando-se a concentração dos reagentes, isto é, o grau das ligações cruzadas.

Os géis mais frequentemente usados contêm de 5% a 20% de acrilamida-bisacrilamida. As proteínas são desnaturadas com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) com ou sem agente redutor, de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970). As proteínas fracionadas por tamanho serão coradas com uma solução de

Coomassie Blue R250, IndiaInk ou Nitrato de Prata (VAZ, 2001). Neste experimento as amostras foram aplicadas nos géis em condição desnaturante e/ou após digestão pela enzima PNFgase (Biolabs, P0704L, de acordo com as instruções do fabricante) que realiza a hirolização nas ligações entre GlcNAc e aspargina de glicopeptídeos.

2.4.2.2 Imunização em camundongos

O monovalente foi testado quanto a imunogenicidade em camundongos com diferentes doses e formulação das vacinas, com ou sem adjuvante para a comparação dos títulos de anticorpos obtidos. Para esse experimento foram adotadas as formulações com 3,75 µg, 7,5 µg, 15 µg com e sem adjuvantes em grupos com cinco animais cada, e mais um grupo controle inoculado somente com o adjuvante IB160. Todos os animais sofreram sangria pré-imunização e os soros obtidos serviram como controle negativo.

Os animais foram imunizados por via subcutânea no dia zero com uma dose de 300 µL que foi aplicada em duas parcelas de 150 µL por flanco de cada animal.

Aos 21 dias, os animais foram sangrados através do plexo venoso retro orbital e imunizados novamente com mais uma dose de 300 µL, que foi aplicada em duas parcelas de 150 µL por flanco de cada animal.

Aos 42 dias, os animais foram sangrados novamente através do plexo venoso retro orbital e então sacrificados por asfixia com CO_2.

O protocolo de aprovação do experimento pela CEUAIB foi o protocolo n° 1301/14.

As amostras de sangue coletadas foram tratadas individualmente para a extração do soro. O sangue foi incubado em estufa a 37 °C por 30 minutos, em seguida foi mantido em geladeira a 4 °C *overnight*. No dia seguinte, o sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 8 minutos a 4 °C para a separação do coágulo do soro. Em seguida, o soro foi coletado para novos tubos e congelado a -20 °C até o momento de uso.

O teste utilizado para o estabelecimento dos títulos dos anticorpos foi o teste de inibição da hemaglutinina (HAI) conforme descrito a seguir.

O nome hemaglutinina é oriundo da característica dessa proteína em aglutinar eritrócitos e o teste de inibição da hemaglutinina é baseado nessa propriedade. A hemaglutinina a ser titulada (antígeno) quando misturada a um anticorpo especifico

tem os receptores que fazem a aglutinação entre os eritrócitos e a hemaglutinina inibidos. O teste que foi originalmente escrito por Hirst (1942) e modificado por Salk (1944) consiste em misturar diluições seriadas dos soros a serem testados em placas de titulação com uma quantidade padronizada da hemaglutinina de interesse (antígeno), e em seguida eritrócitos são adicionados para determinar as diluições onde houve a inibição. Conforme mostrado na Figura 11 é considerada inibição quando não há hemaglutinação e as hemácias precipitam para o fundo da placa, como descrito no exemplo C da Figura 11.

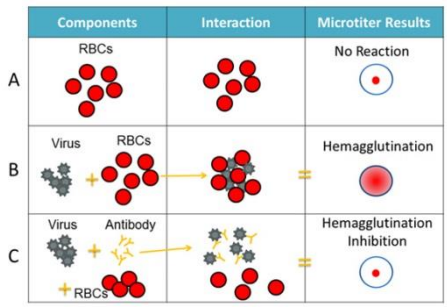


Figura 11 – Esquema de um ensaio de hemaglutinação e inibição da hemaglutinação.
Fonte: Acharya (2014)

Portanto, são considerados os títulos das amostras de soro as diluições onde houve completa inibição da hemaglutinação, uma vez que o antígeno foi inibido pelo anticorpo presente no soro.

Uma das maiores vantagens desse teste é a reprodutibilidade. Uma das desvantagens é que o soro dos animais pode conter inibidores inespecíficos da hemaglutinação que podem ocorrer naturalmente. Para remoção desses inibidores, o soro precisa necessariamente ser tratado com *receptor destroying enzyme* (RDE), que elimina os inibidores não específicos da hemaglutinina. Neste experimento foi utilizada a enzima da DenkaSeiken CO. Ltda. (WHO, 2002). Os gráficos foram elaborados utilizando o software GraphPad Prism para windows.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão discutidos os resultados obtidos nas etapas de produção da vacina.

3.1 Produção dos bancos

Os lotes de vacina serão feitos com o BT001/14. É muito importante nessa etapa garantir que não haja contaminação microbiológica, pois, caso isso ocorra todo o lote de ovos inoculado pode ser contaminado.

Para tornar o processo robusto e garantir a esterilidade bacteriana e a presença somente do vírus da gripe são adotados procedimentos para minimizar o risco de contaminação. A seguir, serão expostos os principais cuidados adotados na produção dos bancos deste trabalho.

É mandatório pelas principais farmacopeias que a produção dos bancos seja feita com ovos S*pecific Pathogen Free (*SPF). Esses ovos são definidos pelo Ministério da Agriculta e Pecuária e Abastecimento (MAPA) como sendo ovos gerados por galinhas livres de patógenos e anticorpos especificados para os seguintes microrganismos: Adenovírus aviário; vírus da síndrome da queda de postura (EDS-76); vírus da encefalomielite aviária; vírus *Haemophilus paragallinarum*; Reovírus aviário; vírus da bronquite infecciosa das galinhas; vírus da doença Infecciosa da Bolsa (doença de Gumboro); vírus da laringotraqueíte infecciosa; vírus da doença de Newcastle; vírus da influenza aviária; vírus da doença de Marek; vírus da leucose aviária; vírus da rinotraqueíte dos perus; vírus da reticuloendoteliose; vírus da bouba aviária; *Mycoplasma gallisepticum*; *Mycoplasma synoviae e Salmonella sp*. As aves também devem estar livres da presença do vírus da anemia infecciosa das galinhas. As galinhas também precisam ser mantidas em ambientes com pressão positiva, ar filtrado e biossegurança (BRASIL, 2006).

A granja que forneceu os ovos para produção dos bancos é certificada pelo MAPA e apresentou laudo demonstrando a ausência dos microrganismos citados nos ovos fornecidos para o IB. Os ovos controle e o controle da inoculação que testam a vitalidade dos embriões e esterilidade do tampão de inóculo utilizado na produção dos bancos foram analisados por ovoscopia após a incubação dos ovos e não foram detectados embriões mortos.

Após a finalização dos bancos a realização da análise de esterilidade, é mandatória também pelas principais farmacopeias. Os bancos BE001/14 e o BT001/14 foram aprovados como estéreis.

É interessante ressaltar que apenas uma pequena parcela dos criotubos (2,5%) escolhidos aleatoriamente durante o envase final é utilizada no teste de esterilidade. Devido a isto, para trazer mais segurança e robustez ao processo, principalmente na fase final de produção do banco trabalho, as etapas de filtração em membrana esterilizante (0,22 µm) e o envase em criotubos, foram feitas em cabine de fluxo de ar continuo com classificação A e realizados controles ambientais de partículas viáveis (microrganismos) e não viáveis (partículas inertes) que diminuem o risco do banco trabalho ser contaminado pelo ambiente de trabalho. Para a produção desses bancos todos os monitoramentos foram satisfatórios e seguiram os critérios dos guias de boas práticas de produção de produtos para uso em humanos da Europa (EUROPEAN COMMISSION, 2008).

3.2 Lote piloto

Após a obtenção do banco trabalho, foi produzido um lote piloto com a cepa CEPA H7N9 (A/Shanghai/2/2013). Os objetivos principais foram avaliar o BT001/14, gerar dados para uma estimativa para a produção em escala industrial no Laboratório de Influenza e para a obtenção da vacina para testes iniciais.

O lote foi produzido buscando-se reproduzir em escala menor, fundamentalmente, as mesmas etapas e técnicas utilizadas na produção industrial. Foram identificadas algumas diferenças entre as etapas dessa produção piloto em relação à produção industrial, descritas no Quadro 2.

As diferenças se devem principalmente devido à quantidade de ovos utilizada na produção piloto que é bastante inferior em relação à utilizada na produção industrial (1,2%), e pela variação entre alguns equipamentos.

Os 2.945 ovos utilizados na produção Piloto, foram inoculados com o BT001/14 manualmente com seringas de 5 mL. Nessa etapa de inoculação ocorreu a primeira diferença em relação à produção industrial que utiliza inoculação automatizada. Após a inoculação os ovos foram incubados da mesma forma.

Ao término do período de incubação foi realizada a ovoscopia de todos os ovos para verificação da vitalidade e os ovos controles foram analisados para o

acompanhamento do crescimento embrionário. Dos 2.945 ovos inoculados e incubados, morreram 266 (9,0%). Os ovos controles do crescimento apresentaram medidas satisfatórias e condizentes para 14 dias. Os ovos foram resfriados a 5 °C ± 3 °C por aproximadamente 32 horas para a indução da morte dos embriões.

Os ovos foram então colhidos por meio do corte manual da casca com tesoura e o líquido alantoico foi aspirado por sucção por uma bomba de vácuo acoplada em uma pipeta sorológica de 10 mL. Foram colhidos 2.677 ovos gerando um volume de 22.500 mL de líquido alantoico com volume médio de 8,4 mL/ovo. Nessa etapa de coleta do líquido identificamos mais uma diferença em relação à produção industrial pois na produção industrial o corte é feito automaticamente por uma guilhotina e a coleta ocorre por inversão dos ovos com auxilio de bandejas e escoamento do líquido.

Após as etapas de clarificação, concentração e purificação em gradiente de sacarose, foram obtidos 150 mL de vírus purificado.

O vírus purificado foi então tratado com Triton X-100® e mantido sob agitação para a reação da fragmentação viral.

O vírus fragmentado foi então inativado com formol e foi filtrado em sistema de filtração de 0,22 µm para a esterilização do produto, finalizando a produção com um volume de 982 mL.

Quadro 2- Principais diferenças de produção entre o lote piloto e o lote industrial

Etapa	**Produção piloto**	**Produção em escala industrial**
Inoculação dos ovos	Manual com seringa.	Automática
Colheita do líquido alantoico	Corte da casca manual e colheita do líquido alantoico por sucção.	Corte automático e coleta por inversão das bandejas.
Purificação viral	Centrifugação não contínua em gradiente de sacarose.	Centrifugação em fluxo contínuo em gradiente de sacarose.

Fonte: Elaborado pelo autor

Alguns dados obtidos entre as etapas da produção piloto podem dar uma estimativa de como será a produção industrial com a cepa pandêmica, por exemplo o número de ovos mortos após a incubação, que apesar da diferença entre as inoculações que no lote piloto foi manual e na fábrica é automatizada, pode representar uma estimativa mínima de ovos que serão descartados antes da colheita. Para essa produção piloto o descarte foi de 266 representando 9,0% em

relação ao total de ovos inoculados. Essa é uma taxa de mortalidade esperada, causada principalmente por acidentes durante a inoculação quando a agulha pode ferir o embrião ou veias ou devido às excessivas manipulações dos ovos, mortes devido à inoculação viral e o período de incubação. Essa taxa de morte também valida a qualidade do banco trabalho quanto à esterilidade, visto que se houver contaminação microbiológica, a taxa de morte comprometeria o lote todo. Portanto uma quantidade mínima de descarte possível de prever na produção industrial que será com 144.480 ovos é de 13.003 ovos.

O volume de monovalente final em relação aos ovos colhidos é um bom dado também para estimar o rendimento de volume final possível. Nessa produção piloto foi de 0,37 mL/ovo colhido. Os lotes industriais a serem produzidos terão 144.480 ovos por lote. Visto o descrito no parágrafo anterior, é de se esperar um descarte de 13.003 ovos possibilitando a colheita de 131.477 ovos. Com o dado de 0,37 mL/ovo há de se resultar aproximadamente 48.646 mL nos lotes industriais.

Também servirão como uma importante base de dados para estimativa da produção industrial os resultados referentes às análises mandatórias na farmacopeia europeia do produto final concentrado. Seguem os resultados obtidos:

Tabela 2 - Registros dos resultados dos testes realizados com o produto final

TESTE	RESULTADO	Especificação
Inativação viral	Passa o teste	Vírus inativo
Esterilidade bacteriana e fungico	Passa o teste	Ausência de crescimento microbiano
Endotoxina	<0,50 UE/mL	≤ 100UE/mL
pH	7,4	6,8 – 7,6
Nitrogênio total	62 ug/mL	Informativo
Triton X-100 ® residual	288 ug/mL	≤ 560 µg/mL
Formaldeído residual	51,50 ug/mL	≤ 60 µg/mL
Proteína total	389,28 ug/mL	Informativo
Osmolaridade	270 mOsm/kg	Informativo
Aspecto	Passa o teste	Líq. levemente opalescente
Identidade de Hemaglutinina	Passa o teste	Reatividade para anticorpo padrão.
Dosagem de Ovalbumina	2869,80 ng/mL	Informativo
Determinação de Teor de Hemaglutinina	176,17 ug/mL	Informativo

Fonte: Elaborado pelo autor

Desses testes é interessante destacar o resultado de **passa o teste** para o teste de inativação viral. Esse resultado valida os processos críticos de fragmentação e inativação viral.

O resultado de **passa o teste** para Identidade da Hemaglutinina valida a identidade entre o BT001/14, que mesmo após as três passagens em ovos (uma para a produção do BE001/14, outra para o BT001/14 e a passagem de inoculação dos ovos da produção), manteve a reatividade com o anti-corpo padrão gerado com a cepa mãe, A/Shangai/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC-RG32A.3.

O resultado satisfatório para a inativação viral possibilita concluir que o processo e os parâmetros de fragmentação e inativação viral, tais como quantidades de Triton X-100® e Formol utilizados, tempo de reação, foram satisfatórios para o vírus A(H7N9) e podem ser aplicados na fabricação do lote industrial.

A quantidade de endotoxina e a esterilidade do produto confirmam que durante a produção as cargas de contaminação biológica (*biouburden)* mantiveram-se sob controle e a esterilização final por filtração em membrana de 0,22 µm foi satisfatória.

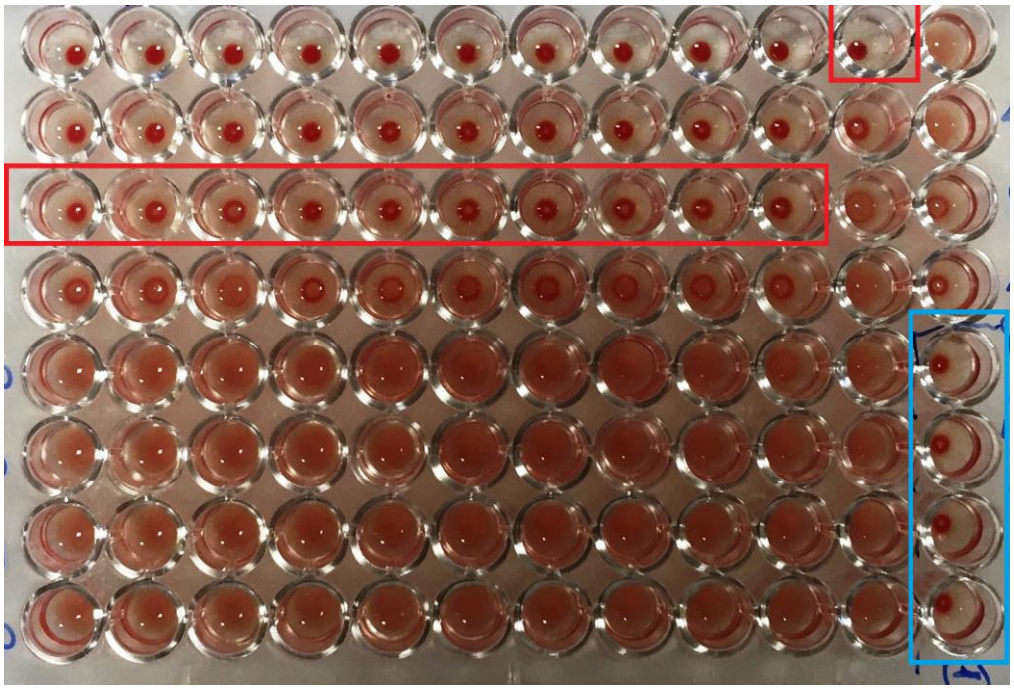
O resultado de Triton X-100® residual demonstra que a quantidade utilizada para a fragmentação e a diafiltração em 50 kDa de aproximadamente 10 vezes baseado no volume inicial da amostra foi efetiva na remoção do excesso de detergente, mantendo o produto dentro do limite.

O teor de hemaglutinina de 176,17 µg/mL é um dado importante que nos dá uma estimativa de rendimento da cepa na produção. Como discutido acima, de acordo com os dados obtidos nas etapas de produção piloto, é esperada a obtenção de 48.646 mL para a produção industrial com 144.480 ovos. Se considerarmos novamente os ovos colhidos no processo industrial em 131.477 ovos, estimamos um quantitativo de produção de 8,56 x 10^6 g de hemaglutinina para esse número de ovos utilizados, com um rendimento de 65,18 µg/ovo colhido.

O produto obtido no lote piloto também foi testado quanto à imunogenicidade em camundongos para a avaliação da atividade da vacina produzida e para a comparação entre os títulos de anticorpos com diferentes doses de formulação sem adjuvante. Para esse experimento foram adotadas as formulações com 3,75 µg, 7,5 µg, 15 µg e 45 µg em grupos com cinco animais cada e mais um grupo denominado “PBS”, no qual os animais foram inoculados somente com salina apirogênica para servirem como controle negativo. Os animais foram inoculados com duas doses sendo a primeira no dia zero e a segunda após 21 dias e sendo as sangrias realizadas no dia 21 (antes da segunda inoculação) e aos 42 dias.

Foi extraído o soro do sangue coletado dos animais e os anticorpos foram titulados através do teste de inibição da hemaglutinação utilizando o vírus A/Shangai/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC-RG32A.3 formulado com 4 unidades de hemaglutinina (4HA) e hemácias de cobaia a 1%.

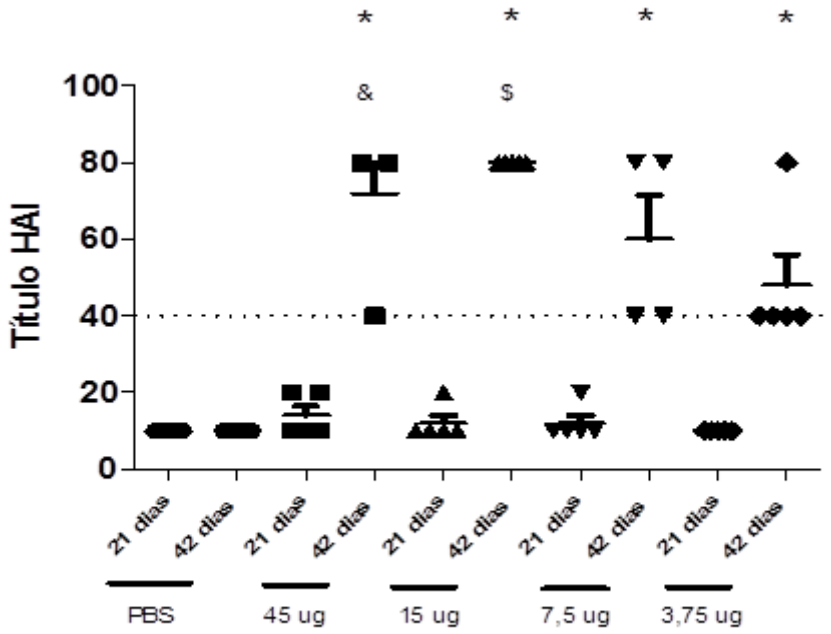
Para a definição da diluição que representa o resultado da inibição foi adotado o poço onde ocorre a formação do **botão** pela precipitação das hemácias mais próxima ao poço negativo, que é a mistura de PBS e hemácias (Figura 3). Os resultados obtidos estão representados na Figura 12.



* Os poços marcados em vermelho são os **poços** eleitos em comparação ao negativo representado pela seleção na cor azul

Figura 12 - Representação da seleção do poço resultado do teste de inibição da hemaglutinina
Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados dos títulos individuais de inibição da hemaglutinação dos cinco grupos aos 21 e 42 dias estão representados na Figura 13.



* todos os grupos marcados apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo PBS (p<0,001).

$ O grupo 15 µg apresentou diferença estatística aos 42 dias em relação ao grupo 7,5 µg (p<0,05) e em relação ao grupo 3,75 µg (p<0,01).

& O grupo 45 µg apresentou diferença estatística aos 42 dias em relação ao grupo 7,5 µg (p<0,05) e em relação ao grupo 3,75 µg (p<0,01).

Não houve diferença significativa entre os grupos aos 21 dias.

Figura 13 – Gráfico representando os títulos obtidos para os grupos PBS, 45 µg, 15 µg, 7,5 µg e 3,75 µg aos 21 dias após uma dose e aos 42 após a segunda dose

Fonte: Elaborado pelo autor

Diante da análise dos gráficos e dos dados estatísticos, considerando como imunização satisfatória os casos em que os títulos por animal foram superiores a 40, verificamos que nenhuma formulação testada imunizou os animais com somente uma dose e que os animais dos quatro grupos apresentaram resposta imune satisfatória somente após duas doses (BEYER et al., 2004).

Os grupos de 45 µg e 15 µg apresentaram uma resposta imune maior quando comparados aos grupos de 7,5 µg e 3,75 µg, após a segunda imunização.

Para realização das análises de rendimentos de produção em doses, iremos adotar como dose ideal 7,5 µg. Essa decisão foi baseada na possibilidade de se utilizar o mínimo possível de antígeno para ser possível a disponibilização do maior número de doses possíveis. O grupo 3,75 µg não foi considerado para esses cálculos, pois o valor da sua média ficou muito próximo ao limite de 40.

Iremos adotar neste trabalho um ano de validade baseados na validade da vacina sazonal produzida atualmente. Devido a isso é necessário para garantir que durante esse tempo de validade a vacina possua no mínimo 7,5 µg por dose, formular a vacina com uma quantidade maior de hemaglutinina. Neste exercício iremos supor, baseados também nas formulações realizadas na vacina sazonal, uma formulação com 9 µg ou seja 20% a mais de hemaglutinina. Dessa forma é possível alcançar um rendimento de 7,24 doses por ovo colhido, logo, 1.046.035 doses por lote de 144.480 ovos.

A dosagem de ovoalbumina em 2869,80 ng/mL é um dado informativo nessa etapa da produção, mas possui especificação farmacopeica para a vacina final após a formulação e o envase, de no máximo de 500 ng por dose de 0,5 mL. Nesse lote produzido em escala piloto as doses seriam aprovadas, pois considerando novamente um volume de produto de 48.646 mL teríamos um total de $1{,}40 \times 10^{8}$ ng de ovoalbumina. Para o exemplo anterior de 10 µg de hemaglutinina por dose totalizando 1.046.035 doses teríamos aproximadamente 134 ng de ovalbumina por dose, satisfatório para o limite citado. Porém se compararmos com os resultados obtidos na produção industrial da vacina sazonal, esse valor encontra-se em torno de 40 vezes acima do valor do pior caso produzido durante o ano de 2016 que teve resultado médio de 70,22 ng/mL. Nunca foi observada uma quantidade tão grande de ovoalbumina considerando os dados da produção industrial da vacina sazonal desde 2012. Essa comparação nos levou a avaliar as duas diferenças entre a produção piloto e a produção industrial, que são: a forma de coletar o líquido alantoico e a diferença na purificação em gradiente de sacarose (Quadro 2). Nesta avaliação concluímos que um dos agravantes pode ter sido a coleta do líquido por sucção, que pode ter carreado para o produto quantidades das claras dos ovos as quais possuem alta concentração de ovoalbumina, fator que provavelmente não é observado na coleta por inversão das bandejas, pois devido à maior viscosidade da clara há probabilidade de menor escoamento junto com o líquido alantoico.

Conforme indicado no Quadro 2, há também diferença nas centrifugações que poderia impactar nas quantidades de ovoalbumina pois esta é uma etapa crítica na separação molecular, para esse caso consideramos essa diferença relevante pois as etapas foram executadas de acordo com as validações demonstrando, assim, estabilidade dos gradientes, bem como a separação adequada.

3.2.1 Lotes de produção em escala industrial

Os três lotes produzidos em escala industrial no Laboratório de Influenza foram monitorados conforme plano de controle ambiental estabelecido com base nos critérios dos guias de boas práticas de produção de produtos farmacêuticos para uso em humanos e obtiveram resultados satisfatórios.

Todos os colaboradores envolvidos estavam treinados nos Procedimentos Operacionais Padrões (POP) das suas respectivas etapas produtivas e nos procedimentos gerais, tais como Biossegurança.

As manipulações virais foram realizadas sob condição de biocontenção e os equipamentos de proteção individual e coletiva foram utilizados conforme preconizado para laboratórios NBGE2. Não houve relatos de quaisquer sintomas de gripe após a produção de nenhum dos colaboradores envolvidos.

As matérias-primas utilizadas na produção foram todas testadas e aprovadas pelo controle de qualidade, e os fornecedores estavam qualificados pela equipe de Garantia da Qualidade do IB conforme a RDC 17 da ANVISA.

Os ovos utilizados na produção da vacina são controlados diferentemente dos ovos utilizados na produção dos bancos que são SPF. Isso é devido principalmente ao volume de ovos utilizados na produção, às instalações das granjas produtoras de ovos SPF, os custos dos testes e controles bem como às quantidades limitadas de matrizes de galinhas para geração dos ovos SPF, que inviabilizam a produção com ovos dessa qualidade. Basicamente, a diferença entre a produção de ovos SPF e ovos controlados está no fato de que as aves produtoras de ovos controlados devem ser vacinadas contra Marek, Bouba, Coccdiose, Pneumovirus, Colibacilose, Newcastle, Gumboro, Bronquite (H120 e Ma5), Encefalomielite, Pneumovirus, Reovirus e Anemia infecciosa. Para a produção de ovos controlados é permitida a ventilação dos aviários com ar não filtrado desde que seja com fluxo unidirecional. As rotinas de monitoramentos são com intervalo maior de 30 dias e os testes realizados são: Adenovírus Aviário grupo III (EDS 76) no qual não é permitida a vacinação; *Mycoplasma gallisepticum*, *M.synoviae*; *Salmonella Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, Vírus da Doença de Newcastle; Vírus da Enterite dos Patos; Vírus da Hepatite dos Patos e Vírus da Influenza Aviária (BRASIL, 2007).

Os ovos controlados utilizados foram certificados pelo MAPA e aprovados nos monitoramentos de incubação até os 11 dias e transporte. Os controles de qualidade internos para comprovação da idade dos embriões e vitalidade foram satisfatórios.

Os resultados obtidos entre as etapas intermediárias de produção foram comparados às médias dos resultados de 16 lotes produzidos entre março e abril de 2016 com o vírus H1N1, A/California/7/2009pdm. O Laboratório de Influenza possui maior experiência com essa cepa, pois foi utilizada na produção da vacina sazonal durante os anos de 2012 a 2016. Serão utilizados nessa comparação os lotes produzidos com H1N1 com o mesmo fornecedor dos ovos utilizados na produção do H7N9 e no período mais próximo. Esse cuidado está sendo tomado, porque, de acordo com históricos da produção, podem ocorrer diferenças de rendimentos entre lotes de diferentes granjas de origem e idades diferentes das galinhas. Os lotes com a cepa H1N1 foram produzidos com uma quantidade maior de ovos em relação aos lotes produzidos com o H7N9, para ser possível a comparação os resultados serão apresentados em porcentagem ou em razão da quantidade de ovos colhidos conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Comparação entre A(H7N9) e A(H1N1)

	H7N9			H1N1
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média (16 lotes)
Ovos rejeitados após as etapas de inoculação e incubação em relação aos ovos recebidos (%).	6,34	6,16	6,14	5,63
Volume de Líquido Alantoico (mL)/ovos colhidos	11,22	11,13	11,26	11,54
Volume após a etapa de purificação (mL)/ovos colhidos	0,058	0,068	0,073	0,068
Volume após a fragmentação e inativação (mL)/ovos colhidos	0,197	0,23	0,245	0,228
Volume final de monovalente/ovos colhidos	0,34	0,393	0,433	0,42

Fonte: Elaborado pelo autor

É interessante notar que a cepa mãe do H1N1 (A/California/7/2009) foi produzida através da técnica de recombinação (*reassortant)* e a cepa H7N9 pela técnica de genética reversa. Mesmo com essa diferença na origem, comparando os dados podemos dizer que os bancos produzidos para o H7N9 apresentaram comportamento e rendimentos próximos à cepa H1N1 na produção dos lotes na escala industrial daquele mesmo ano.

Os três lotes produzidos com a cepa H7N9 foram aprovados pelo Controle de Qualidade do Instituto Butantan, pois apresentaram resultados dentro das especificações requeridas conforme as Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 - Registros dos resultados dos testes realizados com o produto final do Lote 1

Lote 1		
TESTE	RESULTADO	Especificação
Inativação viral	Passa o teste	Vírus inativo
Esterilidade bacteriana e fungico	Passa o teste	Ausência de crescimento microbiano
Endotoxina	< 3,10 UE/mL	≤ 100UE/mL
pH	7,4	6,8 – 7,6
Nitrogênio total	58 µg/mL	Informativo
Triton X-100 ® residual	306 µg/mL	≤ 560 µg/mL
Formaldeído residual	53 µg/mL	≤ 60 µg/mL
Proteína total	420,96 µg/mL	Informativo
Aspecto	Passa o teste.	Líq. levemente opalescente
Identidade de Hemaglutinina	Passa o teste	Reatividade para anticorpo padrão.
Dosagem de Ovalbumina	115,28 µg/mL	Informativo
Determinação de Teor de Hemaglutinina	182,41	Informativo

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 5 - Registros dos resultados dos testes realizados com o produto final do Lote 2

Lote 2		
TESTE	RESULTADO	Especificação
Inativação viral	Passa o teste	Vírus inativo
Esterilidade bacteriana e fFungico	Passa o teste	Ausência de crescimento microbiano
Endotoxina	< 1,17 UE/mL	≤ 100UE/mL
pH	7,4	6,8 – 7,6
Nitrogênio total	53 µg/mL	Informativo
Triton X-100 ® residual	351 µg/mL	≤ 560 µg/mL
Formaldeído residual	53 µg/mL	≤ 60 µg/mL
Proteína total	389,66 µg/mL	Informativo
Aspecto	Passa o teste.	Líq. levemente opalescente
Identidade de Hemaglutinina	Passa o teste	Reatividade para anticorpo padrão.
Dosagem de Ovalbumina	87,62 µg/mL	Informativo
Determinação de Teor de Hemaglutinina	167,42 µg/mL	Informativo

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 6 - Registros dos resultados dos testes realizados com o produto final do Lote 3

Lote 3		
TESTE	RESULTADO	Especificação
Inativação viral	Passa o teste	Vírus inativo
Esterilidade bacteriana e fungico	Passa o teste	Ausência de crescimento microbiano
Endotoxina	<0,50 UE/mL	≤ 100UE/mL
pH	7,4	6,8 – 7,6
Nitrogênio total	52 µg/mL	Informativo
Triton X-100 ® residual	349 µg/mL	≤ 560 µg/mL
Formaldeído residual	51 µg/mL	≤ 60 µg/mL
Proteína total	383,80 µg/mL	Informativo
Aspecto	Passa o teste.	Líq. levemente opalescente
Identidade de Hemaglutinina	Passa o teste	Reatividade para anticorpo padrão.
Dosagem de Ovalbumina	109,13 µg/mL	Informativo
Determinação de Teor de Hemaglutinina	170,68 ug/mL	Informativo

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados acima demonstram que a produção industrial com cepa H7N9 foi satisfatória, pois todos estão dentro das especificações baseadas na farmacopeia europeia. Esses resultados habilitam os três lotes produzidos a serem utilizados nos registros da vacina.

As previsões realizadas com os resultados do lote piloto também foram condizentes com os resultados obtidos nas produções industriais.

Vale ressaltar que os resultados de identidade da hemaglutinina em relação à cepa mestre, A/Shangai/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC-RG32A.3, demonstraram que mesmo após as passagens dos vírus nos ovos na produção do BE e BT e após a inoculação em larga escala na produção industrial, o vírus H7N9 não sofreu mutação e conservou as suas características antigênicas.

Os resultados para ovoalbumina se confirmaram mais baixos do que a concentração obtida na produção do lote piloto demonstrando que as diferenças nas etapas de colheita do Líquido Alantoico e na purificação indicadas no Quadro 2 podem representar diferenças importantes para a qualidade final do produto. Apesar da diferença na técnica de purificação, ambos os processos foram purificados em gradientes de sacarose que se mostraram estáveis, visto que os registros de coleta dos gradientes demonstraram valores de porcentagem de sacarose decrescentes gradativos e os volumes de descarte e coleta conforme as validações realizadas nessas etapas, sendo esta diferença a menos provável de haver causado um nível maior de ovoalbumina no lote piloto. Assim, há de se destacar a etapa de colheita do

Líquido Alantoico que foi por sucção no lote piloto, que é a mais provável causa da diferença encontrada.

Foi realizado também um estudo para verificar os rendimentos da produção da Hemaglutinina. Os resultados estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados dos estudos de purificação e recuperação da hemaglutinina

Amostra		Concentrado	7,5	Monovalente
Volume (mL)		100000	7790	49140
HA total (mg/mL)		0,13753	1,12551	0,18668
HA total (mg) (a)		1,38E+04	8,77E+03	9,17E+03
Recuperação de HA (%)(c)		100	63,75	66,70
Proteína (mg/mL) (b)		22,73	3,79	420,96
Proteína total (mg)		2,27E+06	2,95E+04	2,07E+04
Recuperação de Proteína Total (%)(c)		100	1,30	0,91
Enriquecimento de HA (d)		1	49	73

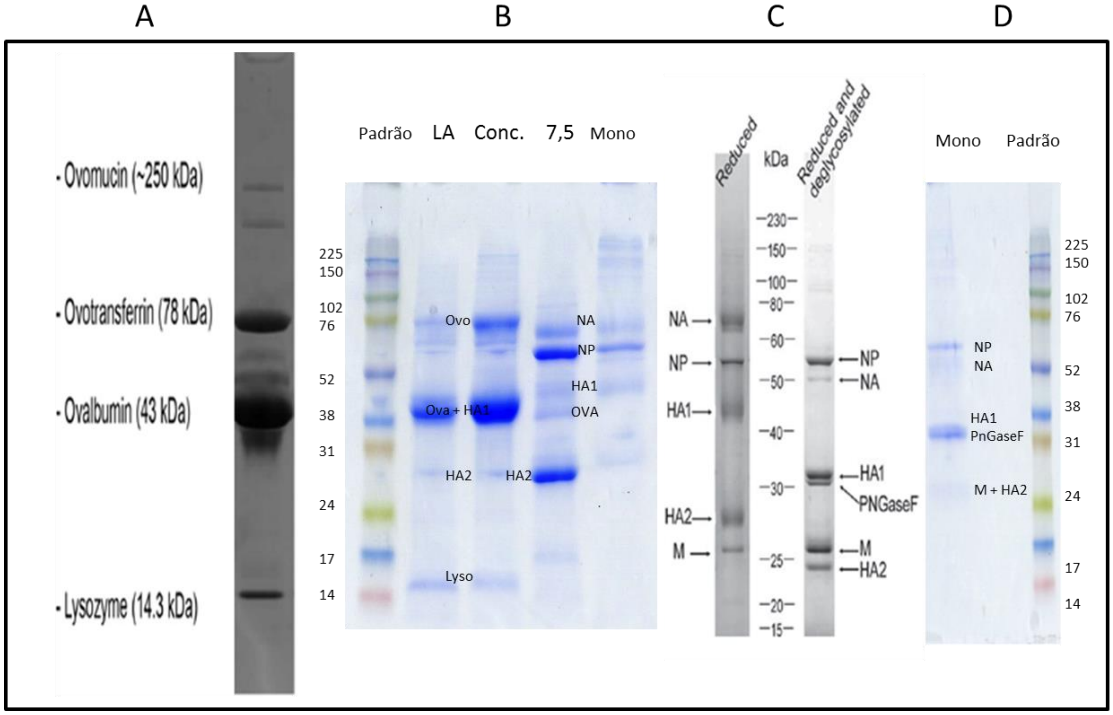
(a) Amostras quantificadas através do método de imuno difusão radial simples.
(b) Amostras quantificadas pelo método de biureto.
(c) a quantidade de hemaglutinina e proteína total dosadas na amostra do concentrado foi considerada como 100% para a análise de HA recuperado e de proteína total.
(d) Para análise do fator de enriquecimento foi adotado o valor 1 para a amostra de concentrado, considerando-se a razão do total de HA recuperado pela Proteína Total recuperada.
Fonte: Elaborado pelo autor

Diante dos dados da Tabela 7 é possível afirmar que processo produtivo foi capaz de recuperar em torno de 66,7% do total de Hemaglutinina gerada no processo de cultivo viral. Vale ressaltar que esse valor foi obtido considerando-se a amostra do concentrado que é a etapa onde a detecção da hemaglutinina pelo método de imunodifusação radial é possível, nas etapas anteriores a HA encontra-se muito diluída e não é possível a dosagem, portanto, as perdas antes da etapa de concentração não foram consideradas.

Conclui-se pelos dados que o processo de purificação é eficiente visto que o produto final obtido é de fato mais puro que o inicial considerando-se que o fator de enriquecimento aumentou 73 vezes em relação ao valor inicial adotado como sendo 1. É importante destacar que a etapa mais eficiente de purificação ocorre da etapa de Concentrado para a fração 7,5 quando tivemos um fator de purificação de 49 vezes. É nessa etapa que ocorre a purificação do vírus influenza por ultracentrifugação. Da etapa da fração 7,5 para o Monovalente, temos apenas um

fator de purificação de menos de 1,5 vez (conforme o fluxograma de trabalho, Figura 10).

Para avaliar o processo de purificação e caracterizar o monovalente obtido foram feitos géis de SDS-PAGE com amostras intermediárias coletadas nas etapas 6, 8, 13 e 18. Sendo a amostra 6 representativa do Líquido Alantoico colhido dos ovos inoculados, a etapa 8 o Líquido Alantoico concentrado (fator de concentração de 20 vezes). A etapa 13 representa o produto após a purificação em gradiente de sacarose e concentração de aproximadamente 11 vezes após a etapa 8. E por último a amostragem do monovalente final da etapa 18 que representa uma amostra após a fragmentação e inativação viral bem como a diluição de aproximadamente 6 vezes do produto após a etapa 13.

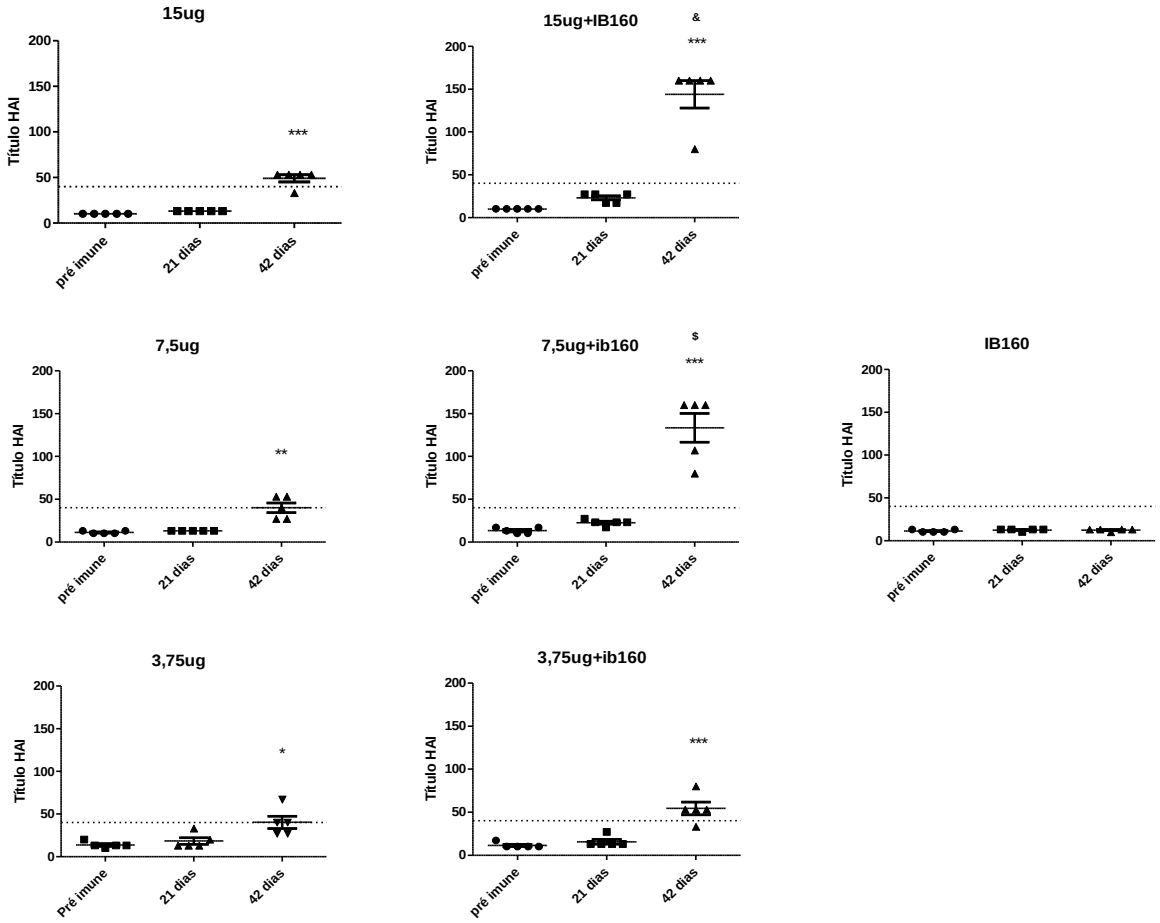


* As amostras LA, Conc. e 7,5 com 25 µg de proteína total/fração e 6 µg de proteínas totais da amostra Mono foram aplicadas no gel. Foi utilizado gel com 12% de acrilamida-bisacrilamida. As amostras foram aplicadas na condição desnaturante com SDS e reduzidas com 2-mercaptoetanol (B) e as amostras Mono na condição desnaturante, reduzida e deglicosilada pela enzima PNGaseF (D). Os dados de (A) foram extraídos de Lasse et al. (2015) e (D) de Li et al. (2015) para comparação.
Ovotransferrina (Ovo), Ovalbumina (Ova), Lisozima (Lyso), Neuraminidase (NA), Núcleo Proteína (NP), Hemaglutinina porção 1 (HA1), Hemaglutinina porção 2 (HA2), Proteína M (M) e enzima PnGaseF.
Figura 14 – Gel de eletroforese das etapas intermediárias de produção
Fonte: Elaborado pelo autor

É interessante destacar o resultado obtido pelo processo de purificação, observando-se as amostras LA, Conc. e 7,5 onde é possível visualizar uma clara redução de proteínas dos ovos tais como Ovotransferrina, Ovalbumina e Lisozima.

O gel mostrado condiz com os cálculos de enriquecimento de HA demonstrado na tabela de estudo de rendimentos que mostram um fator de enriquecimento de HA de 49 vezes entre a amostra concentrado e 7,5 e 1,49 vezes entre a fração 7,5 e monovalente.

Assim como no lote piloto, a vacina produzida no lote industrial foi também testada em relação à imunogenicidade em camundongos sendo que para esse experimento, afim de avaliar a possibilidade de imunização com apenas uma dose, foram testadas formulações com o adjuvante IB160. Os resultados estão representados nos gráficos conforme Figura 15.



Os soros extraídos dos animais imunizados com doses de 3,75 µg/mL, 7,5 µg/mL e 15 µg/mL com ou sem o adjuvante IB160 e os títulos dos animais inoculados com IB160 somente. Estão representados em cada gráfico os títulos dos soros obtidos nas sangrias pré-imunes, após 21 dias da primeira imunização (imunização no tempo zero) e aos 42 dias, 21 dias após a segunda imunização. O teste foi realizado utilizando-se o vírus A/Shangai/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC-RG32A.3 formulado com 4 unidades de hemaglutinina (4HA) e hemácias de cobaia a 1%.

* O grupo apresentou diferença estatística em relação ao pré imune ($p<0,05$).

** O grupo apresentou diferença estatística em relação ao pré imune ($p<0,01$).

*** Os grupos apresentaram diferença estatística em relação ao pré imune ($p<0,001$).

& o grupo 15 µg + IB160 apresentou diferença estatística em relação ao grupo 15 µg ($p<0,001$).

$ O grupo 7,5 µg + IB160 apresentou diferença estatística em relação ao grupo 7,5 µg ($p<0,01$).

Não houve diferença significativa entre os grupos aos 21 dias.

Figura 15 – Representação gráfica dos títulos obtidos para os ensaios de Inibição da hemaglutinação
Fonte: Elaborado pelo autor

Neste ensaio não foi possível constatar imunização satisfatória dos animais com apenas uma dose, semelhante aos resultados obtidos para o lote piloto.

Analisando somente os grupos aos 42 dias (duas doses) sem adjuvante, o grupo com 15 µg foi o que apresentou melhor resultado, ainda que todos os grupos tenham apresentado uma resposta na produção de anticorpos inibidores de

hemaglutinação significativos quando comparados ao soro pré-imune. Entre os grupos aos 42 dias com o IB 160, os grupos com 15 µg e 7,5 µg apresentaram diferença estatística em relação aos grupos com a mesma dosagem, mas sem adjuvante. Esse resultado demonstra que a adição de adjuvante na vacina aumentou a resposta imune dos animais ainda que esse aumento não tenha sido observado nos animais imunizados somente com a primeira dose.

Os resultados demonstraram que com a administração de duas doses as três formulações testadas sem IB160 apresentaram uma resposta de produção de anticorpos inibidores de hemaglutinação significativa em relação ao grupo pré-imune, portanto todas essas formulações vacinais foram capazes de imunizar os animais. No entanto, animais imunizados com a formulação com 15 µg parecem apresentar títulos mais homogêneos e levemente maiores. Para os grupos com adjuvante IB160 observou-se o mesmo resultado, sendo que os animais imunizados com 15 µg e 7,5 µg apresentaram resultados próximos e sem diferença estatística.

Para avaliar o rendimento em doses da produção industrial assim como na análise do lote piloto iremos adotar 7,5 µg baseados nos resultados dos nossos experimentos e também dos resultados de Mulligan et al. (2014) que demonstrou em humanos que a dose de 7,5 µg mais adjuvante gera títulos satisfatórios de imunização. Sendo assim considerando-se os 20% para a estabilidade do produto durante a validade de um ano poderíamos formular doses com 9 µg. Diante do rendimento médio dos três lotes produzidos teríamos a capacidade de produção de 1.016.446 por lote de 144.480 ovos produzidos. Sendo assim, teríamos 7,50 doses/ovo colhido (3,6% a mais em relação ao lote piloto). Atualmente a fábrica de Influenza possui capacidade para produzir um tamanho de lote de 321.960 ovos dos quais, dessa forma e baseados na discussão acima, teríamos uma produção diária para resposta a uma pandemia de 2.264.667 doses.

Atualmente a população brasileira é de aproximadamente 207.000.000 pessoas e, diante do resultado obtido, seria possível produzir vacina suficiente para a população em aproximadamente 7 meses, considerando-se duas doses para cada pessoa. Não estão sendo considerados nessa estimativa os tempos de formulação e envase bem como as liberações da vacina pelo controle de qualidade e garantia da qualidade, considerando-se essa cadeia completa levaríamos em torno de 8 a 9 meses. Essa avaliação também é com base em uma situação em que tivéssemos todos os insumos disponíveis para a produção continua. Em uma situação como

essa, é importante notar que deixaríamos de produzir a vacina sazonal nesse período.

Em uma situação real de pandemia será necessário avaliar a necessidade de vacinação não somente no Brasil como no mundo todo. Caso a demanda de doses seja demasiadamente grande, diferentes estratégias de imunização podem ser elaboradas. Por exemplo, utilizar adjuvante caso disponível, com uma quantidade menor de HA. Diante do resultado desse experimento, por exemplo, poderíamos realizar imunizações com 3,75 µg e dessa forma aumentar a quantidade de doses (REED; ORR; FOX, 2013).

A imunização com apenas uma dose da vacina fragmentada e inativada produzida com cepa H7N9 de vírus influenza aviário, mesmo com o uso de adjuvantes, tem se demonstrado ineficaz, assim como demonstrado neste trabalho e em Mulligan et al. (2014), no caso de uma pandemia.

Devido à grande vantagem de economia de tempo de resposta a uma pandemia caso fosse possível a imunização com apenas uma dose, mesmo que em doses com concentrações altas, outras estratégias estão sendo elaboradas. Entre elas a utilização da vacina com vírus inteiro inativado, que conforme Wong et al. (2014) foi capaz de gerar proteção em ferrets com apenas uma dose.

Com a experiência adquirida com a produção da vacina deste projeto foi possível estimar um prazo médio para a produção dos primeiros lotes da vacina contra o H7N9. Soma-se a esta análise a experiência adquirida na Instituição com a produção da vacina de gripe sazonal. Uma previsão dos prazos encontra-se na linha do tempo (Figura 16).

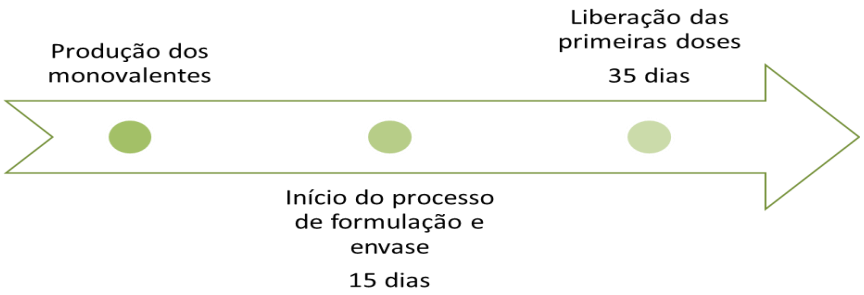


Figura 16 – Linha do tempo com prazos estimados para produção da vacina
Fonte: Elaborado pelo autor.

Esse prazo de 35 dias é possível, pois devido à realização deste projeto o Instituto Butantan já possui o banco trabalho pronto e os reagentes. Os reagentes,

anticorpo e antígeno padrão, são utilizados para a quantificação da hemaglutinina que permite formular e envasar as doses.

Nessa simulação não foi considerado o tempo de 15 dias para o teste de esterilidade dos monovalentes sendo estes liberados para a formulação de imediato sob-risco para ganho de tempo. A liberação dos monovalentes pode ser antecipada, pois as validações das etapas críticas, fragmentação e inativação, já foram realizadas e, dessa forma, apenas é necessária uma conferência dos registros de produção para certificação de que os parâmetros estabelecidos foram seguidos.

Esses prazos foram estimados na condição mais favorável de início de produção e com disponibilidade de todos os insumos necessários. Caso a pandemia ocorresse durante a campanha de produção da vacina sazonal, por exemplo, seria necessário esvaziar o prédio com os lotes em produção e realizar a limpeza e liberação da área para a produção com o H7N9 somente após sete dias.

Não estão discutidos neste trabalho os tempos de disponibilização da vacina nas diferentes regiões e cabe ressaltar que a distribuição é complexa, pois a vacina precisa de cadeia de frio para ser conservada entre 2 e 8 °C, bem como não estão analisados a logística e os tempos de administração da vacina na população.

4 CONCLUSÃO

Este trabalho produziu os bancos de vírus H7N9, a vacina em escala piloto e na escala industrial que foi realizada em condições de boas práticas de fabricação, podendo assim ser utilizada nos ensaios pré-clínicos e clínicos, fase I, para conclusão da validação do processo de produção da vacina. Foram avaliadas todas as etapas necessárias para a produção da vacina contra o H7N9.

Demonstrou-se, através das análises dos dados obtidos, testes de controle e caracterizações que a vacina possui a qualidade necessária para atender às farmacopeias vigentes e, portanto é passível de utilização em ensaios clínicos. Os dados obtidos também foram comparados com os dados obtidos com a produção sazonal, para a produção da qual o instituto possui certificação desde 2012, apresentando similaridade.

Com o banco trabalho produzido e a importação prévia dos reagentes, nas condições mais favoráveis para a produção, é possível realizar a disponibilização do primeiro lote de vacina em 35 dias.

Comprovamos, portanto, que a vacina é funcional, pois foi capaz de gerar anticorpos específicos contra o H7N9 em camundongos. Neste experimento também foram avaliadas diferentes dosagens, bem como formulações com adjuvantes e desta forma foi possível estimar a capacidade produtiva teórica do Instituto Butantan em 2.264.667 doses por lote considerando-se formulações com 7,5 µg de HA. Além disso possibilitou-se a discussão de diferentes estratégias para a resposta a uma pandemia e estabeleceram-se os prazos necessários para a produção da vacina.

REFERÊNCIAS*

ACHARYA, T. **Hemagglutination Inhibition Test (HAI)**: principle, procedure, result and interpretations. 2014. Disponível em: <https://microbeonline.com/hemagglutination-inhibition-test-hai-principle-procedure-result-interpretations/>. Acesso em: 23 set. 2016.

ANDRADE, C. R. et al. Gripe aviária: a ameaça do século XXI. **Jornal Brasileiro de Pneumologia,** São Paulo, v. 35, n. 5, p. 470-479, maio, 2009.

ANDRADE, J. C. **Química analítica básica**: os instrumentos básicos de laboratório. Disponível em: <http://chemkeys.com/br/2011/12/02/quimica-analitica-basica-os-instrumentos-basicos-de-laboratorio/>. Acesso em 08 jun. 2012.

BEYER, W. E. et al. Seroprotection rate, mean fold increase, seroconversion rate: which parameter adequately expresses seroresponse to influenza vaccination? **Virus Research**, Amsterdam, v. 103, n. 1-2, p. 125-132, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 7, de 10 de março de 2006. Brasília, **Diário Oficial da União**, 20 de março de 2006. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1103714460>. Acesso em: 23 de maio, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 56, de 04 de dezembro de 2007. Brasília, **Diário Oficial da União**, 06 de dezembro de 2007. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1152449158>. Acesso em: 23 de maio, 2017.

BROOKS, G. F. (Ed.) et al. **Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology**. New York: McGraw-Hill, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC **recommends against the use of amantadine and rimantadine for the treatment or prophylaxis of influenza in the United States during the 2005–06 influenza season**. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/25151>. Acesso em: 20 out. 2010a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Prevention and control of influenza with vaccines recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP).** Atlanta, 2010b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5908.pdf.> Acesso em: 8 abr. 2011.

CHURSOV, A. et al. Specific temperature-induced perturbations of secondary mRNA structures are associated with the cold-adapted temperature-sensitive phenotype of influenza A virus. **RNA Biology**, Georgetown, v. 9, n. 10, p. 1-9, Oct., 2012.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referência: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

COX, N. J. et. al. O*rthomyxoviruses:* influenza. In: MAHY, B. W. J.; COLLIER, L. (Eds.). **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**. 10thed. New York: Oxford University Press, 2009. p. 385-433.

CROVARI, P.; ALBERTI, M.; ALICINO, C. History and evolution of influenza vaccine. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, Genova, v. 52, n. 3, p. 91-94, Sept., 2011.

DUARTE, P. A. D. et al. Pacientes com infecção por vírus A (H1N1) admitidos em unidades de terapia intensiva do Estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 231-236, 2009.

ENSERINK, M.; KAISER, J. Avian flu finds new mammal hosts. **Science**, Washington, v. 305, n. 5689, p. 1385a, Sept. 2004

EUROPEAN COMMISSION. **EudraLex**: the rules governing medicinal products in the European Union. Brussels, 2008.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 5th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2004.

FIORE, A. E. et al. **Prevention and control of influenza with vaccines:** recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP), 2010. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2010.

FODOR, E. et al. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. **Journal of Virology**, Washington, v. 76, n. 18, p. 8989-9001, Sept., 2002.

FORLEO-NETO, E. et al. Influenza. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 267-274, mar./abr., 2003.

FREY, S. et al. Clinical efficacy of cell culture–derived and egg-derived inactivated subunit influenza vaccines in healthy adults. **Clinical Infectious Diseases,** Chicago, v. 51, n. 9, p. 997-1004, Nov., 2010.

HALE, B. G. et al. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. Review. **The Journal of General Virology**, London, v. 89, n. 10, p. 2359-2376, Oct., 2008.

HEINIG, K.; VOGT, C. Determination of Triton X-100 in influenza vaccine by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 359, n. 2, p. 202-206, Sept., 1997.

HERFST, S. et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. **Science**, Washington, v. 336, n. 6088, p. 1534-1541, Jun., 2012.

HIRST, G. K. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 75, n. 1, p. 49-64, Jan., 1942.

JAMES, J. M. et al. Safe administration of influenza vaccine to patients with egg allergy. **The Journal of Pediatrics,** Milan, v. 133, n. 5, p. 624-628, Nov., 1998.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. Ortomixovírus (vírus da influenza). In: BROOKS, G. F. et al. **Jawetz, Melnick & Adelberg's microbiologia médica. 24. ed.** Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Interamericana do Brasil, 2009. p. 533-545.

KILBOURNE, E. D. Influenza pandemics of the 20th century. **Emerging Infectious Diseases,** Atlanta, v. 12, n. 1, p. 9-14, Jan., 2006.

KON, T. C. et al. Influenza vaccine manufacturing: effect of inactivation, splitting and site of manufacturing. Comparison of influenza vaccine production processes. **PloS one**, San Francisco, v. 11, n. 3, e0150700, Mar., 2016.

KÜRSTEINER, O. et al. Inflexal® V— the influenza vaccine with the lowest ovalbumin content. **Vaccine**, London, v. 24, n. 44/46, p. 6632-6635, Nov., 2006.

LAEMMLI U. K. Clevage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature,** London, v. 15, n. 227, p. 680-685, Aug., 1970.

LAMB, R. A.; CHOPPIN, P. W. Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides, including three P polypeptides, from RNA produced by primary transcription. **Virology**, v. 74, n. 2, p. 504-519, Oct., 1976.

LASSE, M. et al. The impact of pH, salt concentration and heat on digestibility and amino acid modification in egg white protein. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 38, p. 42-48, march 2015.

LI, C. et al. Collaborative studies on the development of national reference standards for potency determination of H7N9 influenza vaccine. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, Austin, v. 11, n. 6, p. 1351-1356, 2015.

LONGINI JUNIOR, I. M. et al. Containing pandemic influenza with antiviral agents. **American Journal of Epidemiology,** Baltimore, v. 159, n. 7, p. 623-633, Apr., 2004.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov., 1951.

MARTINS, N. R. S. Influenza aviária: uma revisão dos últimos dez anos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 97-140, 2001.

MILLIPORE CORPORATION. **Protein concentration and diafiltration by tangential flow filtration**. Billerica, MA, 2003.

MINOR, P. D. Vaccines against seasonal and pandemic influenza and the implications of changes in substrates for virus production. **Clinical Infectious Diseases,** Chicago, v. 50, n. 4, p. 560-565, Feb., 2010.

MIYAKI, C. et al. Production of H5N1 (NIBRG-14) inactivated whole virus and split virion influenza vaccines and analysis of immunogenicity in mice using different adjuvant formulations. **Vaccine**, London, v. 28, n. 13, p. 2505-2509, Mar., 2010.

MULLIGAN, M. J. et al. Serological responses to an avian influenza A/H7N9 vaccine mixed at the point-of-use with MF59 adjuvant: a randomized clinical trial. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 312, n. 14, p. 1409-1419, Oct. 2014.

MURPHY, B. R.; WEBSTER, R. G. Orthomyxovirus. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. (Ed). **Virology**. 2nd ed. New York: Raven Press, 2001.

NASH, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. **The Biochemical Journal**, London, v. 55, n. 3, p. 416-421, Oct., 1953.

OXFORD, J. S.; LAMBKIN, R. Targeting influenza virus neuraminidase – a new strategy for antiviral therapy. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 3, n. 10, p. 448-456, Oct., 1998.

PALESE, P.; SHAW, M. L. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1647-1690.

PONTORIERO, A. V. et al. Antigenic and genomic relation between human influenza viruses that circulated in Argentina in the period 1995-1999 and the corresponding vaccine components. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 130-140, Oct., 2003.

REED, S. G.; ORR, M. T; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, New York, v. 19, n. 12, p. 1597-1608, Dec. 2013.

REIS, R.; ZYDNEY, A. Bioprocess membrane technology. **Journal of Membrane Science,** Amsterdam, v. 297, n. 1-2, p. 16-50, July 2007.

RESA-INFANTE, P. et al. The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. **RNA Biology**, Georgetown, v. 8, n. 2, p. 207-215, Mar., 2011

ROBB, N. C. et al. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. **The Journal of General Virology**, London, v. 90, n. 6, p. 1398-1407, June 2009.

SALK, J. E. A simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza-virus and the corresponding antibody. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 49, n. 2, p. 87-98, Aug., 1944.

SCHROEDER, C. et al. Functional reconstitution in lipid vesicles of influenza virus M2 protein expressed by baculovirus: evidence for proton transfer activity. **The Journal of General Virology**, London, v. 12, p. 3477-3484, Dec., 1994.

SHINYA, K. et al. Avian flu: Influenza virus receptors in the human airway. **Nature**, London, v. 440, p. 435-436, Mar., 2006.

SINGH, N.; PANDEY, A.; MITTAL, S. K. Avian influenza pandemic preparedness: developing prepandemic and pandemic vaccines against a moving target. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge, v. 12, n. e14, Apr., 2010.

SMITH, A. E.; HELENIUS, A. How viruses enter animal cells. **Science**, Washington, v. 304, n. 5668, p. 237-242, Apr., 2004.

TANNER, W. D.; TOTH, D. J. A.; GUNDLAPALLI, A. V. The pandemic potential of avian influenza A(H7N9) virus: a review. **Epidemiology & Infection**, Cambridge, v. 143, n. 16, p. 3359-3374, July 2015.

TAUBENBERGER, J. K.; MORENS, D. M. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 1, p. 15-22, Jan., 2006.

VAN RIEL, D. et al. H5N1 virus attachment to lower respiratory tract. **Science**, New York, v. 312, n. 5772, p. 399, Apr., 2006.

VAZ, C. A. C. Interação antígeno/anticorpo *in vitro*. In: CALICH, V.; VAZ, C. (Orgs). **Imunologia.** Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p. 139–140.

WENDEL, I.; MATROSOVICH, M.; KLENK, H. D. Snapshot: evolution of human influenza A viruses. **Cell Host Microbe**, Cambridge, v. 17, n. 3, p. 416-416.e1, Mar., 2015.

WHITTAKER, G. R. Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge, Feb. 8, p. 1-13, 2001.

WILEY, D. C.; WILSON, I. A.; SKEHEL, J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. **Nature**, London, v. 289, p. 373-378, Jan., 1981.

WONG, S. S. et al. A single dose of whole inactivated H7N9 influenza vaccine confers protection from severe disease but not infection in ferrets. **Vaccine**, Amsterdam, v. 32, n. 35, p. 4571-4577, July 2014.

WOOD, F. M. et al. An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines. **Journal of Biological Standardization**, London, v. 5, p. 237-247, July 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Analysis of recent scientific information on avian influenza A(H7N9) vírus**. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/riskassessment_AH7N9_201702/en/>. Acesso em: 11 out. 2016a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global influenza programme:** Influenza virus infection in humans. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/virology_laboratories_and_vaccines/influenza_virus_infections_humans_feb14.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2014a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics:** influenza. Disponível em: <http://www.who.int/topics/influenza/en/>. Acesso em: 02 abr. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Immunization, vaccines and biologicals:** influenza. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/topics/influenza/en/index.html>. Acesso em: 05 abr. 2014b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Influenza at the human-animal interface**. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_02_14_2017.pdf?ua=1>. Acesso em: 16 fev. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Influenza: vaccines**. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/vaccines/en/>. Acesso em: 13 jul. 2016b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortant derived from avian influenza viruses.** Geneva, 2003. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/influenzaRMD2003_5.pdf> Acesso em: 8 abr. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recommendations for the production and control of influenza vaccine (inactivated).** Geneva, 2005. (WHO Technical Report Series).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance**. Geneva, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO pandemic phase descriptions and main actions by phase**. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/resources/documents/pandemic_phase_descriptions_and_actions.pdf>. Acesso em 10 jan. 2017.

ZHOU, L. et al. Sudden increase in human infection with avian influenza A(H7N9) virus in China, September-December 2016. **Western Pacific Surveillance and Response Journal**, Manila, v.8, n.1, p. 1-9, Jan., 2017.

ZUCKERMAN, A. J. et al. **Principles and practice of clinical virology**. 6th ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.