



Estudo de viabilidade técnico-econômica de
um processo de produção de FVIII em escala
industrial em desenvolvimento no Brasil

Mariana Pisani Rodrigues Fernandes

Orientadores:

Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing

Daniel André Ribeiro, D. Sc.

Juliana Coronel de Lima Lages, D.Sc.

Junho de 2017

**ESTUDO DE VIABILIDADE TÉCNICO-
ECONÔMICA DE UM PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
FVIII EM ESCALA INDUSTRIAL EM
DESENVOLVIMENTO NO BRASIL**

Mariana Pisani Rodrigues Fernandes

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química
como parte dos requisitos para obtenção do grau de Engenharia de Bioprocessos.

Aprovado por:

Rimenys Junior Carvalho, D. Sc.

Rodrigo Coelho Ventura Pinto, D. Sc.

Ricardo de Andrade Medronho, Ph. D.

Orientado por:

Leda dos Reis Castilho, Dr, -Ing.

Daniel André Ribeiro, D. Sc.

Juliana Coronel de Lima Lages, D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ-Brasil

Junho de 2017

Fernandes, Mariana Pisani Rodrigues.

Estudo de viabilidade técnico-econômica de um processo de produção de FVIII em escala industrial em desenvolvimento no Brasil/ Mariana Pisani Rodrigues Fernandes Rio de Janeiro: UFRJ/EQ 2017.

(Projeto final) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2017

Orientadores: Leda Castilho e Daniel André Ribeiro e Juliana Coronel de Lima Lages.

1.Fator VIII 2.Perfusão 3.Avaliação técnico-econômica 4.Projeto final. (Graduação-UFRJ/EQ) 5. Leda Castilho e Daniel André Ribeiro e Juliana Coronel de Lima Lages. I Estudo de viabilidade técnico-econômica de um processo de produção de FVIII em escala industrial em desenvolvimento no Brasil.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a meus pais e família, que apoiam e celebram cada etapa vencida. Inspiro-me em cada um de vocês. Vocês são minha maior motivação.

Agradeço aos orientadores Daniel, Juliana e Leda por cada hora dedicada, pelas críticas, sugestões e apoio durante o desenvolvimento do projeto. Aos pesquisadores e funcionários do LECC que contribuíram com a experiência e dados essenciais para o trabalho.

Agradeço também as Professora Leda e Andrea que idealizaram e viabilizaram a Ênfase em Biofármacos pelo Programa de Treinamento em Biotecnologia Farmacêutica.

Aos amigos e colegas presentes durante os bons momentos. Aos funcionários da UFRJ, aos professores da Escola de Química por dividirem o conhecimento adquirido. Meu muito obrigado a todos.

Resumo do Projeto Final apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenharia de Bioprocessos.

Estudo de viabilidade técnico-econômica de um processo de produção de FVIII em escala industrial em desenvolvimento no Brasil.

Mariana Pisani Rodrigues Fernandes

Junho, 2017

Orientadores: Prof.Leda Castilho

Daniel André Ribeiro

Juliana Coronel de Lima Lages

Atualmente o gasto do Ministério da Saúde com a compra de biofármacos já chega a mais dois bilhões de reais. A compra de FVIII, utilizado no tratamento de hemofílicos representa boa parte desse custo. O objetivo desse trabalho foi determinar a viabilidade de uma planta de produção de FVIII recombinante a partir de um processo em desenvolvimento no Laboratório de Engenharia de Cultivo Celulares (UFRJ). Como hipótese, a construção da planta iniciaria no ano de 2018 finalizando em 2020 e operaria por 10 anos. A demanda do mercado brasileiro até o ano de 2030 foi estimada em 1,3 bilhões de UI. O projeto foi desenhado para atender a 100% da demanda quando operando na capacidade máxima. O processo de produção foi baseado em um cultivo em perfusão que utiliza o sedimentador gravitacional lamelado em plano inclinado para retenção de células. Com o objetivo de avaliar o cenário menos favorável, foi considerado a obtenção de um produto com baixa atividade específica e um rendimento global de 40% para as etapas do *downstream*. Ainda assim a análise de viabilidade econômica para essas condições apontou que o projeto seria um investimento viável e lucrativo com tempo de retorno previsto de 3 anos e 2 meses, VPL(valor presente líquido) calculado em US\$ 357 milhões e TIR (taxa interna de retorno) de 73,72%.

Sumário

1	Introdução	1
2	Objetivo	3
2.1	Objetivo geral	3
2.2	Objetivos específicos	3
3.	Revisão Bibliográfica	4
3.1	Biofármacos	4
3.2	Biossimilares	7
3.3	Hemofilia A.....	10
3.4	Coagulação sanguínea.....	12
3.5	Fator VIII	14
3.6	Conceitos de plantas de produção de biofármacos	15
3.7	Processos de Produção do Fator VIII Recombinante.....	20
4	Estimativa de Mercado	25
5	Dimensionamento dos equipamentos de processo	29
5.1	Upstream	29
5.1.1	Propagação celular	29
5.1.2	Biorreação	31
5.2	Downstream	36
5.2.1.	Tanque de colheita	38
5.2.2	Filtração	38
5.2.3.	Tanque de equalização	40
5.2.4.	Cromatografia de troca catiônica	41
5.2.4.	Cromatografia de interação hidrofóbica	45
5.2.5.	Cromatografia de afinidade.....	47
5.2.6.	Ultrafiltração/Diafiltração	49

5.2.7. Cromatografia de troca aniônica	52
5.2.8. Filtração viral	53
5.2.9 Formulação.....	55
5.2.10 Filtração esterilizante	56
5.2.11 Processamento final	57
6. Estudo de viabilidade econômica	58
6.1 Investimento total.....	59
6.3. Custos de produção	64
6.4. Demonstração do Resultado de Exercício (DRE).....	67
6.5. Fluxo de caixa descontado	72
6.6. Valor presente líquido (VPL).....	76
6.7. Taxa interna de retorno (TIR)	76
6.8. Análise de sensibilidade.....	77
7. Conclusões.....	80
8 Referências bibliográficas	81

Índice de Figuras

Figura 1 Porcentagem de produtos aprovados em relação ao total de produtos aprovados produzidos nos principais sistemas de expressão. (Adaptado de Walsh et al, 2014).....	7
Figura 2 Transmissão do gene da Hemofilia (Unidos pela Hemofilia - Como surge a hemofilia).....	10
Figura 3 Esquema representativo do processo de coagulação em indivíduos saudáveis e em hemofílicos (Federação Mundial de Hemofilia, A Hemofilia em imagens, 2004)	13
Figura 4 Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares (Ferreira, Sousa, Dusse, & Carvalho, 2010).....	14
Figura 5 Esquema da estrutura primária do FVIII de cadeia completa (Reproduzido de THIM et al., 2010).	15
Figura 6 Representação esquemática da estrutura modificada do fator VIII pela ligação covalente. Princípio do medicamento Afstyla (referência).....	24
Figura 7 Perfil de coagulopatias na população brasileira.	25
Figura 8 Desenho esquemático de um processo em perfusão (Boedeker, 2001).	34
Figura 9 Ilustração do funcionamento de um biorreator associado a um sedimentador inclinado (Searles et al., 1994).....	35
Figura 10 Etapas do downstream.....	38
Figura 11 Relação entre fluxo e pressão para filtros da Sartorius (MaxiCaps). .	39
Figura 12 Direção do fluxo nas membranas Sartobind.	43
Figura 13 Relação entre vazão e pressão para a membrana Virosart® 200 cm2.	54
Figura 14 Curva de custos de biorreatores.	61
Figura 15 Ponto de nivelamento.	77
Figura 16 Relação entre preço do FVIII e VPL.....	78

Índice de Tabelas

Tabela 1 Diferenças entre biossimilares e os fármacos de referência aprovados pelo EMEA (adaptado de Huub Schellekens & Ellen Moors, 2010).	8
Tabela 2 Diferentes classificações de salas limpas (Alici & Blomberg, 2010)..	18
Tabela 3 Diferentes produtos aprovados para comercialização baseados em FVIII.	21
Tabela 4 Dados do número de indivíduos com hemofilia A no Brasil em comparação com a população brasileira de cada ano (NI - não informado).	26
Tabela 5 Incidência de hemofílicos do tipo A	27
Tabela 6 Massa de produto necessária por ano.....	28
Tabela 7 Cálculo do volume de inóculo por biorreator.	30
Tabela 8 Cálculos para propagação do inóculo.	30
Tabela 9 Premissas para o cálculo do número de ciclos.....	32
Tabela 10 Cálculos para dimensionamento do biorreator	33
Tabela 11 Definição do volume a ser processado por colheita.....	37
Tabela 12 Parâmetros para dimensionamento dos filtros para clarificação.....	40
Tabela 13 Soluções utilizadas na etapa de cromatografia de troca catiônica.	43
Tabela 14 Dimensionamento da membrana de troca catiônica.	44
Tabela 15 Soluções utilizadas na etapa de cromatografia de interação hidrofóbica.....	45
Tabela 16 Dimensionamento da membrana Sartobind phenyl.	46
Tabela 17 Composição das soluções utilizadas na cromatografia de afinidade (FVIII select).	48
Tabela 18 Dimensionamento da coluna de afinidade VIII select.	48
Tabela 19 Parâmetros ultrafiltração/diafiltração.	51
Tabela 20 Composição das soluções utilizadas na cromatografia de troca aniônica.....	52

Tabela 21 Considerações para dimensionamento da etapa de troca aniônica. ...	53
Tabela 22 Parâmetros da filtração viral.	55
Tabela 23 Excipientes e concentração para produto final.	56
Tabela 24 Parâmetros para a filtração esterilizante do FVIII após a formulação.	56
Tabela 25 Licitações para o FVIII recombinantes (Portal de Transparência Pública).....	58
Tabela 26 Modelo para cálculo dos custos de investimento baseado no custo dos principais equipamentos (Peters et al., 1991).	60
Tabela 27 Relação de preços médios de biorreatores com relação ao volume (Chico, 2004).	61
Tabela 28 Custo de equipamentos.	62
Tabela 29 Custo para construção de áreas limpas classificadas	63
Tabela 30 Cálculo do custo total de investimento em infraestrutura.....	63
Tabela 31 Custo dos consumíveis utilizados no processo de produção para o ano de 2030.	64
Tabela 32 Modelo de cálculo para os custos operacionais (Peters et al., 1991).	66
Tabela 33 Despesas operacionais do processo para o ano de 2030.	67
Tabela 34 Resultados financeiros do processo de produção do FVIIIr para o cenário 1.	69
Tabela 35 Resultados financeiros do processo de produção do FVIIIr para o cenário 2.	70
Tabela 36 Fluxo de caixa para o cenário 1.	73
Tabela 37 Fluxo de caixa para o cenário 2.	74
Tabela 38 Análise de sensibilidade do projeto.	79

1 Introdução

Biofármacos são proteínas ou ácidos nucleicos utilizados para fins terapêuticos ou de diagnóstico *in vivo* que são produzidos por meios que não a extração de fonte biológica nativa (Walsh, 2002). O termo biofármaco é utilizado para descrever um amplo grupo produtos e não é possível utilizar um único critério como fonte, técnica de fabricação ou estrutura para identificá-los. A definição abrange produtos como proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais, produtos para terapia gênica e oligonucleotídeos antisense produzidos por síntese química ou enzimática. Pode-se dizer que a definição de biofármacos será frequentemente modificada no sentido de abrigar novas classes moléculas (Walsh, 2002).

A eficácia dos biofármacos e a habilidade para tratar condições que não possuíam terapia específica garante, apesar do elevado custo de produção, alta lucratividade a indústria farmacêutica. De acordo com o *Tufts Center for the Study of Drug Development*, a partir da ideia inicial até a obtenção do produto final são investidos no mínimo 2 bilhões de dólares e o processo leva, em média, 15 anos. Ainda assim, o mercado dos produtos biofarmacêuticos tem apresentado um comportamento constantemente crescente. Atualmente, a indústria de biofármacos é responsável por uma receita global de mais de 288 bilhões de dólares, valor que representa mais de 23% do total da receita global da indústria farmacêutica. Estima-se que nos próximos 5 ou 10 anos mais da metade dos fármacos desenvolvidos serão biofármacos (Sekhon, 2010).

Durante o período de 2010 a 2014, cinquenta e quatro novos biofármacos foram aprovados no mercado global, sendo dezessete destes anticorpos monoclonais, nove hormônios e oito proteínas derivadas do plasma. As principais indicações para os produtos desenvolvidos são câncer, condições inflamatórias e hemofilia. A hemofilia motivou o desenvolvimento de seis novos biofármacos durante o período (Walsh, 2014). A projeção mundial de vendas de produtos recombinantes para hemofilia em 2015 e 2016 foi de 9 bilhões e 11 bilhões de dólares, respectivamente (Kumar, 2015). Ainda assim, apenas 20 % da população global tem acesso a esses medicamentos devido ao seu alto custo. Em 2010 o uso de Fator VIII da coagulação sanguínea (FVIII) na Islândia era de 9,2 UI (unidade internacional) per capita enquanto na Índia chegava apenas a 0,0077 UI per capita, evidenciando o difícil acesso ao tratamento em países menos desenvolvidos. Nesse contexto, os biossimilares são essenciais para promover a

redução dos preços e expandir o alcance de mais pessoas a medicamentos (Sekhon, 2010).

No Brasil, no ano de 2015, do total de medicamentos adquiridos pelo Ministério da Saúde para garantir o abastecimento do Sistema Único de Saúde (SUS), 95% foram medicamentos de síntese química e 5% biofármacos. Esses últimos, porém, representaram 49% dos gastos, o que corresponde a um investimento de mais de 2 bilhões de reais. Os dados demonstram a necessidade de produção de biofármacos em território nacional, pois existe a necessidade de reduzir os gastos com a importação de biofármacos e estimular sua produção no país. O Ministério da Saúde está estabelecendo Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP's) para viabilizar a produção nacional (Stumm, 2015).

Estas Parcerias são acordos estabelecidos entre os laboratórios privados e públicos para transferir a tecnologia de medicamentos considerados estratégicos para fabricação no Brasil. O governo, por sua vez, se compromete a comprar a produção pelo SUS. A partir das PDP's o governo procura reduzir a dependência tecnológica, racionalizar os gastos com a saúde e ampliar o acesso ao tratamento.

Em 2012 foi estabelecida uma parceria exclusiva de longo prazo entre a Baxter International Inc. e a Hemobrás (Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia) para dar suporte ao desenvolvimento da capacidade de produção de FVIII recombinante (FVIIIr) com previsão de finalização em 2022. A partir desse prazo, estimava-se que o país conseguiria atender a cerca de 90% dos portadores da doença (Rondon, 2013). Entretanto, até o dado momento, somente foram consolidadas as fases 1 e 2 do processo de transferência que incluem o registro, a embalagem e a distribuição do FVIIIr. As fases 3, 4 e 5 dependem da planta pronta para operar visto que são destinadas ao envase, produção e assistência técnica. Entretanto devido a denúncias de irregularidades na administração da empresa não há previsão para o início da operação da fábrica.

Apesar da existência da PDP, laboratórios continuam realizando desenvolvimento próprio. Neste contexto, o presente trabalho visa estudar a viabilidade técnico-econômica do processo produtivo do FVIIIr em desenvolvimento no Laboratório de Engenharia de Cultivo Celulares (LECC), do Programa de Engenharia Química (PEQ), da COPPE/UFRJ.

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade técnico-econômica de um processo para produção de FVIIIr visando atender inicialmente à demanda nacional e possivelmente a demanda internacional de pacientes diagnosticados com hemofilia do tipo A.

2.2 Objetivos específicos

- Estimar o quantitativo de FVIII suficiente para suprir o mercado nacional e projetar a demanda até 2030.
- Dimensionar os equipamentos em escala industrial baseado em resultados obtidos para um processo em desenvolvimento no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares.
- Estimar os custos envolvidos no investimento na planta industrial.
- Estimar o custo de produção e avaliar a viabilidade econômica do processo em diferentes cenários.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Biofármacos

Durante as décadas de 80 e 90, boa parte dos biofármacos produzidos eram anticorpos monoclonais murinos e proteínas recombinantes de cadeia completa e inalterada. Hoje a maior parte dos produtos apresenta algum tipo de modificação feita por engenharia genética no intuito de melhorar características como estabilidade, especificidade ou perfil de resposta imunogênica. Começam a se estabelecer também outras tecnologias como a terapia gênica e a terapia antisense, mas, dentre todos os produtos classificados como biofármacos, os anticorpos monoclonais e as proteínas terapêuticas recombinantes ainda se destacam na lista de produtos aprovados (Walsh, 2002).

Em humanos, as proteínas terapêuticas são utilizadas no tratamento de inúmeras patologias que incluem desde transtornos brandos até severos. As proteínas podem exercer inúmeras funções como catalisar reações e funcionar como componente estrutural. A capacidade de produzir proteínas funcionais em quantidades suficientes é essencial na manutenção de funções vitais. Por serem em sua maioria moléculas muito grandes e complexas não é possível obtê-las pela tradicional síntese química e a extração de fontes naturais não é um processo trivial para obter o produto em quantidade suficiente para uma escala comercial.

O tratamento terapêutico com proteínas se tornou uma possibilidade através do desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante. Esta tecnologia consiste na aplicação de técnicas de engenharia genética para a manipulação do DNA de organismos vivos (eucariotos e procariotos) para que estes produzam a proteína de interesse.

A primeira etapa é a identificação de uma sequência de DNA que codifica o produto de interesse. Essa sequência é isolada, amplificada e inserida em um vetor de expressão para então uma célula hospedeira ser transfectada (termo utilizado para inserção do DNA recombinante em células animais) ou transformada (inserção do DNA recombinante em bactérias, células eucarióticas não animais ou plantas). Essa etapa pode ser realizada tanto a partir de DNA genômico, quanto a partir de RNA mensageiro. (Augusto et al., 2008).

A sequência obtida a partir de DNA genômico contém sequências não codificantes, os íntrons, e codificantes, os éxons. Possui também elementos responsáveis pela sinalização e regulação da tradução da proteína. O tamanho da sequência proveniente do DNA genômico pode dificultar a manipulação e reduzir a eficiência de transfecção do vetor. A sequência obtida a partir do RNA mensageiro, denominada de DNA complementar (cDNA) é mais curta e é considerada madura por conter apenas éxons. A sequência de cDNA que corresponde ao RNA mensageiro é obtida pela ação da enzima transcriptase reversa. As sequências reguladoras podem ser escolhidas considerando o hospedeiro que irá incorporar esse vetor.

O vetor é o veículo utilizado para inserir a sequência de DNA na célula hospedeira escolhida. O êxito dessa etapa depende da região em que o material se integra ao genoma, que na maioria das vezes ocorre de forma aleatória, mas também pode ser feita por integração sítio-dirigida. As células transfectadas com sucesso (transfectoma) passam então a produzir a proteína de interesse (Augusto et al., 2008). Caso o gene se integre em uma região de alta expressão, a produção ocorre em grandes quantidades, ou a transfecção pode não ser eficiente se houver silenciamento genético, por exemplo, devido à metilação. O procedimento, quando bem-sucedido, garante que a proteína seja produzida de forma espontânea como produto do seu metabolismo. A seleção deste clone é uma das tarefas mais difíceis e demoradas da elaboração de um biofármaco inovador, o genoma da célula deve ser estável e a proteína alvo deve ser produzida em concentração suficiente.

A escolha da célula hospedeira é de vital importância para produção de proteínas recombinantes. Cada célula irá fornecer características que serão favoráveis ou desfavoráveis de acordo com a natureza da proteína de interesse. A insulina humana, primeira proteína recombinante humana comercializada (1982), foi produzida em células de enterobactéria *Escherichia coli*. O fato de a insulina ser uma proteína simples, sem modificações pós-traducionais complexas (ex. glicosilação, sulfatação, carboxilação, etc.), permitiu que fosse utilizada a *E. coli*, que possui como vantagens uma alta taxa de crescimento e uma genética bem caracterizada (Paik et al., 2012). Na sequência, uma série de outras proteínas recombinantes derivadas de bactérias e leveduras foi aprovada. Os produtos desenvolvidos nessas linhagens são principalmente hormônios, interferons e interleucinas. Os hibridomas, obtidos a partir da fusão de linfócitos B e células de mieloma, se estabeleceram como plataforma para produção de

anticorpos monoclonais, pois combinam a alta capacidade de replicação de mielomas com a capacidade de produção de anticorpos dos linfócitos B. Alguns outros produtos são produzidos em células vegetais como a glucocerebrosidase (GBA), a partir de células da raiz da cenoura. No caso específico da GBA, a grande vantagem do uso de células vegetais é a possibilidade de produção de glicoproteínas ricas em resíduos de manose (fundamental para a atividade da molécula), o que não ocorre em células de mamífero. No sistema de mamíferos, as isoformas de GBA produzidas são ricas em ácido siálico, de modo que é necessário realizar uma remoção sequencial destes resíduos (Shaaltiel et al., 2007).

Desde 1995, a tendência é a utilização de células de mamíferos como sistema de expressão devido principalmente à complexidade dos produtos, que apresentam diversas modificações pós-traducionais que somente podem ser realizadas por organismos eucarióticos (Meleady et al., 2011). Comparando com microorganismos, as células animais possuem algumas desvantagens para produção em grande escala, como: são células mais frágeis, menos resistentes às forças de cisalhamento, são mais exigentes em relação à composição do meio de cultivo e à manutenção de determinadas condições de cultivo. Além disso, apresentam crescimento mais lento (tempo de duplicação de aproximadamente 24 horas). As células aderentes ainda dependem da área superficial do suporte utilizado. Alternativamente, podem ser adaptadas ao crescimento em suspensão ou podem ser usados microcarregadores. Processos de cultivo baseados em células animais exigem um altíssimo controle das condições assépticas durante sua manipulação, o que aumenta consideravelmente o custo associado ao produto.

A linhagem CHO-K1 (células de ovário de hamster chinês) foi uma das primeiras linhagens desenvolvidas com sucesso, especificamente para produção de proteínas recombinantes. As células CHO são o tipo de célula mais utilizado na indústria (Figura 1), principalmente pela facilidade de adaptá-las ao cultivo em suspensão e por apresentar um padrão de glicosilação similar ao humano. Adicionalmente, são consideradas seguras visto que poucos vírus humanos são capazes de se propagar em células CHO. As células BHK (células de rim de hamster neonato) geralmente são utilizadas para propagação de vírus e para produção de vacinas. Consistem em fibroblastos de natureza aderente que podem ser adaptados ao cultivo em suspensão. Células HEK (células de rim de embrião humano) também podem ser adaptadas ao

crescimento em suspensão, são altamente transfectáveis e apresentam padrão correto de modificações pós-traducionais (Augusto et al., 2008).

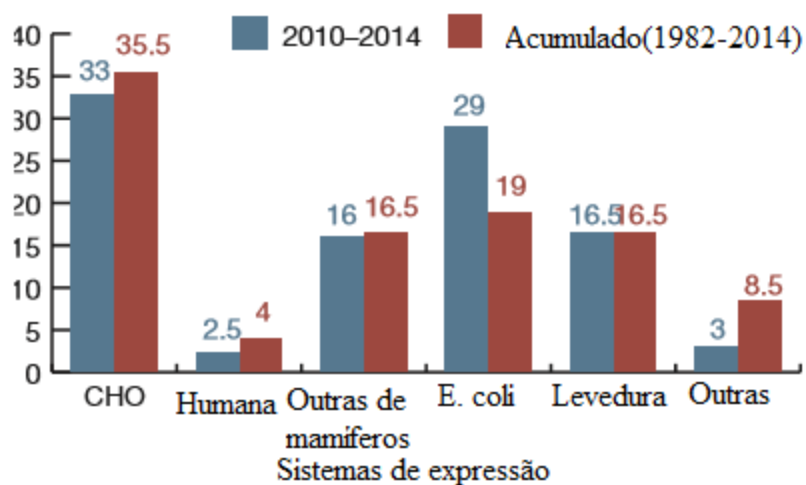


Figura 1 Porcentagem de produtos aprovados em relação ao total de produtos aprovados produzidos nos principais sistemas de expressão. (Adaptado de Walsh et al, 2014).

Após o estabelecimento da linhagem celular é necessário confeccionar os bancos de células, que devem ser homogêneos e caracterizados quanto à autenticidade, ausência de contaminações e estabilidade.

Os bancos de células são projetados com o objetivo de garantir uma fonte suficiente de células equivalentes para produção durante um período de tempo estimado. Para isso, devem ser criados bancos mestres e de trabalho, os quais são armazenados em recipientes próprios em nitrogênio líquido. O banco mestre é formado pelas células originais, transformadas com o vetor de expressão. O banco de trabalho é formado a partir do banco de células mestre e é usado para iniciar a cultura de células na produção.

3.2 Biossimilares

Como todos os produtos farmacêuticos, os biofármacos são protegidos por patentes e, a partir do fim do período legal estabelecido, é possível comercializar um produto desenvolvido em semelhança ao original que pode ser considerado clinicamente equivalente. Porém, ao contrário dos medicamentos de síntese química, que podem ser replicados e reproduzidos nas mesmas condições, produtos biológicos dependem de inúmeras reações e vias metabólicas reguladas por mecanismos intracelulares que ainda

não foram completamente elucidados. O princípio ativo do medicamento biológico, portanto não pode ser considerado idêntico ou classificado como genérico, para isso utiliza-se o termo biossimilar.

Para a aprovação no mercado de acordo com o guia da Organização Mundial de Saúde (OMS) um biossimilar somente pode ser aceito após demonstração do exercício de comparação biológica com o produto original e comprovação clínica. A comercialização de produtos biossimilares, sem a realização de estudos clínicos de qualidade, representaria uma ameaça aos pacientes uma vez que a segurança e eficácia podem ser prejudicadas por pequenas alterações nas condições de cultivo. Vários fatores podem influenciar em variações nos medicamentos biológicos. Alguns fatores como a seleção da linhagem celular, alterações na temperatura ou nas condições de pH, modo de conservação do produto nas várias etapas, formulação do produto são determinantes para alcançar alta atividade específica. O produto precisa apresentar características moleculares, atributos de qualidade e de comparabilidade iguais ou superiores aos do medicamento de referência para garantir sua biossimilaridade.

Alguns dos biossimilares aprovados foram desenvolvidos a partir de linhagens de células hospedeiras diferentes, outros apresentam níveis de impurezas e grau de glicosilação distintos, muitos adotaram diferentes excipientes para formulação (Schellekens & Moors, 2010). A Tabela 1 a seguir lista os biossimilares e os fármacos de referência aprovados pelo EMA (*European Medicines Agency*). Essas modificações, apesar de apresentarem teoricamente um possível risco em relação à eficácia e segurança, não foram significativas como demonstrado por testes clínicos.

Tabela 1 Diferenças entre biossimilares e os fármacos de referência aprovados pelo EMEA (adaptado de Huub Schellekens & Ellen Moors, 2010).

Células hospedeiras	Graus de impureza	Formulações	Níveis de glicosilação
Valtropin e Humatrope	Abseamed, Binocrit e Eprex	Retacrit, Silap e Eprex	Abseamed, Binocrit, Epoetin alfa Hexal e Eprex
	Zarzio, Filgrastim Hexal e Neupogen	Biograstim, Filgrastim, Ratiopharm, Tevagrastim e Neupogen	Retacrit, Silap e Eprex
		Zarzio, Filgrastim e Neupogen	

O registro de um novo produto exige que sejam apresentados os relatórios de estudos pré-clínicos e clínicos para confirmação de sua eficácia para o uso proposto. Nos estudos pré-clínicos são feitas experimentações *in vitro* para avaliar o potencial terapêutico do produto, seguidas de estudos *in vivo* (em animais) levando-se em consideração a especificidade da espécie. O objetivo é demonstrar suficiente atividade biológica, avaliar se o perfil de toxicidade e atividade mutagênica está dentro dos padrões. Usualmente 90% ou mais das substâncias estudadas nesta fase não são aprovadas para passar aos estudos clínicos (Reis, et al, 2009).

Na Fase I dos estudos clínicos um pequeno grupo de voluntários saudáveis é submetido ao tratamento e são avaliados o perfil farmacocinético e os efeitos farmacodinâmicos. A Fase II é considerada um estudo terapêutico “piloto” na qual pacientes são avaliados para estabelecer os benefícios e as relações dose-resposta. São demonstradas as vantagens terapêuticas e estabelecidas as indicações, a dosagem e via de administração assim como contraindicações, nessa etapa os pacientes podem receber o fármaco ou o placebo. Na Fase III populações de pacientes em múltiplos centros recebem o fármaco e define-se o perfil das reações adversas mais frequentes e o perfil de interações clinicamente relevantes. O objetivo é confirmar a segurança e demonstrar a eficácia. A Fase IV é realizada, após aprovação de comercialização do produto, para confirmar a segurança em longo prazo e detectar eventos adversos pouco frequentes ou não esperados.

A União Européia foi pioneira no estabelecimento dos documentos de orientação, em 2004, para regular o caminho dos biossimilares até o mercado, estabelecendo também as vantagens garantidas aos detentores das patentes. A agência EMA e o comitê científico *Medicinal Products for Human Use* (CHMP) estabeleceram de forma detalhada as principais exigências para aprovação (Schellekens & Moors, 2010).

Atualmente, o cenário regulatório sobre biossimilares ainda não está completamente estabelecido e muitos países ainda estão definindo suas diretrizes e legislação. Porém, pode-se afirmar que, de uma forma geral, caminha-se no sentido de adotar um tratamento diferenciado para cada classe de produto. É necessária uma abordagem caso a caso em relação ao exercício de comparabilidade, cujos resultados definirão a quantidade de dados e estudos clínicos e não clínicos (Peres, Padilha, & Quental, 2012).

No Brasil, a expiração dos prazos das patentes destes produtos representa uma oportunidade para a produção nacional desses medicamentos. O domínio da tecnologia resulta em uma vantagem competitiva do ponto de vista econômico tanto para os fabricantes quanto para pacientes e para o Governo Federal.

3.3 Hemofilia A

A hemofilia A é uma doença genética e hereditária, que apresenta padrão recessivo e está ligada a mutações no cromossomo X logo afeta quase exclusivamente homens como mostrado na Figura 2. É caracterizada por deficiências quantitativas ou qualitativas do FVIII da coagulação sanguínea e acomete aproximadamente 1 a cada 10.000 nascimentos masculinos (Srivastava et al., 2013). Estima-se que hoje mais de 304 mil pessoas sejam diagnosticadas com algum tipo de distúrbio da coagulação, sendo 151 mil pessoas diagnosticadas com Hemofilia A.

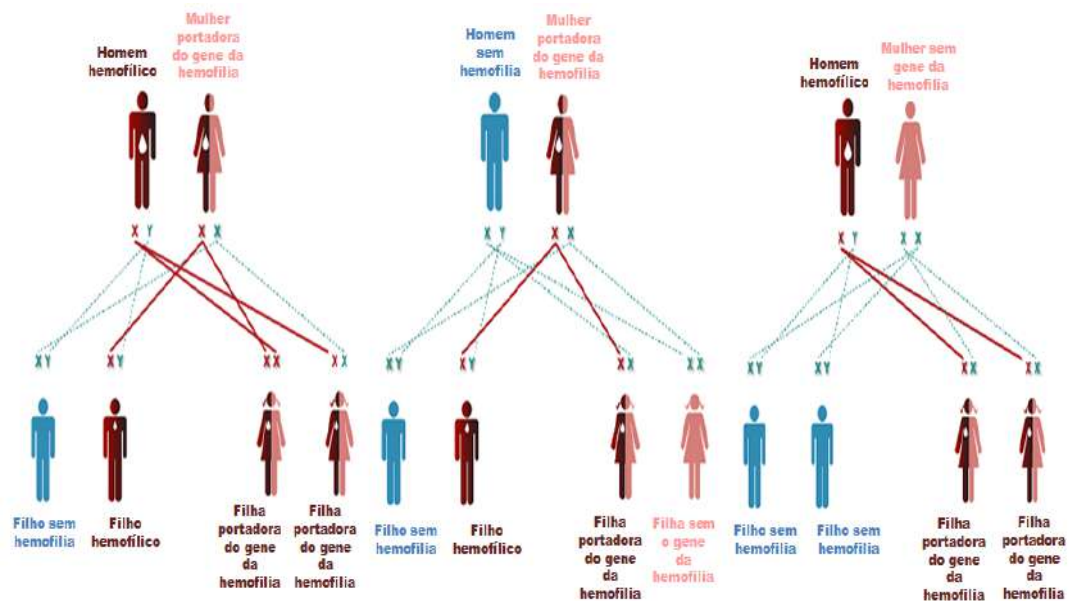


Figura 2 Transmissão do gene da Hemofilia (Unidos pela Hemofilia - Como surge a hemofilia).

Pacientes com Hemofilia A podem sofrer sangramentos recorrentes e prolongados principalmente em articulações e músculos, de forma espontânea, por trauma ou intervenção cirúrgica. Com a reincidência de hemorragias intra-articulares, desenvolve-se a artropatia hemofílica (Arnold & Hiltgartner, 1977). A severidade da Hemofilia A pode ser classificada por diagnóstico clínico ou em função da atividade do FVIII no plasma, sendo considerada grave se for inferior a 0,01 UI/ml (aproximadamente 50% dos casos), moderada se a atividade se encontra entre 0,01 e

0,05 UI/ml (cerca de 10% dos indivíduos) ou branda se a atividade for superior a 0,05 UI/ml e inferior a 0,4 UI/ml (30%-40% dos casos) (Antonarakis et al., 1995). O diagnóstico preciso é essencial para determinar o tratamento que deve ser adotado.

Até a década de 60 o único tratamento disponível para pessoas com hemofilia grave era a transfusão sanguínea. Com o passar dos anos, novas tecnologias foram desenvolvidas até o isolamento de fatores de coagulação derivados do plasma humano, que transformaram a qualidade de vida e aumentaram a longevidade dos hemofílicos. Porém, a segurança da terapia de reposição de fatores da coagulação passou a ser questionada quando houve aumento do número de casos de hemofílicos infectados pelo vírus de hepatite B, hepatite C e vírus da imunodeficiência humana (HIV) na década de 80 no Brasil. Até que caracterizassem o vírus e seu mecanismo de infecção para que fosse desenvolvida uma forma de eliminá-lo dos bancos de sangue, uma epidemia de HIV se estabeleceu entre os indivíduos com hemofilia, levando muitos dos pacientes à óbito. Posteriormente, com o estabelecimento da técnica para identificação do vírus, as doações de sangue passaram a ser testadas para os principais tipos de vírus e destruídas quando contaminadas. Hoje há técnicas para remoção e inativação viral, porém, não é possível garantir a segurança em relação a novos tipos de vírus que possam surgir. Segundo a Federação Brasileira de Hemofilia estima-se que a expectativa de vida para pessoas com hemofilia hoje, desde que convenientemente tratadas, seja em média 10 anos menor do que a expectativa de vida de pessoas sem qualquer coagulopatia. Os fatores sanguíneos desenvolvidos a partir da tecnologia do DNA recombinante sem adição de componentes derivados do plasma de animais ou humanos podem ser considerados mais seguros para o tratamento da hemofilia (Evatt, 2006).

A terapia de reposição de fatores para a hemofilia A usada para a profilaxia é atualmente o tratamento mais eficaz para prevenir os principais sintomas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. O tratamento profilático consiste em injeções intravenosas de FVIII, uma vez a cada dois ou três dias, devido à sua baixa estabilidade. O concentrado de FVIII utilizado pode ser derivado do plasma ou de origem recombinante (FVIIIr). O FVIIIr é comercializado como um pó liofilizado que deve ser reconstituído com água para injetáveis no momento desejado para infusão. A prevenção da artropatia hemofílica pode ser alcançada iniciando o tratamento profilático, logo após o primeiro sangramento articular antes do segundo ano de vida do paciente.

O desenvolvimento de inibidores contra o FVIII é a complicação mais severa verificada durante o tratamento da hemofilia, ocorre em aproximadamente 25% dos indivíduos com hemofilia A grave, 15% dos pacientes com hemofilia A moderada e 5% dos pacientes com hemofilia A branda (Moreau et al., 2000). Acredita-se que a probabilidade de desenvolver inibidores está relacionada a diversos fatores como: ao tipo de mutação (característica de cada paciente), a etnicidade, a intensidade e a duração do tratamento com o FVIII, e ao tipo de FVIII (recombinante ou derivado do plasma). Porém, estudos experimentais não apresentaram evidências de uma maior incidência de resposta imune ao FVIIIr como era suposto (Franchini, 2010).

Inibidores também podem ser desenvolvidos em indivíduos que não apresentam a desordem genética característica da hemofilia A no cromossomo X. A hemofilia adquirida é uma doença hemorrágica rara em que os indivíduos desenvolvem auto-anticorpos que neutralizam o FVIII humano circulante, criando uma insuficiência de FVIII disponível. O medicamento Obizur foi desenvolvido especificamente para o tratamento dessa doença (Lillicrap et al., 2016).

3.4 Coagulação sanguínea

A coagulação sanguínea é o mecanismo responsável por evitar a perda excessiva de sangue por lesão endotelial, depende de uma série de reações reguladas entre si para a manutenção da hemostasia. O funcionamento desse complexo sistema depende de plaquetas, anticoagulantes naturais, proteínas da coagulação, e o sistema de fibrinólise. As proteínas da coagulação (fatores e cofatores), identificadas por algarismos romanos, são em sua maioria enzimas.

Em indivíduos saudáveis, quando um vaso é lesionado e o sangue extravasa para o tecido conjuntivo, o vaso se contrai diminuindo a circulação local simultaneamente, plaquetas migram para a região afetada aderindo ao endotélio dos vasos formando um tampão local (Figura 3). Os fatores de coagulação então atuam, fortalecendo o tampão pela formação da rede de fibrina. Já em um portador da hemofilia a sequência estabelecida pelos fatores de coagulação é interrompida sendo a formação da rede de fibrina comprometida (Franco, 2001).

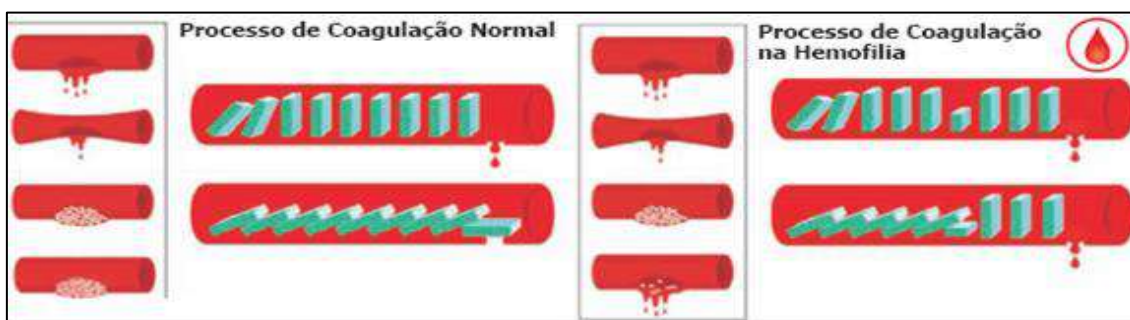


Figura 3 Esquema representativo do processo de coagulação em indivíduos saudáveis e em hemofílicos (Federação Mundial de Hemofilia, A Hemofilia em imagens, 2004).

O modelo mais recentemente proposto (Figura 4) é baseado em superfícies celulares, no qual a hemostasia requer substâncias procoagulantes ativadas que permaneçam localizadas no sítio da lesão para a formação de tampão plaquetário e de fibrina. Resumidamente, o processo coagulação pode ser dividido nas fases de iniciação, amplificação, propagação e finalização. A fase de iniciação ocorre pela exposição do fator tecidual (FT), que está presente nas membranas das células ao redor do leito vascular, interagindo com o fator VII ativado derivado do plasma. A amplificação engloba a ativação das plaquetas, cofatores V, VIII e XI pela trombina. Na propagação é produzida uma grande quantidade de trombina, permitindo a formação de um tampão estável no sítio da lesão interrompendo a perda de sangue. A finalização limita a coagulação evitando a oclusão trombótica das áreas íntegras (Figura 5) (Ferreira et al., 2010).

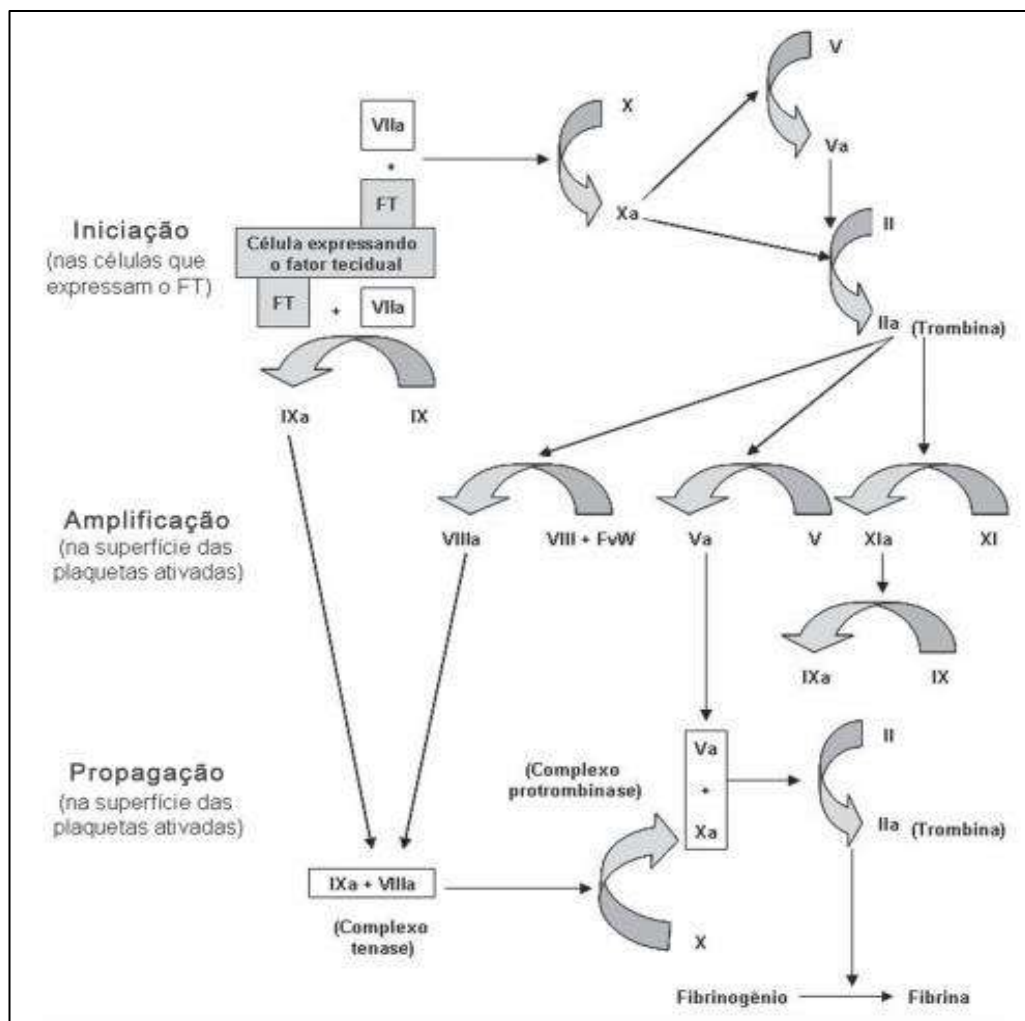


Figura 4 Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares (Ferreira, Sousa, Dusse, & Carvalho, 2010).

3.5 Fator VIII

O FVIII é uma glicoproteína que circula na corrente sanguínea associada ao fator de von Willebrand, um multímero que protege sítios alvos da inativação ou degradação proteolítica da molécula de FVIII. O FVIII na corrente sanguínea apresenta um tempo de meia vida curto que varia entre 15 horas a 19 horas (Vehar et al., 1984).

O gene correspondente ao FVIII é constituído por 26 exons e 25 introns. A cadeia polipeptídica madura, formada por 2332 aminoácidos, é sintetizada como uma cadeia única e posteriormente clivada, gerando uma cadeia leve (80 kDa) e uma cadeia pesada (90 a 210 kDa), que permanecem associadas por interações hidrofóbicas e interação com íons metálicos. A dissociação entre as cadeias leva à perda da atividade.

A conformação primária dessa proteína é dividida em três principais domínios: A, B, C, como pode ser observado na Figura 5. Essas regiões permanecem intercaladas na forma A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2. No domínio A3 se encontra o principal sítio responsável pela associação do fator VIII com o fator de Von Willebrand. A função do domínio B ainda não é completamente elucidada, sabe-se que pode estar relacionada a taxa de secreção e correto enovelamento da proteína mas não é diretamente necessário para a atividade do FVIII (Pipe, 2009)(Oldenburg, Ananyeva, & Saenko, 2004).

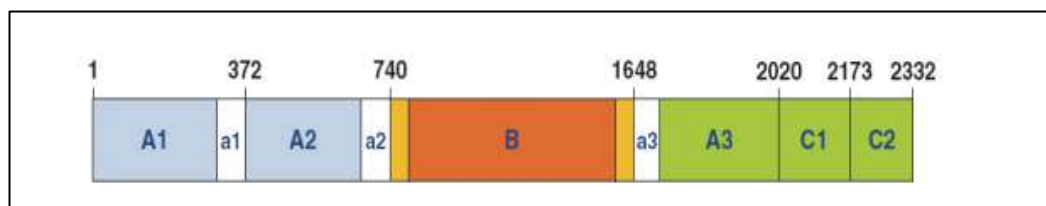


Figura 5 Esquema da estrutura primária do FVIII de cadeia completa (Reproduzido de THIM et al., 2010).

3.6 Conceitos de plantas de produção de biofármacos

A produção de biofármacos, assim como de fármacos sintéticos, está sujeita à aprovação das agências reguladoras para obter licença para comercialização. No Brasil os produtos são regulados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que segue as normas internacionais estabelecidas nos maiores mercados farmacêuticos do mundo pelas principais autoridades, que são:

- FDA (*Food and Drug Administration*, Estados Unidos)
- EMA (*European Medicines Agency*, União Européia)
- OMS (Organização Mundial da Saúde)
- ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*)

As autoridades estão encarregadas de fazer inspeções regulares às plantas e verificar se os padrões descritos nos manuais de Boas Práticas de Fabricação (BPF) ou *Good Manufacturing Practices* (GMP) são seguidos rigorosamente. O objetivo é garantir a segurança, a qualidade e eficácia durante todo processo produtivo. Além dos conceitos genéricos aplicáveis a qualquer fármaco, a indústria biofarmacêutica conta com orientações específicas anexadas aos manuais. A produção de fatores de coagulação, por exemplo, deve obedecer às normas contidas no capítulo “Produção de Produtos Derivados de Sangue e Plasma Humano” ou “Produtos Biológicos para Uso

Humano” da RDC 17/2010, que normatiza sobre as BPF. Para que os produtos desenvolvidos com tecnologia do DNA recombinante possam ser considerados consistentes e bem caracterizados, o processo de produção precisa ser robusto e reprodutível, devem ser utilizadas técnicas validadas e os lotes devem ser uniformes.

Principalmente os fármacos administrados por via parenteral, que não passam por alguns dos mecanismos de defesa do corpo, precisam ser produzidos sob condições de assepsia rigorosas. As agências reguladoras também legislam sobre as instalações e principais espaços da unidade fabril, pois são as instalações que irão contribuir para o atendimento às BPF. As áreas que abrigam o processo de produção são necessariamente controladas para proteger o produto de contaminações. O piso, as paredes e teto devem receber um tratamento que garanta que a superfície não seja porosa, não descame e seja fácil de limpar. Drenos do chão, fontes de contaminação em potencial, devem ser isolados. Os resíduos biológicos líquidos devem ser canalizados e armazenados em tanques para posterior descontaminação/inativação, por exemplo, podem ser usados sistemas isolados de drenos à vácuo com esterilização da tubulação com vapor industrial. Unidades de tratamento de descarte devem ser projetadas para recuperar ou tratar resíduos previamente separados de acordo com o risco que oferecem utilizando métodos químicos ou térmicos. O destino de efluentes sólidos, líquidos ou gasosos, precisa estar documentado de acordo com as normas ou legislações que regulem o controle da poluição do meio ambiente. O fluxo de descarte de materiais sólidos que tiveram contato com material biológico deve ser bem estabelecido na área de produção, passando por uma descontaminação térmica antes de sair da sala onde o material biológico foi processado, por exemplo, utilizando-se uma autoclave de dupla porta. As áreas de manipulação de organismos ativos devem sofrer procedimento de limpeza e descontaminação com periodicidade definida ou a cada troca de campanha. Geralmente, utiliza-se vaporização de peróxido de hidrogênio neste procedimento. A transferência de materiais de um ambiente com organismo ativo para um ambiente não ativo pode ser realizada por caixas de passagem com esterilização por peróxido de hidrogênio. Todos o fluxo de equipamentos envolvidos em processos de descontaminação de uma área de produção de biofármacos precisam ser bem planejados para atendimento às normas de BPF e de biossegurança segundo a resolução RDC nº57. O nível de biossegurança requerido para o organismo manipulado irá determinar a necessidade de inclusão de certos equipamentos, como cabines de segurança biológica de diferentes classes. Por

exemplo, de acordo com a Lei federal de biossegurança nº 11.105/2005, para o nível 2 de biossegurança (NB2) é obrigatória a utilização de uma cabine de segurança biológica classe I ou II em casos que há formação de aerossóis. A manipulação de células animais em grande escala é considerada dentro do nível 2 de biossegurança (Augusto et al., 2008).

A seção 2.1.1 da norma ISO 14644-1 define sala limpa como o local no qual a concentração de partículas, a temperatura, pressão e umidade são necessariamente controladas. Também é especificado que a sala limpa deve ser construída e utilizada de forma a minimizar a entrada, a geração e retenção de partículas.

Essas áreas podem ser divididas e classificadas em função do grau de exigência da pureza do ar, do número de partículas e microrganismos viáveis presentes por unidade de volume de ar. Para atender aos limites estabelecidos são necessários filtros de ar de alta eficiência HEPA (*high efficiency particulate air filter*), filtros esterilizantes, sistemas de circulação de ar, antecâmaras com sistema de intertravamento e sistema de controle de pressão. O planejamento das pressões das áreas produtivas depende do objetivo de cada área e também é influenciada pela classificação das áreas adjacentes. Por exemplo, uma área de cultivo de organismos geneticamente modificado (OGM) deve possuir pressão negativa para conter o OGM dentro da sala, já uma área de purificação a lógica é inversa, precisa de pressão positiva para minimizar o risco de entrada de contaminantes na área e assim preservar o produto (Lesnik, 1997).

Atualmente, na indústria farmacêutica, a classificação mundialmente mais utilizada de salas limpas está contida na parte 1 da norma ISO 14644 que especifica as classes 5, 6, 7, 8. As classes 5 e 6 são respectivamente equivalentes no padrão norte americano às classes 100 e 1.000. No padrão europeu, a classe 5 e 6 correspondem às classes A e B, respectivamente. As classes 7 e 8 são respectivamente equivalentes no padrão norte americano às classes 10.000 e 100.000 e no padrão europeu às classes C e D. O grau de exigência das salas deve acompanhar os níveis de pureza do produto até a classe 5. A transferência entre áreas de classificação diferente sempre deve ser precedida por uma antecâmara com o grau de classificação mais rigoroso e não é permitido passar de uma área grau D direto para uma área grau B sem passar por uma antecâmara grau C. A classificação ideal irá depender do tipo de processo e o usuário deve avaliar com critério qual nível de classificação é necessário para realizar cada operação do processo, pois o impacto financeiro no projeto é alto (Del Valle, 2004). A

Tabela 2 mostra as diferentes classificações utilizadas pelas principais normas regulatórias.

Tabela 2 Diferentes classificações de salas limpas (Alici & Blomberg, 2010).

Classificação das salas limpas			
Classes ISO	Máximo de partículas (de diâmetro maior ou igual a 0,5µm) /m ³	Equivalência a classe ISSO	
		Norma US	Norma Européia
Classe 5	3,52	100	A
Classe 6	35,20	1.000	B
Classe 7	352,00	10.000	C
Classe 8	3520,00	100.000	D

O projeto de uma planta industrial para produção de biofármacos também deve considerar áreas classificadas de suporte, como as salas de preparo de meio de cultivo (recomenda-se ser de classe D), as salas de lavagem e preparo de materiais limpos (recomenda-se que sejam no mínimo classe D) e as áreas de preparo de soluções para a purificação (classe C). Além disso, câmaras frias (2 a 8°C) classificadas devem ser projetadas quando o produto a ser processado for termicamente instável (Lesnik, 1997).

Todos os profissionais que utilizam essas áreas precisam ser treinados para realizar os procedimentos padrão antes de entrar e após sair de salas limpas para que sejam mantidas em boas condições. O fluxo de pessoas entre áreas de classificação diferente deve ocorrer de forma unidirecional evitando que possíveis contaminantes sejam levados de uma sala de classificação inferior para outra de maior controle. O transporte de pequenos equipamentos e outros utensílios pode ser realizado através de caixas de passagem localizadas nas paredes.

As unidades responsáveis pela geração de utilidades sujas (vapor industrial, água gelada, ar comprimido industrial, geração de vácuo para drenos) e utilidades limpas (água purificada, água para injetáveis, vapor puro e gases de processo) devem estar localizadas em áreas não classificadas isoladas das áreas classificadas (área técnica) e ser constantemente monitoradas, devendo ser adotadas ações corretivas quando estiverem fora dos limites especificados. As áreas técnicas devem ser projetadas de forma que a manutenção dos equipamentos não interfira nas atividades das áreas classificadas. No armazenamento, a área de recepção de materiais deve ser separada da área de armazenamento de materiais em uso e dos produtos prontos para a expedição, o

estoque deve ser ordenado nas várias categorias de materiais, tais como matérias-primas, materiais de embalagem, intermediários e insumos farmacêuticos ativos, nas condições de quarentena, aprovado, reprovado, devolvido ou recolhido. As áreas de armazenamento devem ser projetadas de forma que assegurem condições ideais de estocagem, não permitindo a contaminação cruzada e ambiental usualmente deve-se manter baixas temperaturas que variam de 4°C a -70°C. O laboratório de controle de qualidade como estabelecido pela Resolução da ANVISA nº 69 (Art. 45) deve estar preferencialmente separado das áreas de produção. Quando localizadas nas áreas produtivas é preciso garantir que as operações não afetem adversamente a exatidão das medidas.

A qualidade da água empregada na produção de biofármacos pode variar desde água abrandada, utilizada para operações de resfriamento, passando por água purificada (AP), até água para injetáveis (API). A qualidade da água deve ser incrementada de forma gradativa acompanhando as etapas de produção considerando a capacidade de remoção de possíveis contaminantes pelas etapas posteriores. A produção de água para injetáveis pode ser realizada a partir de um sistema de destilação ou múltiplas etapas de osmose reversa e deve ser mantida acima de 80°C. Para a descontaminação térmica ou esterilização de equipamentos que entram em contato com o produto, o vapor necessário é obtido em destilador a partir de água ultrapura (Lesnik, 1997).

Sistemas descartáveis de uso único (tecnologia *single-use*) vêm se consolidando na indústria biofarmacêutica por permitir, eliminação das etapas de *cleaning in place* (CIP) e *sterilization in place* (SIP), reduzindo custos operacionais de lavagem e esterilização, e o custo de implementação de utilidades. O processo de limpeza entre corridas dos tanques, biorreatores e de todos os equipamentos que entram em contato com o produto é minucioso e precisa ser documentado e atestado de acordo com as boas práticas de fabricação. Os sistemas compostos por equipamentos *single-use* tornam o processo mais flexível permitindo diferentes arranjos operacionais e diminuem a incidência de contaminação. Já foi demonstrado que a operação com esses sistemas pode reduzir o custo de capital de 40 a 50%, operacional de 20 a 30% e reduzir o tempo de construção em 30%, quando comparado a equipamentos tradicionais em aço inoxidável (Subramanian, 2015).

Já estão disponíveis no mercado bolsas plásticas que podem ser utilizadas tanto para estoque de meio de cultivo, solução tampão e meio recolhido, quanto como

biorreatores descartáveis. O primeiro biorreator de larga-escala *single-use* desenvolvido foi o Wave, projetado como uma bolsa descartável sobre uma base em movimento de balanço que proporciona mistura e transferência de gás para o crescimento celular. Mais recentemente biorreatores descartáveis do tipo tanque agitado de até 2.000L foram desenvolvidos, cujo sistema é composto por uma bolsa plástica acomodada por um vaso suporte de aço. Hoje é possível realizar quase todas as etapas do processo utilizando módulos desenvolvidos somente com tecnologia *single-use*. Essa tendência acompanha a necessidade de diminuir o custo de operação para manter a margem de lucro com o surgimento de novos produtos competitivos. Contudo, uma análise crítica de todas as etapas do processo deve ser realizada para certificar que a opção *single use* é a mais econômica. Por exemplo, as resinas pré-empacotadas e as membranas cromatográficas ainda possuem um custo elevado, sendo necessária a reutilização destes materiais.

Todos os conceitos descritos acima são de extrema importância para o planejamento da construção de uma planta industrial para produção de biofármacos. Contudo, neste trabalho somente serão projetados os equipamentos para o processo de produção do FVIII em escala suficiente para atender à demanda brasileira.

3.7 Processos de Produção do Fator VIII Recombinante

O desenvolvimento de um processo de produção de biofármacos, incluindo o FVIIIr, é realizado em quatro etapas principais. A primeira etapa é definida como o desenvolvimento da linhagem produtora, que deve ser estável e altamente produtiva. A segunda etapa consiste no cultivo das células em biorreatores em meios de cultivo quimicamente definidos e obtenção do sobrenadante. A terceira etapa consiste na purificação da proteína de interesse que geralmente é feita em diversas colunas cromatográficas garantindo o produto puro e livre de contaminantes críticos, como proteínas da célula hospedeira, DNA residual da célula hospedeira e partículas virais. A quarta etapa inclui a formulação, o processamento final (envase, liofilização, rotulagem e embalagem) e caracterização do produto final (Mellstedt, Niederwieser, & Ludwig, 2008).

Existem atualmente 12 produtos comerciais disponíveis baseados no FVIIIr: Kogenate FS, Kovaltry, ReFacto, Recombinate, Novoeight, Nuwiq, Eloctate, Adynovate, Xyntha, Advate, Obizur e Afstyla, como pode ser observado na Tabela 3. Os produtos diferem entre si em função da linhagem celular utilizada como hospedeira,

de alguma modificação da molécula, etapa do processo produtivo, ou excipiente utilizado na formulação.

Tabela 3 Diferentes produtos aprovados para comercialização baseados em FVIII.

Produto	Nome comercial	Fabricante
FVIIIr Anti-Hemofílico	Kogenate FS	Bayer Corp
	KOVALTRY	Bayer HealthCare LLC
	ReFacto	Genetics Institute, Inc
	Recombinate	Baxter Healthcare Corporation
	Novoeight	Novo Nordisk
	NUWIQ	Octapharma USA, Inc
FVIIIr Anti-Hemofílico Proteína de fusão-fc	ELOCTATE	Biogen Idec, Inc.
FVIIIr Anti-Hemofílico peguilado	ADYNOVATE	Baxalta US Inc.
FVIIIr Anti-Hemofílico livre de plasma/albumina	XYNTHA	Wyeth Pharmaceuticals, Inc
	Advate	Baxter Healthcare Corp
FVIIIr Anti-Hemofílico sequência porcina	OBIZUR	Baxter Healthcare Corporation
FVIIIr Anti-Hemofílico de cadeia única	AFSTYLA	CSL Behring, LLC

Os biofármacos podem ser divididos em quatro classificações: primeira, segunda, terceira e quarta geração. A classificação é feita em função da presença de proteínas humanas e animais na produção e na preparação final. O FVIIIr de primeira geração é produzido na presença de proteínas animais no meio de cultura e na etapa de formulação ocorre adição de albumina humana para estabilização. Produtos de segunda geração são produtos em que podem ser utilizadas proteínas animais nos meios de cultura para produção, mas na formulação a albumina humana é substituída por sacarose, trealose ou outro estabilizante. A diferença de estabilidade entre os diferentes produtos de FVIIIr sugere uma forte dependência dos excipientes utilizados que podem aumentar a estabilidade e o tempo de meia-vida. Produtos de terceira geração, por sua

vez, encontram-se completamente livres de proteínas animais tanto na formulação quanto no cultivo. Produtos de quarta geração estão associados aos termos *biobetter* e *biosuperior*, que apresentam maior eficácia e especificidade no endereçamento do princípio ativo. Os produtos são em maior parte proteínas que são peguiladas (associadas a moléculas de polietilenoglicol) ou associadas a carboidratos, albumina ou imunoglobulina, com o objetivo de alcançar maior estabilidade, atividade, reduzidos efeitos colaterais e menor imunogenicidade (Strohl, 2015).

Dentro do grupo de primeira geração podemos citar o Recombinate, o Kogenate e o Helixate, que são FVIIIr de cadeia completa. O primeiro produto a se tornar disponível no mercado foi o Recombinate, que começou a ser desenvolvido em 1984 e introduzido em testes clínicos em 1987. Produzido pela *Baxter Healthcare*, a partir de células CHO programadas para coexpressar o fator VIII e o fator de Von Willebrand. O cultivo foi realizado em batelada repetida, processo em que parte do meio com células e produto é recolhido e parte é reutilizado como inóculo da próxima batelada. O meio de cultivo utilizado era livre de soro, mas albumina humana era adicionada na formulação como excipiente. O produto foi aprovado pela FDA em 1992.

Os nomes comerciais Kogenate e Helixate utilizados pelas empresas Bayer Corp e CSL Behring representam o mesmo produto, o FVIIIr, octocog alfa. O processo de cultivo foi desenvolvido utilizando uma linhagem de células de rim de hamster chinês (BHK21) e meio de cultivo contendo insulina recombinante e albumina humana. O cultivo era realizado em um biorreator de 250 litros operado em perfusão durante 185 dias e o material coletado era purificado em 4 diferentes colunas cromatográficas e submetido a uma etapa de inativação viral, um procedimento até então inovador na produção do fator VIII (Boedeker, 2001).

O ReFacto, o KOGENATE Bayer ou Kogenate FS, Helixate FS e Helixate NexGen são exemplos de produtos de segunda geração. O produto Kogenate FS foi desenvolvido com base no Kogenate, porém proteínas animais foram substituídas por sacarose na formulação e a etapa de inativação viral foi realizada por solução solvente/detergente. O medicamento ReFacto corresponde a molécula de FVIII modificada pela deleção do domínio B e incorporação de um peptídeo de ligação (Boedeker, 2001). Essa modificação foi mantida em muitos dos produtos aprovados na sequência porque a redução da massa molecular diminui o gasto energético da célula favorecendo a expressão do produto. O domínio B é o maior domínio do FVIII que,

além de ser altamente glicosilado, possui muitos sítios de sulfatação da tirosina. A princípio esses sítios seriam essenciais para a interação entre o fator VIII e a trombina, porém moléculas com domínio B deletado não apresentaram redução da atividade (Fay, 1993).

O Advate, o Xyntha/ReFacto AF, Novoeight e Nuwiq são exemplos de produtos de terceira geração. O produto Advate foi desenvolvido a partir do processo de produção do Recombinate e utilizava trealose como estabilizante, porém, já foi substituído por uma versão melhorada e não é comercializado. O medicamento Xyntha/ReFacto AF foi desenvolvido a partir de melhorias no processo produtivo do ReFacto, como, por exemplo, a eliminação de todos os componentes animais e a introdução de uma etapa adicional de remoção viral por filtração. O Nuwiq foi o primeiro produto de FVIIIr de cadeia completa expresso em células HEK humanas aprovado na Europa e o processo o cultivo deste biofármaco foi desenvolvido em biorreatores de 100L em perfusão. O objetivo de utilizar células humanas é reduzir o potencial imunogênico dos produtos recombinantes. O medicamento Novoeight corresponde à molécula de FVIII com domínio B deletado, produzida a partir de células CHO em meio livre de proteínas animais e estabilizada pela adição de sacarose (Ezban, Vad, & Kjalke, 2014).

O Eloctate, o Adynovate, o Afstylá e o Kovaltry/Iblias são exemplos de produtos de quarta geração. O Eloctate produto da Biogen, aprovado em 2015, foi o primeiro produto de quarta geração desenvolvido. A proteína do FVIIIr, produzida em células HEK, foi fusionada ao domínio Fc da imunoglobulina humana G1 (IgG1). Essa apresentação foi baseada na ligação do domínio Fc com o receptor Fc neonatal para atrasar a degradação lisossomal aumentando o tempo de meia vida do FVIII na corrente sanguínea para 19 horas. O produto Eloctate foi o único desenvolvido utilizando um biorreator operado em batelada alimentada. O Adynovate, uma versão melhorada do Advate, consiste em uma molécula de cadeia completa do FVIII peguilado. O Afstylá é uma proteína de cadeia única que utiliza uma ligação covalente entre as cadeias leve e pesada (Figura 6), desenhada para aumentar a estabilidade e o tempo de meia vida do FVIII. O objetivo desse novo medicamento é obter um FVIII mais estável, logo com maior capacidade de se associar ao fator de von Willebrand. O FVIII quando associado ao fator de von Willebrand se torna menos suscetível a degradação, o que diminui a quantidade de moléculas não funcionais com potencial imunogênico (Schulte, 2011). O

Kovaltry corresponde à molécula do FVIII de cadeia completa associada à proteína do choque térmico HSP70. As proteínas do choque térmico são reconhecidas pela capacidade de auxiliar no enovelamento de proteínas, orientando a renaturação e prevenindo a agregação proteica no meio intracelular. A expressão das duas proteínas em conjunto pode aumentar o rendimento do processo e a garantir uma maior atividade específica do produto (Morfini & Zanon, 2016).

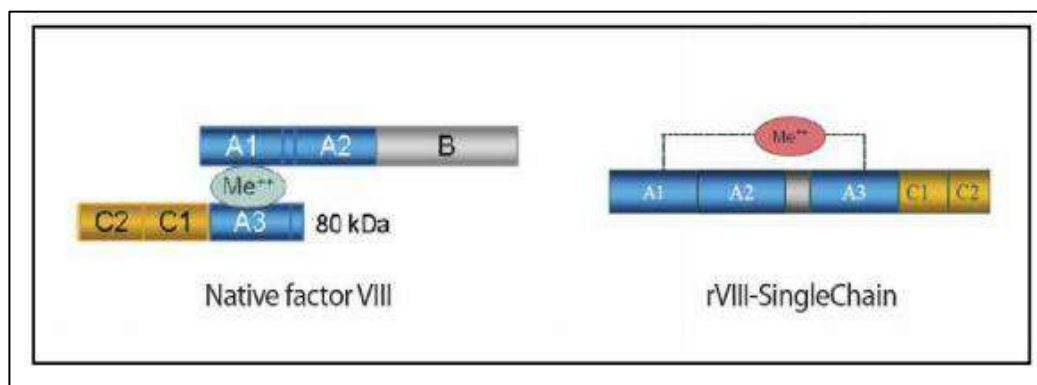


Figura 6 Representação esquemática da estrutura modificada do fator VIII pela ligação covalente. Princípio do medicamento Afstylá (referência).

O Obizur é um produto diferente dos demais por ser utilizado no tratamento de pacientes com hemofilia adquirida provocada por anticorpos para o FVIII. O medicamento (FVIIIr anti-hemofílico) é uma proteína purificada com 1448 aminoácidos baseada em uma sequência porcina com domínio B deletado. É produzido em células de rim de hamster neonato (BHK) por cultura em meios que contêm soro fetal bovino, mas está isento de produtos à base de soro humano e de proteínas humanas (Lillicrap et al., 2016).

Em relação à transmissão de agentes veiculados pelo sangue os concentrados de FVIIIr são altamente seguros, principalmente os produtos de terceira geração, que são livres de material biológico humano.

Nesse trabalho serão utilizadas informações de um processo em desenvolvimento no LECC para o dimensionamento dos equipamentos e análise da viabilidade econômica do processo de produção de um FVIIIr. Resumidamente, o trabalho consiste nas seguintes etapas: estimativa da demanda, dimensionamento dos equipamentos e análise de viabilidade técnico econômica.

4 Estimativa de Mercado

No Brasil, todos os hemofílicos têm direito ao acesso gratuito aos medicamentos e ao tratamento pelo SUS estabelecido a partir da Carta dos Direitos dos Usuários da Saúde. O documento visa garantir o acesso universal e igualitário às ações e serviços para a promoção, proteção e recuperação da saúde. Inclusive, a carta garante “o acesso à continuidade da atenção no domicílio, quando pertinente, com estímulo e orientação ao autocuidado que fortaleça sua autonomia, e a garantia de acompanhamento em qualquer serviço que for necessário” (pag 11- Art. 3º).

Portadores de hemofilia assistidos pelo SUS têm garantida a profilaxia primária e o tratamento sob demanda para hemofilia grave dos tipos A e B. Para ter acesso ao tratamento e receber o hemoderivado (FVIII para hemofilia A e FIX para hemofilia B), os pacientes precisam estar cadastrados em um dos Centros de Tratamento de Hemofilia (CTH), onde têm orientação e acompanhamento médico para a obtenção do medicamento de uso domiciliar. O paciente com hemofilia A grave tem direito a levar até 12 doses de fator de coagulação para seu domicílio para uso sob demanda. É um tratamento utilizado concomitantemente à profilaxia nos pacientes com hemofilia grave.

De acordo com a Federação Brasileira de Hemofilia em 2014 (data do último relatório publicado) existiam 21.066 pessoas diagnosticadas com alguma coagulopatia. Do total de pacientes, 9616 foram diagnosticados com Hemofilia A, destes, 5,7 mil são considerados pacientes graves ou moderados. A Figura 7 mostra a prevalência dos tipos de coagulopatias no Brasil entre 2007 e 2014.

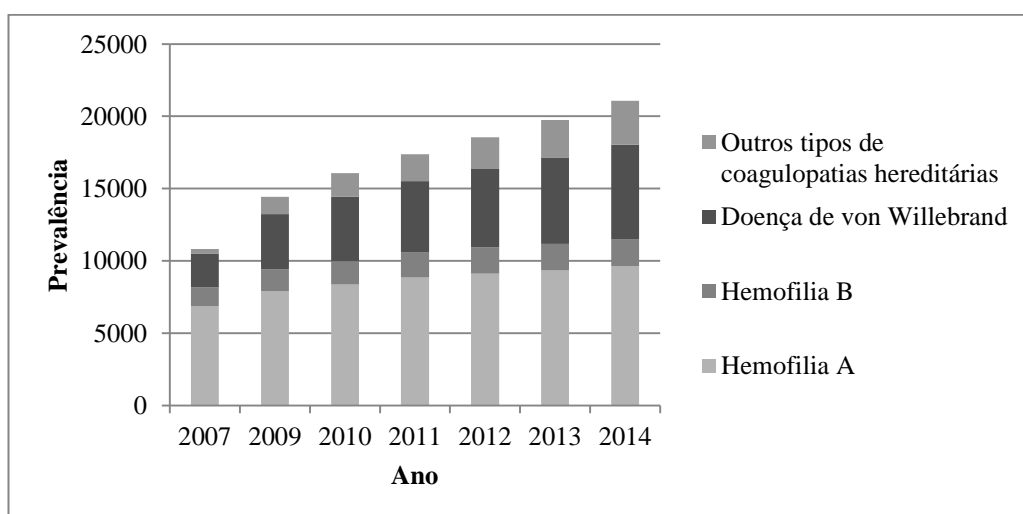


Figura 7 Perfil de coagulopatias na população brasileira.

A estimativa do número de pacientes para os próximos anos foi baseada em dados históricos da prevalência da hemofilia A no Brasil, considerando a projeção da população brasileira segundo dados do IBGE. A partir dos dados obtidos nos relatórios oficiais do Ministério da Saúde (2007-2014) que fornecem a evolução do perfil de coagulopatias hereditárias no Brasil, verificou-se que o número de homens com Hemofilia A representa em média 98% do total de indivíduos com hemofilia A.

A hemofilia A atinge em média um a cada 11.625 homens no Brasil. Esse valor, no entanto, pode ser considerado distante da realidade, visto que o primeiro relatório referente ao ano de 2007 apresentou um número de hemofílicos muito menor em relação ao descrito em anos seguintes. Segundo exposto no documento, essa diferença pode ser justificada pelo não fornecimento e/ou fornecimento incompleto dos dados pelas unidades federadas. Porém, o Programa Nacional das Coagulopatias Hereditárias no Brasil têm evoluído na coleta de dados e informações sobre imunotolerância com melhoria dos indicadores de diagnóstico, tratamento, além de resultados sobre a implantação de novas ações tais como profilaxia. Uma média de um a cada 10.000 homens no Brasil com hemofilia A seria uma estimativa mais confiável visto que esse valor está próximo ao descrito no último relatório. As Tabelas 4 e 5 mostram os dados disponibilizados nos relatórios oficiais do Ministério da Saúde utilizados para o cálculo do número médio de pacientes.

Tabela 4 Dados do número de indivíduos com hemofilia A no Brasil em comparação com a população brasileira de cada ano (NI - não informado).

População	2007	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Total (milhões)	189,46	193,54	195,49	197,39	199,24	201,03	202,76
Indivíduos com hemofilia A	6.881	7.905	8.369	8.848	9.122	9.348	9.616
Masculina (milhões)	93,82	95,77	96,70	97,61	98,48	99,33	100,15
Homens com hemofilia A	6.758	NI	8.170	NI	8.961	9.186	9.449
Feminina (milhões)	98,79	97,76	98,79	99,78	100,75	101,69	102,60
Mulheres com hemofilia A	109	NI	199	NI	161	162	167

Tabela 5 Incidência de hemofílicos do tipo A

Proporção de hemofílicos	2007	2010	2012	2013	2014
1 homem com hemofilia A em X homens brasileiros	13.884	11.836	10.990	10.813	10.600
1 mulher com hemofilia A em X mulheres brasileiras	906.340	496.437	625.808	627.752	614.425

Segundo dados publicados no relatório anual de 2015 da Federação Mundial de Hemofilia, o Brasil reportou a compra de 611.910.000 UI do concentrado de FVIII, sendo 175.102.500 UI de FVIII derivado do plasma e 436.807.500 UI de FVIIIr.

O cálculo do número de UI administrado por paciente é relativo, visto que a doença pode afetar cada paciente de diversas maneiras. A hemofilia A pode ser verificada na forma grave, moderada ou branda e o tratamento profilático varia proporcionalmente a concentração de FVIII funcional no plasma de cada indivíduo. Em casos pontuais como trauma ou necessidade de realizar cirurgia o tratamento é feito com concentrações elevadas e durante períodos longos. No ano de 2005, foi reportada a compra de 63.635 UI por paciente, número ainda inferior à média de 89.223 UI por paciente verificada em países com maior produto interno bruto. Porém, como a incidência da hemofilia A varia pouco em função da localização, o principal indicador utilizado para hemofilia é o número de UI per capita. Atualmente, no Brasil, a média do uso de FVIII é de 2,99 UI per capita. A maior média mundial, verificada na Dinamarca, é 14,271 UI per capita. Para atender os pacientes de forma ideal, sem risco de faltas localizadas no tempo e nos estados seria necessário 6 UI per capita por ano.

Estimou-se que a planta teria uma vida útil de 10 anos com uma data prevista para iniciar sua operação a partir do ano de 2021. Utilizando a estimativa de crescimento populacional fornecida pelo IBGE para os próximos 60 anos, calculou-se que, para disponibilizar 6 UI per capita, uma planta de produção do FVIIIr concentrado deveria ter uma capacidade produtiva de 1.338.761.502 UI por ano. O padrão nº 6 da OMS determina que a atividade específica deve se encontrar dentro da faixa de 4.000 – 10.000 UI/mg de proteína. Considerando o limite inferior de 4.000 UI/mg de proteína, a capacidade estimada seria de 334.690,38 mg de proteína por ano. A Tabela 6 mostra a quantidade necessária de FVIIIr para atender à demanda nacional por ano até 2030.

Tabela 6 Massa de produto necessária por ano.

Ano	População masculina brasileira	Número de UI (6UI per capita)	Massa (mg)
2016	206.081.432	1.236.488.592	309.122,15
2017	207.660.929	1.245.965.574	311.491,39
2018	209.186.802	1.255.120.812	313.780,20
2019	210.659.013	1.263.954.078	315.988,52
2020	212.077.375	1.272.464.250	318.116,06
2021	213.440.458	1.280.642.748	320.160,69
2022	214.747.509	1.288.485.054	322.121,26
2023	215.998.724	1.295.992.344	323.998,09
2024	217.193.093	1.303.158.558	325.789,64
2025	218.330.014	1.309.980.084	327.495,02
2026	219.408.552	1.316.451.312	329.112,83
2027	220.428.030	1.322.568.180	330.642,05
2028	221.388.185	1.328.329.110	332.082,28
2029	222.288.169	1.333.729.014	333.432,25
2030	223.126.917	1.338.761.502	334.690,38

5 Dimensionamento dos equipamentos de processo

Um processo produtivo genérico para a obtenção de uma proteína terapêutica pode ser dividido em dois grandes grupos: *upstream* e *downstream*. O *upstream* compreende as etapas de geração da linhagem produtora e produção e caracterização do banco celular, preparo de meio, propagação celular e bioreação, enquanto que o *downstream* engloba as etapas de purificação, formulação e processamento final do ingrediente farmacêutico ativo.

Definida a massa a ser produzida de FVIIIr, foram estabelecidas as principais etapas do processo com base nas características da molécula e em processos descritos em patentes. A seleção dos equipamentos capazes de atender a essa demanda permite posteriormente a avaliação econômica do empreendimento.

5.1 Upstream

5.1.1 Propagação celular

O processo produtivo de uma proteína terapêutica se inicia com a geração de um banco células de trabalho a partir do banco mestre. A cada ciclo, criotubos são descongelados e as células são propagadas até a inoculação do biorreator de produção. Para atingir um número de células suficientes, é necessário propagar as células em frascos agitados e biorreatores intermediários. A etapa de expansão celular pode ser realizada de muitas maneiras, mas é sempre um processo demorado que exige muita manipulação, logo, deve ser conduzida em salas limpas (grau C com fluxo laminar grau A). O volume de um frasco menor é utilizado como inóculo de outro frasco de maior volume e esse processo é repetido até alcançar o volume suficiente para o inóculo do biorreator de trabalho que será operado em perfusão. Geralmente opera-se em batelada e, em pequenos volumes (frascos agitados disponíveis até 5L normalmente), a transferência de oxigênio se dá pela interface gás líquido em sistemas agitados em estufa com temperatura e atmosfera de CO₂ controladas.

O número de etapas para a propagação é determinado basicamente pela concentração inicial e final de cada etapa e pelo volume do inóculo necessário para iniciar a produção. A concentração inicial ideal para começar cultivos de células animais é determinada com o objetivo de evitar uma fase lag prolongada que resultaria em longos períodos para expansão celular. O fim de uma etapa de cultivo é

caracterizado tal que as células não entrem em fase de morte celular em função do esgotamento de nutrientes do meio. Sabe-se que para a linhagem em questão deve-se trabalhar com uma concentração inicial de $1,0 \times 10^6$ e concentração final em torno de $8,0 \times 10^6$ células/mL de modo que as células sejam mantidas na fase exponencial do crescimento celular

Nesse projeto serão utilizados 47 biorreatores de 240 litros de volume útil que devem trabalhar, de acordo com o fabricante, com no mínimo 68 litros. Cada biorreator deve idealmente iniciar com uma concentração de 7×10^5 células/ml. Logo, estima-se que é preciso 5,95L de inóculo com 8×10^6 células/ml por biorreator somando 279,65 litros de inóculo no total. Os parâmetros para o cálculo são descritos na Tabela 7.

Tabela 7 Cálculo do volume de inóculo por biorreator.

Concentração inicial de cada etapa de expansão	1,00E+06	cels /ml
Concentração final de cada etapa de expansão	8,00E+06	cels/ml
Taxa específica de crescimento	0,70	1/dia
Tempo médio de crescimento	2,97	dias
Concentração inicial do biorreator de produção	7,00E+05	cels/ml
Volume mínimo do biorreator de produção	68.000	ml
Volume do inóculo por biorreator de produção	5.950	ml
Volume do inóculo total	279.65	ml

Para produzir esse volume em aproximadamente 14 dias devem ser descongeladas 11 ampolas de 1 ml do banco de trabalho contendo aproximadamente 1×10^7 células cada com alta capacidade produtiva. O conteúdo das ampolas após transferência para um frasco agitado tem o volume completado com meio de cultivo próprio para propagação celular iniciando a etapa 1. O volume de trabalho, a concentração inicial e final e o número de células no fim de cada etapa são descritos na Tabela 8.

Tabela 8 Cálculos para propagação do inóculo.

Propagação celular					
	Volume (ml)	Concentração inicial (cels/ml)	Concentração final (cels/ml)	Tempo (dias)	Número de células final(cels)
Criotubo	1	1,00E+07	1,00E+07	-	1,00E+07

	Volume (ml)	Concentração inicial (cels/ml)	Concentração final (cels/ml)	Tempo (dias)	Número de células final(cels)
Etapa 1	110	1,00E+06	8,00E+06	2,97	8,80E+08
Etapa 2	880	1,00E+06	8,00E+06	2,97	7,04E+09
Etapa 3	7.040	1,00E+06	8,00E+06	2,97	5,63E+10
Etapa 4	56.320	1,00E+06	8,00E+06	2,97	4,51E+11
Etapa 5	261.800	1,72E+06	8,00E+06	2,20	2,09E+12

5.1.2 Biorreação

Diferentes modo de operação dos biorreatores já foram utilizados para produção do FVIIIr, conforme mencionado anteriormente (seção 3.7). Os modos de operação diferem em relação ao fornecimento de nutrientes, remoção de metabólitos, densidade celular e produtividade.

Em batelada, células são expostas a constantes mudanças ambientais, com redução progressiva da concentração de nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos fazendo com que entrem em fase de morte celular. Com a diminuição da viabilidade, muitos compostos intracelulares são liberados no meio, inclusive enzimas que degradam o produto.

O modo de operação que têm se mostrado mais eficiente é o cultivo contínuo em perfusão no qual meio de cultivo é alimentado e recolhido continuamente, simultaneamente células retidas são realimentadas no biorreator através do auxílio de um equipamento de retenção celular. A taxa de perfusão é ajustada de acordo com a concentração de células no biorreator podendo chegar a 15vvd (volume de meio por volume de reator por dia).

Apesar da complexidade, o modo de operação em perfusão permite alcançar elevada densidade celular, por períodos prolongados. Adicionalmente, o tempo de residência do produto no biorreator pode ser ajustado de acordo com a taxa de diluição do biorreator. Isso é particularmente importante no caso de produtos lábeis, como o FVIIIr, pois o produto pode ser coletado continuamente sem que haja degradação. De modo geral, altas produtividades volumétricas são alcançadas nesse método. Dessa

forma é possível operar em menor escala reduzindo o investimento inicial na compra do biorreator.

O tempo do processo em perfusão, os dados de produtividade específica assim como as condições ótimas de cultivo foram estudadas no laboratório LECC e reunidas no presente trabalho. Como exposto na tabela, adotou-se como premissa que, após o inóculo do biorreator de trabalho, seriam necessários 10 dias para o crescimento das células até a concentração ótima para operar em perfusão. No 6° dia é previsto um shift de temperatura e o início da suplementação do meio com ácido valérico, condição sob a qual deve operar em perfusão até o fim do processo totalizando 24 dias de cultivo. Após o fim dessa etapa, o biorreator e o equipamento de retenção de células, assim como todos os sistemas de alimentação destes devem ser lavados, preparados e validados para o novo ciclo. Desta maneira, foram adicionados 7 dias à duração total do ciclo. Admitiu-se que a propagação do inóculo ocorreria simultaneamente ao cultivo. Estimou-se que a planta iria operar 300 dias por ano, permitindo que fossem feitos 9 ciclos por ano. A Tabela 9 mostra as premissas para o cálculo do número de ciclos.

Tabela 9 Premissas para o cálculo do número de ciclos.

Tempo para propagação de inóculo	14,08	Dias
Tempo para crescimento das células no biorreator	10,00	Dias
Tempo em perfusão	14,00	Dias
Tempo para preparo do biorreator	7,00	Dias
Duração do ciclo	31,00	Dias
Dias operando por ano	300,00	Dias
Ciclos por ano	9	

O volume do biorreator foi calculado para suprir a demanda anual de 334.690,38 mg. Considerando o rendimento de cada etapa do downstream e uma margem de segurança de 20%, o rendimento global calculado foi de 40%, logo, pela equação 1 estimou-se uma produção anual de 836.725,94 mg.

$$Massa\ anual = \frac{Demanda\ anual}{Rendimento\ global} \quad (1)$$

A massa a ser produzida por ciclo foi calculada dividindo-se a massa total pelo número de ciclos por ano (equação 2).

$$Massa\ por\ ciclo = \frac{Massa\ anual}{número\ de\ ciclos\ por\ ano} \quad (2)$$

Com o objetivo de simplificar os cálculos, foi considerado que a concentração de células viáveis (X_v) permaneceria constante após o 10º dia de cultivo e que somente seria contabilizado o que fosse produzido após este dia. A produtividade volumétrica foi determinada a partir da produtividade específica (Q_p) pela equação 3.

$$Produtividade\ volumétrica = Q_p \times X_v \quad (3)$$

Considerando os 14 dias de perfusão, foi calculado o volume do biorreator pela equação W que seria de 11.068 litros.

$$Volume\ do\ biorreator = \frac{Massa\ por\ ciclo}{Produtividade\ volumétrica \times tempo\ em\ perfusão} \quad (4)$$

A taxa de perfusão deve ser ajustada em função da densidade celular, do tipo de meio de cultivo, da necessidade de adicionar nutrientes e remover metabólitos e do tempo de residência do produto desejável no interior do biorreator. Nesse caso, foi definida a uma taxa de perfusão de 2 vvd, logo, será necessário processar 309.898,50 litros de meio por ciclo. A Tabela 10 resume os cálculos para dimensionamento do biorreator.

Tabela 10 Cálculos para dimensionamento do biorreator

Demanda do mercado	334.690,38	Mg
Rendimento Downstream	40	%
Massa a ser produzida	836.725,94	Mg
Massa por ciclo	92.969,55	Mg
Densidade celular	20.000.000	Cels/ml
Produtividade específica (qp)	3×10^{-11}	Mg/cels.dia
Produtividade volumétrica	0,6	Mg/L.dia
Concentração final	0,30	Mg/L

Taxa de perfusão	2	L/dia
Tempo Perfusão	14	Dias
Volume do biorreator	11.068	L
Volume de meio	309.898,50	L

Entretanto, o volume do biorreator foi limitado pela capacidade de processamento do equipamento de retenção de células, o sedimentador lamelado Settler CS500, o qual opera a uma vazão máxima 550L/d (não foram obtidos dados de eficiência para volumes maiores que 250L). Sendo assim, é proposto um sistema de 47 biorreatores em paralelo do tipo tanque agitado. Foram escolhidos biorreatores de aço inoxidável de qualidade farmacêutica (AISI 316L) da marca *Eppendorf* modelo *BioFlo* com volume total de 300 litros operando com volume útil de 240 litros cada (segundo recomendação do fabricante).

Entre as técnicas mais utilizadas para separação de células em perfusão vale ressaltar a centrifugação, a sedimentação e a filtração. O desafio consiste em separar de forma eficiente células viáveis sem expô-las a condições de estresse, como elevadas tensões de cisalhamento, que possam diminuir a viabilidade celular do cultivo. A Figura 8 mostra um esquema de um processo em perfusão.

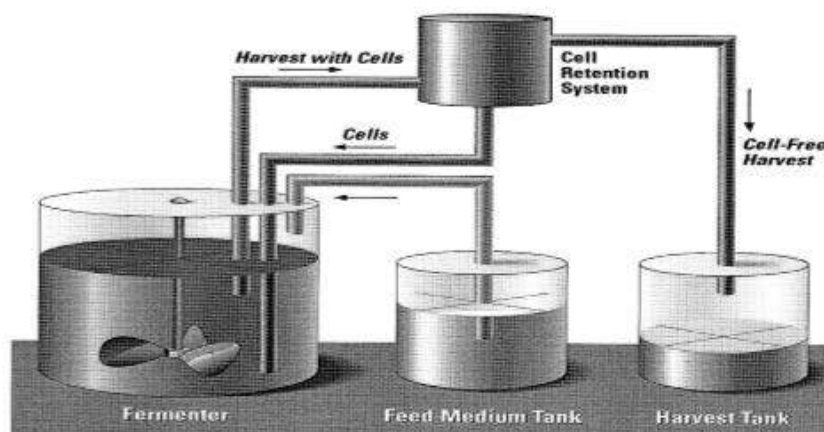


Figura 8 Desenho esquemático de um processo em perfusão (Boedeker, 2001).

Para a retenção de células nesse projeto foi escolhido o sedimentador gravitacional lamelado que se mostrou eficiente para o processo de produção do FVIII

em desenvolvimento no LECC. Esse equipamento consiste em um dispositivo composto internamente por placas paralelas ou lamelas, dispostas próximas uma das outras de forma inclinada. O número de lamelas garante uma maior área de sedimentação de forma compacta, a distância entre as lamelas determina o caminho que as células devem percorrer até que sedimentem na placa inferior, formando uma corrente concentrada em células que irá retornar por bombeamento ao biorreator. Como a diferença entre a densidade do meio de cultivo e da célula é pequena, deve-se utilizar velocidades entre 1 e 15 cm/h.(Castilho & Medronho, 2002) A corrente recolhida na parte superior do equipamento deve ser livre de células ou conter poucas células. A figura 9 apresenta uma ilustração do funcionamento de um biorreator associado a um sedimentador inclinado. Devido a diferença de densidade de células viáveis e não viáveis existe uma tendência de células não viáveis não sedimentarem, o equipamento apresenta um caráter seletivo (Searles, Todd, & Kompala, 1994).

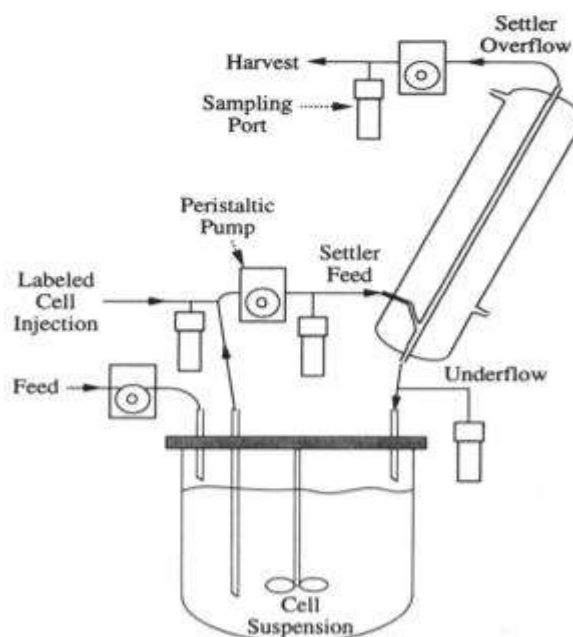


Figura 9 Ilustração do funcionamento de um biorreator associado a um sedimentador inclinado (Searles et al., 1994).

Para evitar a aderência das células sobre as superfícies em condições brandas pode-se associar um sistema de vibração e/ou então utilizar material antiaderente para o recobrimento da superfície. Os efeitos da depleção de nutrientes e oxigênio durante o tempo de residência no equipamento podem ser minimizados pela redução da

temperatura na circulação e no sedimentador, diminuindo o metabolismo e mantendo uma alta viabilidade celular.

O aumento de escala pode ser conduzido mantendo a área proporcional ao volume do biorreator e a taxa de perfusão adotada. Considerando os modelos do fabricante (Biotechnology Solutions), o CS500 apresenta a maior capacidade em termos de taxa máxima de perfusão, de até 550L/dia. Para atender as necessidades do projeto, portanto são necessários 47 módulos deste equipamento. A taxa máxima de perfusão foi determinante para a seleção dos biorreatores, visto que foi definido que o processo deve operar em 2vvd.

5.2 Downstream

A purificação de proteínas terapêuticas é um processo tradicionalmente oneroso. Agências regulatórias exigem elevadíssimos graus de pureza para biofármacos sendo necessárias muitas etapas que exploram diferentes princípios físico-químicos e biológicos. O objetivo é concentrar a proteína preservando sua atividade e remover impurezas. Devem ser removidas proteases, aditivos do meio de cultivo, DNA, proteínas da célula hospedeira, vírus, endotoxinas e isoformas não desejáveis da proteína alvo ou proteínas alvo degradadas. Um típico processo de purificação do FVIIIr utiliza diversas etapas cromatográficas. As etapas de purificação mais utilizadas na produção do FVIIIr são: cromatografia de troca iônica, cromatografia de imunoafinidade e cromatografia de interação hidrofóbica (Boedeker, 2001).

Adicionalmente, a legislação exige que faça parte do processo de produção em células de mamíferos duas ou mais etapas capazes de remover ou inativar vírus através de diferentes mecanismos. Neste processo, deve ser comprovada a remoção de três ou mais tipos de vírus que tenham diferentes características através de procedimentos de validação. Podem ser utilizadas etapas de filtração viral com membranas de ultrafiltração com diferentes níveis de porosidade, tratamento com solvente/detergente e tratamento térmico (Mannucci, 1993).

Da mesma forma que a biorreação, a purificação pode ser feita em batelada ou de forma contínua. A tecnologia de processamento contínuo das etapas de downstream ainda está em desenvolvimento, mas se apresenta como um caminho promissor por garantir menor consumo de soluções, uso reduzido de utilidades e a possibilidade de adaptar a escala de acordo com a demanda sem necessidade de revalidação do processo

(Leuenberger, 2001). Entretanto, optou-se por uma tecnologia mais estabelecida para a purificação, em batelada. Devido à instabilidade do FVIII, ao grande volume e conseqüentemente duração longa das etapas subseqüentes (aproximadamente 35 horas) nesse projeto foi considerado que o volume coletado seria armazenado em tanques e refrigerados (2°C a 8°C), processado a cada 2 dias portanto, em 14 dias de perfusão as etapas do downstream devem ser realizadas 7 vezes para um volume de 44.271,21 litros, conforme resumido na Tabela 11.

Tabela 11 Definição do volume a ser processado por colheita

Massa por ciclo	92.969,55	mg
Volume total por ciclo	309.898,50	L
Número de coletas em 14 dias	7,00	
Massa média por coleta	13.281,36	mg
Volume por coleta	44.271,21	L

A etapas de downstream foram baseadas em um processo desenvolvido experimentalmente no laboratório LECC para purificação do FVIIIr. Os dados obtidos no laboratório mostraram que a utilização da cromatografia de troca catiônica, cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de afinidade em sequência demonstrou ser o processo mais eficiente, apresentando bons rendimentos e elevado grau de pureza. Para adequar o processo, após a colheita algumas etapas precisaram ser adicionadas como a etapa de filtração, uma etapa de cromatografia de troca aniônica, uma etapa de ultrafiltração/diafiltração, entre outras, como ilustrado na Figura 10.

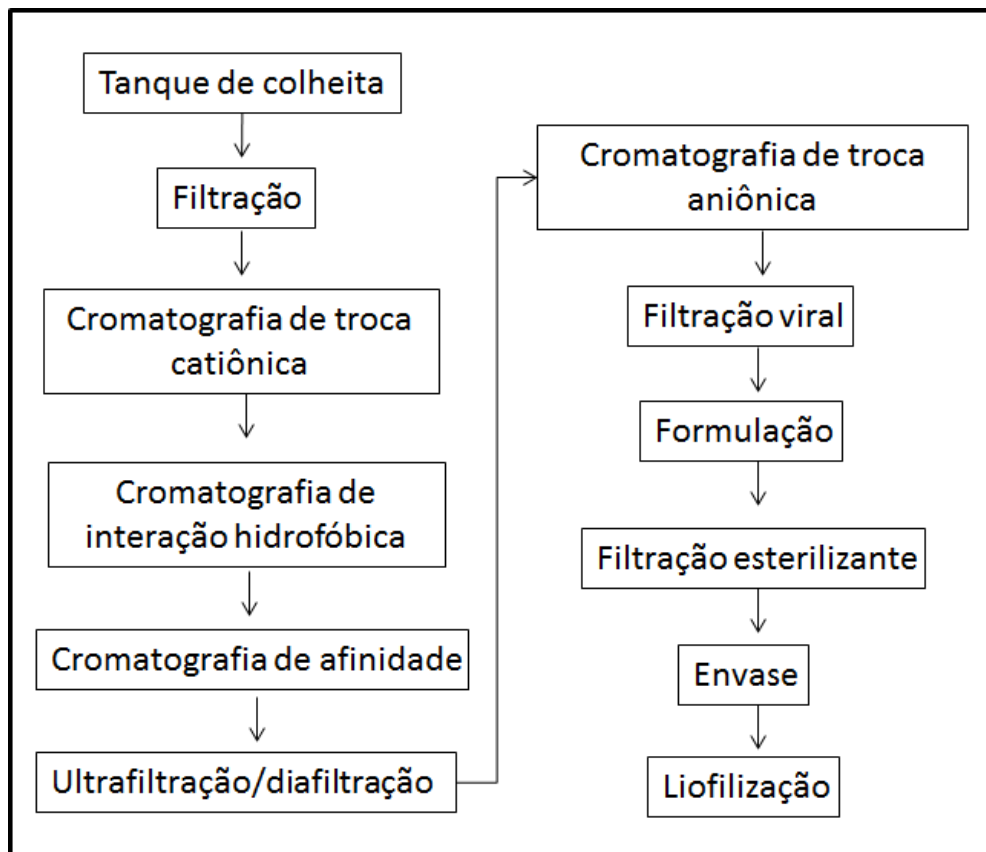


Figura 10 Etapas do downstream.

5.2.1. Tanque de colheita

A solução resultante após o equipamento de retenção celular deve ser armazenada em temperatura ótima (recomenda-se temperatura de 2° a 8 °C) para evitar a perda de atividade do FVIII até que o volume referente a dois dias de perfusão comece a ser processado.

Em dois dias de perfusão devem ser recolhidos 44.271 litros de meio. Sabe-se que na prática tanques muito grandes são difíceis de instalar ou precisam ser montados no local, por isso, foi definido que o volume coletado seria mantido em 3 tanques de 15.000L cada.

5.2.2 Filtração

Apesar da alta eficiência do equipamento de retenção celular selecionado, resquícios de células e debris celulares podem causar entupimentos de membranas cromatográficas, elevar a pressão transmembranar prejudicando a eficiência do processo e danificar colunas cromatográficas. Portanto, a adição de uma etapa de filtração para

redução do *bioburden* foi considerada essencial para preservar o material da primeira etapa cromatográfica (membrana de troca iônica).

Seguindo recomendação do fabricante *Sartorius* foi selecionado um pré-filtro com tamanho de poro de 5,0 μm , capaz de reter as maiores partículas, que antecede um filtro de 0,80/ 0,22 μm . A área efetiva de filtração foi calculada levando em consideração os dados fornecidos pelo fabricante de fluxo para cada faixa de pressão e tipo de membrana, conforme apresentado na Figura 11.

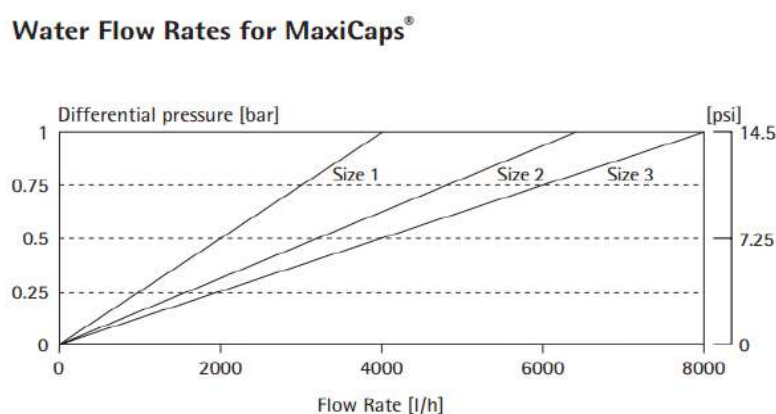


Figura 11 Relação entre fluxo e pressão para filtros da Sartorius (MaxiCaps).

Segundo o manual a pressão máxima de operação é de 2 bar, foi definido que o equipamento seria operado a 1 bar. A vazão máxima recomendada para água é de 8.000 L/h para uma membrana de 1,8m² o que indica uma fluxo médio de 4.444 L/h.m². Considerando a viscosidade do meio proveniente do cultivo e partículas em suspensão, o fluxo médio precisaria ser determinado experimentalmente, foi estimado um fluxo de 2.000L/h.m². A duração de 3,1h para cada etapa de filtração foi escolhida com o objetivo de processar todo o volume em um tempo curto sem a necessidade de uma área muito grande. Dessa forma foi calculado que para processar o volume de 44.271 litros seria necessária uma área de 7,14m² por filtro.

Foi selecionado como pré-filtro o modelo de cartucho *Sartopure Pp3* (5 μm) que possui cartuchos com área de até 2,6 m². Deve-se operar portanto com 3 unidades em paralelo que podem estar associadas uma a cada tanque de colheita. O filtro seguinte escolhido foi o *Sartopore 2 XLG* que possui uma camada mais grosseira com tamanho de poro médio de 0,8 μm e uma malha interna mais fina com tamanho de poro médio de 0,22 μm . As membranas são autoclaváveis, porém não é recomendável reutilizar pois

seria necessário validar os filtros a cada corrida, o que levaria muito tempo. A Tabela 12 mostra o cálculo para o dimensionamento dos filtros de clarificação.

Tabela 12 Parâmetros para dimensionamento dos filtros para clarificação.

Módulo Sartopure pp3 5 µm		
Vazão de água em 1 bar (size 3)	8.000	L/h
Fluxo máximo para água	4.444,44	L/h.m ²
Fluxo estimado para meio de cultivo	2.000	L/h.m ²
Tempo de processamento	3,00	h
Área necessária	7,14	m ²
Área unitária	2,6	m ²
Unidades	3	
Módulo Satopore 2 XLG		
Fluxo máximo	4.140	L/h.m ²
Fluxo estimado	2.000	L/h.m ²
Tempo de processamento	3,00	h
Área necessária	7,14	m ²
Área unitária	2,4	m ²
Unidades	3	

5.2.3. Tanque de equalização

Na etapa seguinte (cromatografia) a vazão utilizada é muito inferior a da filtração, por isso o sobrenadante filtrado deve ser recolhido e armazenado para ser enviado para a próxima etapa. Poderiam ser utilizadas bolsas descartáveis, mas como o volume recolhido é muito grande foi escolhido trabalhar com 3 tanques de 15.000 litros cada mantendo o padrão dos tanques de colheita.

5.2.4. Cromatografia de troca catiônica

A cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas para purificação de biofármacos. Os principais tipos de cromatografia são: separação por tamanho, carga, hidrofobicidade, lipofilicidade e afinidade biológica. Tradicionalmente são empregadas resinas particuladas empacotadas em colunas cromatográficas, porém, uma nova tecnologia que utiliza membranas vem se consolidando e já é utilizada nos processos de produção dos biofármacos mais recentes.

A cromatografia com membranas consiste na utilização de membranas de microfiltração contendo ligantes de diferentes tipos (catiônicos, aniônicos, afinidade, hidrofóbicos) imobilizados em seus poros para a purificação seletiva de proteínas. A utilização de membranas oferece como principais vantagens a possibilidade de se trabalhar com maiores vazões (até duas ordens de grandeza maiores) sem perda de capacidade dinâmica, redução do tempo de processo e diminuição da resistência à transferência de massa e das limitações difusivas, ou seja, como os poros são maiores o acesso aos sítios de ligação é favorecido em relação às resinas cromatográficas. No mercado estão disponíveis módulos de cromatografia com membranas dispostas em diferentes configurações (planas empilhadas, como fibras ocas, na forma de espirais), reutilizáveis ou descartáveis e facilmente escalonáveis. Processos validados demonstraram que o tempo de operação pode ser diminuído em até 80% e a quantidade de solução tampão utilizada pode ser reduzida em até 95% em relação a colunas empacotadas (Charcosset, 1998; Ghosh, 2002).

O desenvolvimento de uma metodologia de purificação inclui tanto a seleção das etapas como a definição da melhor sequência para otimizar o processo. É, é preciso considerar as condições ideais para cada corrida, como pH, força iônica, além do volume de solução a ser tratado, a concentração da proteína alvo e buscar a obtenção do melhor rendimento e fator de purificação para cada etapa. A produtividade de uma coluna cromatográfica pode ser definida como a quantidade de produto purificado em função do volume da resina cromatográfica e do tempo, conforme a equação 5

$$Produtividade = \frac{\text{quantidade de produto purificado}}{\text{volume de resina} \times \text{tempo}} \quad (5)$$

A sequência e as etapas escolhidas foram baseadas nas principais estratégias adotadas na purificação de FVIII e no trabalho desenvolvido no LECC.

Como etapa inicial para a purificação do FVIII será adotada a cromatografia de troca catiônica com membranas. Neste tipo de cromatografia, iônica os íons em solução (fase móvel) são separados em uma coluna com ligantes iônicos imobilizados (fase estacionária) pela diferença de afinidade com os grupos iônicos que fazem parte da fase estacionária. Para garantir que a coluna ou membrana esteja nas condições ideais para receber a amostra, é utilizada uma solução tampão de equilíbrio com baixa concentração salina (baixa força iônica). Na etapa de carregamento da amostra moléculas com carga oposta à fase estacionária são retidas no material cromatográfico, enquanto moléculas não iônicas ou com carga igual à fase estacionária seguem como efluente. A etapa de lavagem é utilizada para remover moléculas com pouca afinidade e reequilibrar a coluna. A etapa de eluição usualmente é realizada aumentando-se a força iônica do tampão de forma linear ou por degraus. A escolha do tampão de eluição adequado é uma das tarefas mais importantes da cromatografia, pois o tampão pode agir modificando a carga global da molécula adsorvida ou competindo pelos sítios carregados da matriz. A etapa de regeneração e/ou sanitização tem como objetivo remover moléculas fortemente aderidas para preparar o material para uma nova corrida e evitar a contaminação. Nesta etapa, geralmente, utiliza-se solução de hidróxido de sódio NaOH.

A escolha da cromatografia aniônica ou catiônica depende do ponto isoelétrico (pI) e o pH da solução. Diz se que um trocador é catiônico quando os íons fixos na matriz são negativos, logo, os íons trocáveis devem ser positivos. A cromatografia de troca catiônica retém proteínas quando em pH abaixo do ponto isoelétrico.

Nesse trabalho, admitiu-se o valor aproximado do pI do FVIII_r com domínio B deletado de 6,3 (Cruz, 2016). Com base neste valor, foi definido o uso de solução tampão de pH 6,0, condição na qual o FVIII encontra-se positivamente carregado, logo, fica adsorvido na membrana, enquanto que as impurezas são removidas na etapa de lavagem. O FVIII é então eluído e é recuperado em maior concentração e livre de parte dos contaminantes.

A escolha das soluções descritas na Tabela 13 e a duração das etapas de pré-lavagem, equilíbrio, carga, lavagem, eluição, regeneração e sanitização da membrana

foram feitas com base em testes experimentais e de acordo com recomendações do fabricante (Cruz, 2016).

Tabela 13 Soluções utilizadas na etapa de cromatografia de troca catiônica.

Etapa	Composição da solução	Duração (min)	Volume de membrana (VM)
Pré-lavagem	Água para injeção	0,10	2
Equilíbrio	Água para injeção, acetato de amônio 5,0 mM, cloreto de cálcio 0,25 mM, cloreto de sódio 0,1M, Tween 80 0,001 % (v/v)	0,50	10
Carga	Sobrenadante	1.229,76	-
Lavagem	Água para injeção, acetato de amônio 5,0 mM, cloreto de cálcio 0,25 mM, cloreto de sódio 0,1M, Tween 80 0,001 % (v/v)	0,50	10
Eluição	Água para injeção, acetato de amônio 100,00 mM, cloreto de cálcio 5,00 mM, cloreto de sódio 2,00M, Tween 80 0,02 % (v/v)	0,41	10
Regeneração	Água para injeção, hidróxido de sódio 0,2M	0,50	10

Foi escolhida a capsula com membranas *Sartobind S*, que consiste em uma membrana de celulose reforçada com ânions imobilizados do tipo ácido sulfônico e tem formato em espiral para módulos de grande escala. O fluxo do sobrenadante ocorre de forma radial, do exterior para o interior da cápsula (Figura 12). O fabricante recomenda que sejam reutilizadas entre 14 e 20 vezes, portanto, cada módulo deve ser substituído a cada 2 ciclos (total de 14 coletas processadas) considerando-se o limite inferior.

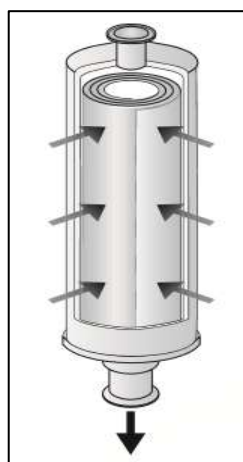


Figura 12 Direção do fluxo nas membranas Sartobind.

A capacidade dinâmica de $0,7\text{mg}/\text{cm}^2$ dessa membrana é descrita em termos da ligação com a proteína lisozima. Com o objetivo de definir um cenário mais realista, a capacidade dinâmica específica foi designada de forma arbitrária como sendo 30% da capacidade dinâmica fornecida pelo fabricante. Considerando que é a primeira etapa cromatográfica, na qual existe uma competição pelos sítios de ligação entre o fator VIII e as proteínas contaminantes, e trata-se de uma proteína diferente da avaliada pela empresa Sartorius trabalhou-se com uma capacidade dinâmica reduzida por segurança, já que não havia dados reais de capacidade dinâmica para o FVIII produzido no LECC.

Para definir o tamanho da cápsula, primeiramente foi calculada, a área mínima de membrana necessária para reter o produto. Como o volume a ser processado era muito grande decidiu-se trabalhar com três unidades em paralelo para minimizar a duração desta etapa. Dessa forma, foi selecionada a capsula de 0,6 litros que opera idealmente sob a vazão de 720 L/h segundo o fabricante. A vazão limita a velocidade linear e determina a duração do ciclo, que foi estimada em 21 horas. A Tabela 14 mostra os cálculos para dimensionamento da etapa de cromatografia de troca catiônica.

Tabela 14 Dimensionamento da membrana de troca catiônica.

Capacidade dinâmica fornecida pelo fabricante	0,70	mg/ cm ²
Estimativa de capacidade dinâmica para o FVIII	0,21	mg/cm ²
Área mínima necessária	63.244,59	cm ²
Massa de FVIII	13.281,36	mg
Volume a ser purificado	44.271,21	L
Modelo	<i>Sartobind S (4mm)</i>	
Área unitária	22.000,00	cm ²
Área total	66.000,00	cm ²
Volume unitário	600,00	ml
Volume total	1.800,00	ml
Vazão recomendada	720,00	L/h
Volume a ser purificado por unidade	14.757,07	L

Duração da etapa de carga	20,49	horas
Volume de membrana (VM) – eluição	10	VM
Volume eluído	18,00	L
Rendimento estimado	85	%
Massa recuperada	11.289,16	mg

Para operar o sistema foi selecionado o equipamento Akta process da GE para purificação de biofármacos em escala comercial de 1” de diâmetro de aço inox. Sendo necessário 3 equipamentos para a primeira etapa, já que atuarão em paralelo. A viabilidade de adaptação de três bombas de injeção no mesmo equipamento será avaliada com o fornecedor. Como ainda não há definição foi considerado o pior caso.

5.2.4. Cromatografia de interação hidrofóbica

Moléculas com sítios hidrofóbicos expostos em sua superfície podem ser separadas pela interação reversível com um ligante apolar imobilizado na matriz cromatográfica. Para a cromatografia de interação hidrofóbica, utilizam-se solventes polares com alta concentração salina capaz de tornarem mais disponíveis os sítios hidrofóbicos pelo efeito de *salting out* melhorando a interação entre a proteína e os ligantes, no entanto, deve-se atentar para que a proteína não seja desnaturada. Como na etapa anterior o FVIII é eluído na presença de cloreto de sódio 2M, portanto não há necessidade de condicionar a amostra eluída da membrana Sartobind S para injetar na segunda etapa cromatográfica.

A escolha das soluções assim como a duração para as etapas de pré-lavagem, equilíbrio, carregamento, lavagem, eluição, regeneração e sanitização se encontram descritas na tabela 15. A eluição ocorre pela redução da força iônica a 25% da solução de lavagem permitindo a separação das proteínas.

Tabela 15 Soluções utilizadas na etapa de cromatografia de interação hidrofóbica.

Etapa	Composição da solução	Duração (min)	Volume de membrana (VM)
Etapa	Composição da solução	Duração	Volume de

		(min)	membrana (VM)
Pré-lavagem	Água para injeção, hidróxido de sódio 1,0 M	1,50	5
Equilíbrio	Água para injeção, acetato de amônio 100,0 mM, cloreto de cálcio 5,0 mM, cloreto de sódio 2,0M, Tween 80 0,02 % (v/v)	2,10	7
Carga	Eluído membrana Sartobind S	1,50	-
Lavagem	Água para injeção, acetato de amônio 100,0 mM, cloreto de cálcio 5,0 mM, cloreto de sódio 2,0M, Tween 80 0,02 % (v/v)	2,10	7
Eluição	Água para injeção, acetato de amônio 25,0 mM, cloreto de cálcio 1,25 mM, cloreto de sódio 0,5M, Tween 80 0,05 % (v/v)	3,00	10
Regeneração	Água para injeção, acetato de amônio 100,00 mM, cloreto de cálcio 5,00 mM, Tween 80 0,02 % (v/v)	0,90	3
Sanitização	Água para injeção, hidróxido de sódio 0,1M, etanol 70%	1,50	10

Foi selecionada a membrana Sartobind Phenyl, na qual a captura é realizada através de grupamentos fenil ligados covalentemente à membrana. Cada módulo pode ser reutilizado entre 14 e 20 vezes, portanto utilizando o limite inferior o módulo deve ser substituído a cada 14 coletas processadas (total de 2 ciclos).

A capacidade dinâmica da membrana é de 0,4 mg/cm², sendo mensurada em termos da captura da imunoglobulina G, porém, nesse trabalho foi considerado que a capacidade dinâmica específica equivale a 70% do estabelecido pelo fabricante. Estimou-se, portanto, uma área mínima de 40.318,43 cm², o que conduziu à escolha do modelo Sartobind phenyl de 1,2 litros (4 mm) com área de 44.000 cm². A vazão de operação recomendada pelo fabricante é de 360L/h. O cálculo do tempo da etapa de carga apontou uma duração estimada de 3,00 min. Os cálculos para dimensionamento da etapa de interação hidrofóbica estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16 Dimensionamento da membrana Sartobind phenyl.

Capacidade dinâmica fornecida pelo fabricante	0,40	mg/cm ²
Estimativa de capacidade dinâmica específica	0,28	mg/cm ²

Área necessária	49.929,94	cm ²
Volume a ser purificado	18.000	ml
Massa de FVIII a ser purificada	11.289,16	mg
Modelo	Sartobind Phenyl	
Área	44.000,00	cm ²
Volume	1.200,00	ml
Vazão recomendada	360,00	L/h
Duração etapa de carga	3,00	Min
Volume de membrana para eluição	10	VM
Volume eluído	12.000,00	MI
Rendimento estimado	80,00	%
Massa recuperada	9.031,33	Mg

Para operar o sistema foi selecionado o equipamento Akta process ½” da GE para purificação de biofármacos.

5.2.5. Cromatografia de afinidade

A cromatografia por afinidade oferece o maior grau de seletividade observado entre as cromatografias. Na superfície da matriz porosa são posicionados ligantes específicos para cada tipo ou classe de molécula. O tamanho do poro da matriz deve ser grande o suficiente para permitir o livre acesso da proteína ao ligante. A escolha do ligante de afinidade deve ser feita de modo que somente a molécula alvo fique retida e impurezas sejam recolhidas como efluente da etapa de carregamento.

A escolha das soluções assim como a duração e o volume de coluna para as etapas de pré-lavagem, equilíbrio, carga, lavagem, eluição, regeneração e sanitização se encontram descritas na tabela 17.

Para essa etapa foi selecionada a resina VIII *select* da *GE Healthcare Life Sciences*, uma resina de agarose com ligantes específicos para o FVIIIr com domínio B deletado. Esse ligante produzido em leveduras foi desenvolvido a partir da resposta imune de camelídeos ao FVIII, logo, possui alta especificidade. A resina apresenta alta

capacidade dinâmica (20.000 UI/ml de resina) sendo necessário um volume de coluna de 2,65L para atender ao processo em questão. Como o fabricante especifica a altura de resina ideal e a velocidade linear ideal para que o produto tenha um tempo de residência adequado na coluna, o modelo mais adequado de coluna escolhida é a axichrom 140/300 da empresa GE Healthcare para o suporte da resina. A tabela 18 apresenta o cálculo para dimensionamento da coluna VIII select.

Tabela 17 Composição das soluções utilizadas na cromatografia de afinidade (FVIII select).

Etapa	Composição da solução	Duração (min)	Volume de coluna (VC)
Pré-lavagem	água para injeção	6,28	2
Equilíbrio	água para injeção, acetato de amônio 40,0 mM, cloreto de cálcio 2,0 mM, cloreto de sódio 0,8M, Tween 80 0,008 % (v/v)	31,43	10
Carga	Eluído da membrana Sartobind Phenyl	20,88	-
Lavagem	água para injeção, acetato de amônio 40,0 mM, cloreto de cálcio 2,0 mM, cloreto de sódio 0,8M, Tween 80 0,008 % (v/v)	31,43	10
Eluição	água para injeção, L-histidina 10 mM, L-arginina 0,9 M, cloreto de cálcio 5 mM, Tween 80 0,02 % (v/v), etilenoglicol 45% (v/v).	47,14	15
Regeneração	água para injeção, acetato de amônio 40,00 mM, cloreto de cálcio 2,00 mM, cloreto de sódio 0,8 M, Tween 80 0,008 % (v/v)	9,42	3
Sanitização	água para injeção, hidróxido de sódio 0,1M.	47,14	15

Tabela 18 Dimensionamento da coluna de afinidade VIII select.

Informações cromatografia de afinidade		
Capacidade dinâmica fornecida pelo fabricante	20000,00	UI/ml
Volume a ser purificado	16000,00	ml
Massa de FVIII a ser purificada	9.031,33	mg
Atividade de FVIII	36.125.310,37	UI
Volume necessário de resina	1806,27	ml

Modelo da coluna	Axichrom 140-300	
Velocidade linear recomendada	300,00	cm/h
Área transversal da coluna	153,90	cm ²
Altura máxima da resina na coluna	20,00	cm
Altura calculada da resina na coluna	11,74	cm
Vazão	46.170	cm ³ /h
Diâmetro	14,00	cm
Duração da etapa de carga	15,59	min
Volume de eluído	27.093,98	ml
Rendimento estimado	85,00	%
Massa recuperada	7.676,63	mg

5.2.6. Ultrafiltração/Diafiltração

A eluição com etilenoglicol na cromatografia de afinidade impossibilita a sequência direta para a etapa seguinte de cromatografia aniônica, uma vez que é necessário eliminar essa substância para evitar possível interferência. Logo, foi adicionada uma etapa de ultrafiltração para troca da solução tampão do material eluído.

Na ultrafiltração, moléculas em solução maiores que o tamanho de poro de membrana são retidas formando uma corrente concentrada denominada de retentado e moléculas menores que o tamanho de poro médio atravessam a membrana formando a corrente de permeado. O objetivo é reter a proteína permitindo a passagem de sais, aminoácidos, monossacarídeos e dissacarídeos. A concentração do produto facilita a manipulação nas próximas etapas.

Para a diafiltração, utiliza-se a mesma membrana usada anteriormente e o reservatório é alimentado com a solução tampão de escolha com a mesma taxa de remoção de permeado de forma a substituir gradativamente a solução na qual se encontra o produto.

Os principais fatores que influenciam essa etapa são:

- A área da superfície filtrante, que determina a capacidade volumétrica.

- O tamanho de poro, que é caracterizado em termos de massa da maior molécula capaz de passar pela membrana (NMWC do inglês *nominal molecular weight cutoff*).
- A pressão transmembranar (TMP) que é uma medida da força necessária para transferir o material pela membrana.
- A vazão de alimentação da membrana, que controla o fluxo de permeado e de retentado.

Todos esses fatores devem ser estimados de modo a encontrar um NMWC suficiente para reter a proteína e uma área que permita uma vazão adequada ao processo, sem que o procedimento se torne muito demorado. Conforme recomendado no manual de filtração tangencial da empresa *General Electric Company* (GE, 2014), deve-se utilizar 1 m² de área de membrana para cada 100L de solução, o NMWC deve ser de 3 a 5 vezes menor que proteína a ser retida. O tamanho de poro máximo de 16 KDa foi definido em função do tamanho da cadeia leve do FVIII (80 KDa). A faixa de pressão transmembranar para operação varia para cada fabricante e tipo de membrana, logo, deve-se escolher a pressão ótima dentro dos limites para se obter o fluxo de filtrado desejado. A concentração é limitada pela solubilidade do produto e é preciso evitar a agregação e a formação de gel na membrana.

O processo é mais eficaz quando operado sob um fluxo tangencial (*cross-flow*). A corrente de alimentação passa sob pressão sobre uma membrana colocada em paralelo com a corrente fluida. O sistema *Sartoflow advanced* foi escolhido para controlar todos esses parâmetros e conter as membranas de ultrafiltração *Hydrosart* de 10 KDa no formato *Slice cassette*. A membrana de celulose com perfil naturalmente hidrofílico garante pouca ou nenhuma aderência de proteínas não específicas. A área foi estimada em função do volume resultante da etapa anterior (27,09 L). Para estabelecer essa etapa, foram definidas as concentrações inicial e final do produto nas etapas de ultrafiltração e diafiltração, utilizadas para o cálculo do fator de concentração, do tempo do procedimento e fator de diafiltração (Tabela 19). A solução tampão utilizada para a diafiltração se justifica com base na etapa seguinte do *downstream* e apresenta a seguinte composição: água para injeção, L-histidina 100 mM, cloreto de cálcio 100 mM, *Tween* 80 0,2 % (v/v).

Tabela 19 Parâmetros ultrafiltração/diafiltração.

Parâmetros ultrafiltração/diafiltração		
<i>Membrana Hydrosart</i>		
Tamanho de poro máximo (NMWC)	16	Kda
Tamanho de poro da membrana	10	Kda
Área de membrana necessária	0,27	m ²
Área unitária da membrana	0,1	m ²
Número de membranas	3,0	Un
Etapa concentração		
Massa de FVIII	7.676,63	mg
Fluxo	50,00	L/ m ² .h
Pressão de alimentação máxima	4,0	Bar
Concentração inicial	0,42	g/L
Concentração final	1,14	g/L
Fator de concentração	2,71	
Volume inicial	27,09	L
Volume Final	10	L
Tempo de concentração	1,14	H
Etapa de diafiltração		
Diavolumes necessários	10	
Volume de tampão utilizado	100	L
Fluxo	50,00	L/m ² .h
Volume de trabalho	10	L
Tempo de diafiltração	1,73	H
Tempo total operação	2,87	H
Rendimento	95,00	%
Massa de FVIII recuperada	7.292,79	mg

5.2.7. Cromatografia de troca aniônica

A cromatografia de troca aniônica pode ser utilizada na produção de biofármacos como uma etapa de “cromatografia negativa” que retém impurezas enquanto o produto é recuperado no efluente da etapa de alimentação ou como mais uma etapa de polimento no modo *bind-and-elute* no qual o produto é retido pela matriz e posteriormente eluído. Nesse projeto, a cromatografia de troca aniônica foi escolhida com intuito de aumentar o grau de pureza pela redução de DNA residual, endotoxinas e carga viral.

No trocador aniônico, os íons fixos são positivos e os íons trocáveis são negativos. A proteína de interesse quando em pH superior ao do ponto isoelétrico, deve interagir com a matriz e após lavagem ser eluída pelo aumento da força iônica do tampão utilizado. Portanto, como solução tampão para etapa de diafiltração, foi escolhida a mesma solução utilizada na etapa de equilíbrio com pH 7,0. Para as etapas de pré-lavagem, equilíbrio, carregamento, lavagem regeneração e sanitização a composição das soluções e a duração de cada se encontram descritas na tabela 20.

Tabela 20 Composição das soluções utilizadas na cromatografia de troca aniônica.

Etapa	Composição da solução	Duração (min)	VM
Pré-lavagem	água para injeção	0,07	2
Equilíbrio	água para injeção, L-histidina 0,5mM, cloreto de cálcio 0,25 mM, <i>Tween</i> 80 0,001 % (v/v) pH 7,0	0,33	10
Carregamento	Diafiltrado da etapa de UF/DF	0,83	
Lavagem	água para injeção, L-histidina 1,5 mM, cloreto de cálcio 0,75 mM, <i>Tween</i> 80 0,003 % (v/v) pH7,0	0,33	10
Eluição	água para injeção, L-histidina 3,0 mM, cloreto de cálcio 1,5 mM, <i>Tween</i> 80 0,006 % (v/v), cloreto de sódio 2,0 M pH 7,0	0,12	3,5
Regeneração	água para injeção, L-histidina 10 mM, cloreto de cálcio 5 mM, <i>Tween</i> 80 0,02 % (v/v), cloreto de sódio 2,0 M pH 7,0	0,22	6,5
Sanitização	água para injeção, hidróxido de sódio 0,2M	0,33	10

Foi escolhida a membrana *Sartobind Q*. A capacidade dinâmica da membrana é definida pelo fabricante em função da captura de albumina do soro bovino. A capacidade dinâmica específica foi definida como sendo 80% da capacidade fornecida pelo fabricante. A área necessária foi calculada dividindo-se a massa a ser purificada pela capacidade dinâmica específica. O tamanho que melhor atendeu as necessidades foi da membrana de 4 mm, com 400 mL de volume e 14.600 cm² de área. Considerando a operação com a vazão recomendada a duração da etapa de carga foi estimada em 0,83 h. A Tabela 21 mostra as considerações para dimensionamento da membrana *Sartobind Q*.

Tabela 21 Considerações para dimensionamento da etapa de troca aniônica.

Informações cromatografia troca aniônica		
Massa de FVIII	7292,79	mg
Área necessária	13022,85	cm ²
Volume a ser filtrado	10	L
Modelo	<i>Sartobind Q</i> (4mm)	
Volume da membrana	400	ml
Vazão recomendada	720	L/h
Duração etapa de carga	0,83	h
Rendimento estimado	95,00	%
Massa recuperada	7292,80	mg

Para operar o sistema foi selecionado o equipamento *Akta process 3/8*” da GE para purificação de biofármacos.

5.2.8. Filtração viral

A remoção ou inativação de vírus endógenos deve ser demonstrada ao longo de todo o *downstream* para que o produto atenda às exigências estabelecidas pelas agências reguladoras. Existem hoje inúmeras técnicas que utilizam tratamentos térmicos tradicionais ou por micro-ondas, produtos químicos, adsorção por cromatografia, mas a remoção viral empregando membranas tem sido a mais empregada devido à eficiência, facilidade de operação e manutenção da estabilidade da proteína alvo. A escolha da técnica depende da estabilidade do produto e do tipo de vírus alvo (Bolton et al., 2005).

Um parâmetro essencial para demonstrar a eficiência de uma etapa quanto a redução da carga viral é o *logarithm reduction value* (LRV). Esse valor é calculado na escala logarítmica de base 10 pela razão entre a carga viral antes de uma etapa do *downstream* e a carga viral após essa etapa (equação 6).

$$LRV = \log_{10} \frac{\text{carga viral inicial}}{\text{carga viral final}} \quad (6)$$

O LRV total do processo é calculado pela soma da redução viral de cada etapa. Para garantir a segurança do produto dentro das normas GMP espera-se que para todo o processo de purificação o LRV fique entre 17 e 18 (Bolton et al., 2005).

A instabilidade do FVIII foi determinante para a escolha da técnica de filtração viral por membranas. Foi escolhido o filtro *Virosart* da *Sartorius* que é composto por três membranas diferentes com alta densidade de empacotamento e tamanho médio de poro de aproximadamente 20nm. Segundo o fabricante, o filtro apresenta um LRV de 4 para vírus pequenos não envelopados e um LRV de 6 para vírus de grandes envelopados. O modelo *HF Mid-Scale* suporta volumes entre 0,5 e 50 L. Como, o volume resultante da etapa anterior é de 1,4 litros, foi escolhida a menor membrana de 200 cm². A vazão do filtro é uma função da pressão de operação e foi determinada pelo gráfico disponível no manual (Figura 13).

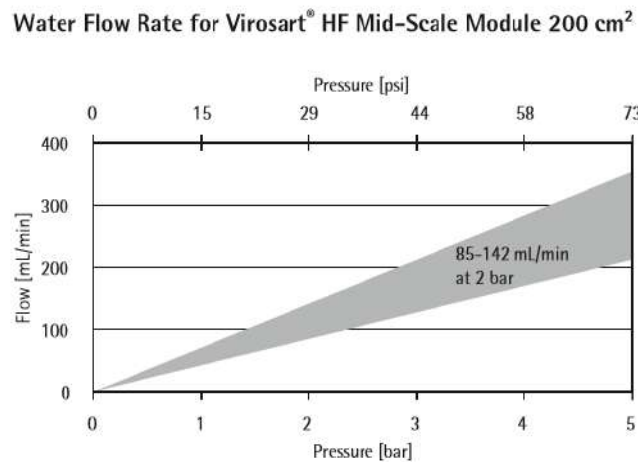


Figura 13 Relação entre vazão e pressão para a membrana *Virosart*® 200 cm². vazão do fluido.

A Tabela 22 mostra os cálculos para dimensionamento do filtro *Virosart*®.

Tabela 22 Parâmetros da filtração viral.

Membrana	<i>Virosart HF Mid-Scale</i>	
Dimensão de poro	20	nm
Fluxo	255	L/h.m2
Área de membrana	200	cm2
Pressão de operação	2	Bar
Vazão do filtro	5,1	L/h
Duração da filtração	0,27	H
Rendimento	95,00	%
Massa de FVIII recuperada	6.581,75	mg

5.2.9 Formulação

O FVIII é comercializado na forma de um pó liofilizado. A liofilização é um processo de estabilização que inclui uma etapa inicial de congelamento seguida de secagem primária e secagem secundária. É preciso adicionar excipientes responsáveis por fornecer suporte mecânico à fase amorfa durante o congelamento e ajudar a manter a estabilidade do FVIII nas etapas de filtração esterilizante e liofilização.

Durante muito tempo, utilizou-se albumina humana como agente estabilizador do FVIII recombinante, no entanto, o risco de contaminação viral envolvido na adição de uma proteína humana torna essa possibilidade pouco atrativa. Alguns dos excipientes alternativos usados nos processos atuais são: manitol, glicina e sacarose (Osterberg, Fatouros, Neidhardt, Warne, & Mikaelsson, 2001).

Cada componente desempenha uma função e deve ser selecionado de acordo com a função desempenhada. O cloreto de sódio é utilizado basicamente como *bulking agent* e garante a solubilidade do FVIII em solução. A concentração ideal de cloreto de sódio adotada para cada formulação varia entre 9 mg/ml e 18 mg/ml (para doses mais concentradas). A sacarose atua como agente estabilizador da fase amorfa no congelamento. O aminoácido histidina funciona como tampão mantendo o pH da solução de formulação em torno de 7,0 evitando a formação de agregados. Íons cálcio

preservam a ligação entre a cadeia leve e pesada mantendo a atividade biológica do produto. Polisorbato 80 também funciona como agente estabilizante além de impedir a adsorção e desnaturação do FVIII. Todos os excipientes utilizados devem ter o maior grau de pureza possível (grau farmacêutico) e atender às especificações previstas na Farmacopeia (Osterberg et al., 2001). Na tabela 23 é descrita a concentração de cada excipiente após reconstituição do pó liofilizado em 4 mL de solução salina para o produto 250UI/ml.

Tabela 23 Excipientes e concentração para produto final.

Composição em solução salina para o produto final no formato de 250UI/ml	
Excipiente	Concentração
Cloreto de sódio	18 mg/mL
Sacarose	3,0 mg/mL
Histidina	1,5 mg/ml
Cloreto de cálcio dihidratado	0,25 mg/mL
Polisorbato	0,1 mg/mL

5.2.10 Filtração esterilizante

O objetivo de incluir uma filtração esterilizante após a formulação do produto é garantir que os excipientes adicionados não modifiquem o perfil de segurança do produto. A operação padrão consiste em empregar sistema de filtração esterilizante com membranas de porosidade média de 0,22 μm .

Foi selecionada membrana *Sartobran da Sartorius* com porosidade de 0,2 μm e área de 0,015 m^2 . A duração desta etapa e os parâmetros de operação estão descritos na tabela 24.

Tabela 24 Parâmetros para a filtração esterilizante do FVIII após a formulação.

Parâmetros filtração esterilizante		
Modelo	<i>Sartobran Maxicap</i>	
Área da membrana	0,015	m^2

Volume a ser processado	0,42	L
Pressão diferencial máxima	2,00	bar
Pressão de operação	1,00	bar
Vazão	75,00	L/h
Fluxo	5.000,00	L/h.m2
Tempo de processamento	0,01	h

5.2.11 Processamento final

O ingrediente farmacêutico ativo após a formulação se encontra pronto para a etapa de envase em fracos ampola, liofilização rotulagem e embalagem. Em função da variação da demanda é possível adaptar a produção de frascos para as diferentes apresentações encontradas no mercado (250 UI, 500 UI, 1000 UI e 1500 UI). Com o objetivo de atender o maior número possível de frascos que poderiam ser fabricados com o total de FVIII produzido foi considerada a apresentação do frasco ampola de 250 UI. A máquina de envase e o liofilizador devem ter, portanto capacidade para produzir 5.355.040 frascos por ano.

6. Estudo de viabilidade econômica

Como já apontado, um dos objetivos desse projeto era fazer uma estimativa preliminar da viabilidade econômica de uma planta para produção de FVIII. Foram realizadas anteriormente as etapas de mapeamento da oportunidade, dimensionamento da demanda de mercado e definição do processo e dos principais equipamentos no intuito de avaliar se o recurso e tempo que uma empresa empregaria seriam proporcionais ao retorno, compensando o risco inerente ao setor de investimento.

Os conceitos de valor presente líquido (VPL), tempo de retorno (*Payback*) e taxa interna de retorno (TIR) obtidos a partir do fluxo de caixa foram escolhidos como principais ferramentas para avaliação econômico financeira do modelo de análise determinístico.

Segundo os dados disponibilizados no portal de transparência pública do governo federal a compra de FVIIIr se dá por meio de licitações. Atualmente o contratado é a Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás), que possui acordo com a *Baxter* para o fornecimento e transferência de tecnologia. Devido ao grande volume de compras centralizadas do governo federal, o valor praticado é muito inferior ao valor vigente no mercado internacional para compras isoladas.

A última licitação disponível no sistema declara que foram gastos 471,5 milhões de reais na compra de 410 milhões de UI de FVIIIr. O valor escolhido para o cálculo da receita foi de 0,32 USD, obtido a partir do valor médio das licitações dos anos de 2016, 2014 e 2013 apresentados na tabela 25. Para o cálculo do valor por UI em dólares foi utilizada a cotação para o início de cada período de vigência do contrato. Nos relatórios do Governo Federal não foi encontrada de forma discriminada a quantidade comprada de cada frasco, apenas a quantidade de UI por contrato.

Tabela 25 Licitações para o FVIII recombinantes (Portal de Transparência Pública).

Nºlicitação	Data da vigência	Valor	Quantidade (UI)	Cotação do dólar	Valor por UI (USD)
000000113/2016	19/02/2016 a 18/02/2017	471.500.000	410.000.000	4,04	0,28
0000001101/2014	09/01/2015 a 08/01/2016	352.800.000	420.000.000	2,63	0,32
0000000188/2013	16/05/2013 a 15/05/2014	257.250.000	350.000.000	2,02	0,36

Um cenário alternativo também foi avaliado usando o valor de mercado vigente nos EUA, que é refletido pelo valor de referência do *Medicare*, o sistema de reembolso de despesas médicas dos EUA. Para o ano de 2017 é descrito o valor de 1,22 USD. Este cenário considera a exportação do produto.

6.1 Investimento total

O Investimento total engloba todos os gastos necessários para colocar uma indústria em condições de operação comercial. Todo o gasto anterior ao início da operação é considerado um investimento fixo, feito para construir os prédios, comprar e instalar todos os equipamentos e sistemas de controle. Os grandes itens que compõe o investimento fixo são os custos diretos, que incluem o ISBL (*Inside Battery Limitis*), OSBL (*Outside Battery Limitis*) e construção de áreas limpas, os custos indiretos, o capital de giro, o custo de partida e de validação (Peters, Timmerhaus, & West, 1991). Para melhor compreensão os principais termos são definidos:

- Custo Direto: representa o conjunto ISBL e OSBL. É usual considerar que o investimento ISBL representa 60% do total e o OSBL 40% do total.

- ISBL: refere-se ao processo em si, inclui todos os custos de equipamentos necessários e essenciais para o processo produtivo assim como, montagem, instalação, controle, instrumentação, entre outros.

- OSBL: engloba o custo de unidades auxiliares responsáveis pela tancagem e estocagem para matérias-primas e produtos, tratamento de efluentes, geração e distribuição de utilidades como vapor, energia e água com variados graus de pureza para diferentes aplicações.

- Custo Indireto: se traduzem em frete e dispêndios como os de projeto conceitual, de licenciamento e gerenciamento da obra.

- Capital de giro: é alocado no início do projeto para atender, por exemplo, as necessidades mínimas de caixa, manutenção de estoque e financiamento de compras.

- Capital de partida: somente associado a pré-operação e início da operação.

- Validação: inclui o custo referente a testes necessários para comprovar que os equipamentos e sistemas operam de forma consistente e atendem aos requisitos das boas práticas de fabricação.

Na indústria de biofármacos, assim como na indústria química, o custo de aquisição de equipamentos representa boa parte do investimento a ser feito. Nesse projeto, foi escolhido o modelo descrito na Tabela 26 para estimativa de custo de investimento, no qual a maior parte dos custos são calculados como uma porcentagem do somatório dos custos de aquisição dos principais equipamentos (Peters et al., 1991).

Tabela 26 Modelo para cálculo dos custos de investimento baseado no custo dos principais equipamentos (Peters et al., 1991).

Item				Custo
Investimento fixo (CIF)	Custos diretos (CD)	ISBL	Aquisição dos equipamentos (AE)	Somatório dos custos dos principais equipamentos
			Instalação dos equipamentos	45% da AE
			Controle e instrumentação	30% da AE
			Tubulações	80% da AE
			Materiais e equipamentos elétricos	20% da AE
	OSBL	-	45% do ISBL	
	Construção das áreas limpas	-	Somatório do custo por m ²	
Custos indiretos (CI)	-	-	25% do CD	
Capital de giro (CG)	-	-	-	15% do CIF
Custos de partida (CP)	-	-	-	10% do CIF
Validação	-	-	-	15% do AE

A estimativa do custo de aquisição de equipamentos foi feita majoritariamente a partir de cotações obtidas diretamente dos fornecedores e somente alguns valores foram

obtidos com base em valores encontrados na literatura para equipamentos similares. Chico 2004, descreveu os preços de biorreatores de diferentes volumes e fabricantes (tabela 27). A partir desses valores, foi fornecida uma curva de custos de biorreatores (figura 14).

Tabela 27 Relação de preços médios de biorreatores com relação ao volume (Chico, 2004).

Volume (L)	Preço (US\$)
10	135.905
50	307.027
70	236.082
150	377.016
500	375.991
500	421.091
1000	521.313

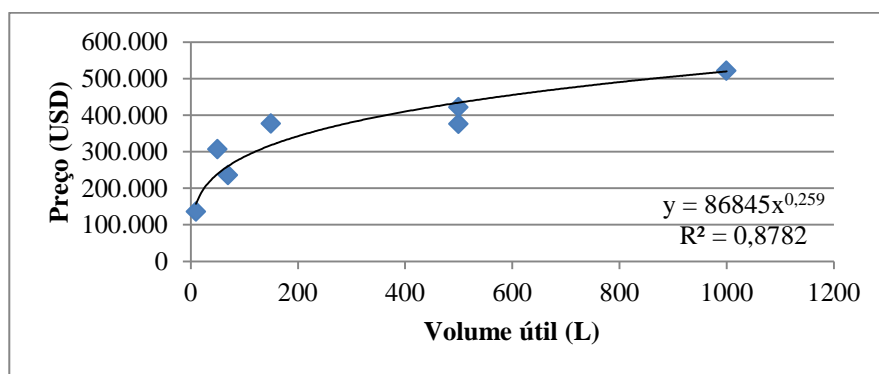


Figura 14 Curva de custos de biorreatores.

O valor para o maior biorreator de 340 litros utilizado para propagação foi calculado a partir da equação obtida por regressão para os valores apresentados na tabela 27. Para o tanque de colheita para armazenamento do produto coletado de 15.000 L, foi utilizada a equação 7 fornecida por Gama, 2005 .

$$Custo (US\$) = 8239,9 \times (Capacidade(m^3))^{0,5374} \quad (7)$$

Ambos os valores obtidos foram corrigidos pelo índice de atualização (IC index) para o ano de 2017. Os demais equipamentos escolhidos e seus respectivos valores se encontram na Tabela 28 e foram obtidos com base em cotações solicitadas a fornecedores.

Tabela 28 Custo de equipamentos.

Equipamento	Fabricante	Unidades	Preço unitário (USD)	Total (USD)
Sistema de criopreservação	-	1	53.400	53.400,00
Biorreator de propagação 4,5-10L <i>Xcellerex XDR-10</i>	GE	1	70.000	70.000,00
Biorreator de propagação 50-2000L <i>Xcellerex XDR-50</i>	GE	1	438.335	438.335,49
Tanque de preparo de meio para propagação 350 L <i>Xcellerex XDUO</i>	GE	1	75.000	75.000,00
Tanque de preparo de meio de cultivo (2500L) <i>Xcellerex XDUO 2500</i>	GE	7	150.000	1.050.000,00
Biorreator 250 L	<i>Eppendorf</i>	47	130.000	6.110.000,00
<i>Settler CS500</i>	<i>Biotechnology solutions</i>	47	35.000	1.645.000,00
Tanque de colheita (15.000 L)	-	3	49.793	298.758,00
<i>Akta process 1"</i>	GE	3	400.000	1.200.000,00
<i>Akta process 1/2"</i>	GE	1	350.000	350.000,00
Coluna <i>axichrom 140/300</i>	GE	1	20.000	20.000,00
<i>Sartoflow advanced</i>	<i>Sartorius</i>	1	50.870	50.870,97
<i>Akta process 3/8"</i>	GE	1	350.000	350.000,00
<i>Sartoflow study</i>	<i>Sartorius</i>	1	29.451	29.451,61
Tanque de formulação 5L	-	1	1.000	1.000,00
Total	-	-	-	11.741.816,07

O custo dos biorreatores de produção representa 52% do custo total de aquisição de equipamentos. O custo para a construção de áreas limpas descrito na Tabela 29 foi calculado considerando uma metragem estimada para cada classe de sala limpa com base no que foi descrito por Petrides, 2013.

Tabela 29 Custo para construção de áreas limpas classificadas

Descrição	Classificação	Área (m2)	Custo US\$/m2	Custo (US\$)
Preparo do inóculo e propagação celular	C	80	4.475	358.000
Sala de biorreatores preparo de meio e colheita	D	500	3.375	1.687.500
Purificação	C	150	4.475	671.250
UF/DF, formulação e envase	A/B	60	9.350	561.000

Os outros itens que compõe o investimento total foram estimados com base no custo de aquisição de equipamentos e apresentados na tabela 30.

Tabela 30 Cálculo do custo total de investimento em infraestrutura.

Item				Custo (mil USD)
Investimento Fixo (CIF)	Custos Diretos (CD)	ISBL	Aquisição dos Equipamentos (AE)	11.741,82
			Instalação dos equipamentos	5.283,82
			Controle e instrumentação	3.522,54
			Tubulações	9.393,45
			Materiais e equipamentos elétricos	2.348,36
	OSBL	-	14.530,50	
	Construção das áreas limpas GMP	-	3.277,75	
Custos Indiretos (CI)	-	-	12.524,56	
Capital de Giro (CG)	-	-	-	9.393,42
Custo de Partida (CP)	-	-	-	6.262,28
Validação	-	-	-	1.761,27
Total				80.039,77

6.3. Custos de produção

O custo de produção corresponde aos custos variáveis como matéria-prima, reagentes, energia, utilidades e os custos fixos de supervisão, mão-de-obra de operação, manutenção, controle de qualidade, taxas e seguros e despesas gerais.

A quantidade das principais matérias primas foi calculada por um balanço de massa simplificado no qual foram considerados consumíveis como resina e membranas assim como os reagentes para as etapas de cultivo, purificação e formulação consumidos em um ano de produção. Os preços para as matérias primas foram obtidos no site da empresa *Sigma Aldrich* e correspondem aos valores das substâncias qualificadas como de grau farmacêutico. Os módulos com membranas foram cotados juntos a empresa *Sartorius*. São listados os principais consumíveis na tabela 31. O custo do meio de cultivo representa 96% do total gasto com consumíveis por ano.

Tabela 31 Custo dos consumíveis utilizados no processo de produção para o ano de 2030.

Componentes	Quantidade por ano	Preço (USD)	Valor total por ano (USD)
Matéria-prima			
Meio TCLECC (litros)	2.789.086,46	38,39	107.064.931,95
L-glutamina (Kg)	3.260,78	513,55	1.674.566,65
Hipoxantina (Kg)	27,89	7.535,48	210.171,16
Timidina (Kg)	5,58	31.767,74	177.205,96
Ácido valérico (ml)	306.289,68	1,58	483.147,27
L histidina (kg)	2,65	867,10	2.296,05
L arginina (Kg)	1,54	326,45	501,43
Acetato de amônio (kg)	29,23	84,13	2.459,19
Cloreto de cálcio (kg)	33,25	122,90	4.087,00
Cloreto de sódio (kg)	1.355,05	35,45	48.038,81
<i>Tween</i> (L)	620,12	31,83	19.737,95
Etilenoglicol (L)	768,00	113,76	87.368,84
Hidróxido de sódio (Kg)	652,09	109,03	71.098,70

Componentes	Quantidade por ano	Preço (USD)	Valor total por ano (USD)
Etanol 100%(L)	453,98	195,16	88.598,93
Resina VIII <i>select</i> (ml)	3.612,53	28,00	101.150,87
Água para injeção (m3)	21,08	26,77	564,29
Sacarose(kg)	160,65	114,58	18.407,54
Histidina (kg)	80,33	867,10	69.650,15
Cloreto de cálcio dihidratado(kg)	13,39	206,13	2.759,58
Polisorbato 80 (Kg)	5,36	176,13	943,18
Consumíveis			
Cartridges Sartopure pp3	189,00	481,94	91.085,81
<i>Sartopore 2XLG</i>	189,00	1.258,71	237.896,13
<i>Sartobind S</i> 4mm 600 ml	15,00	5.162,06	77.430,97
<i>Sartobind Phenyl</i> 1,2L	10,00	6.532,90	65.329,03
<i>Sartobind Q</i> 4mm 400ml	5,00	3.984,00	19.920,00
<i>Hydrosart</i> 10KDa <i>Slice cassette</i> 0,1m2	189,00	910,32	172.050,97
<i>Virosart® HF mid-scale module</i> 200 cm ²	63,00	589,03	37.109,03
Total			110.828.507,42

O custo das etapas de processamento final foi estimado com base em informações de um processo real da indústria biofarmacêutica. Para as etapas de envase e a liofilização foi considerado 1,05 dólares por frasco e para rotulagem e embalagem 0,08 dólares por frasco. Como calculado na seção 5.2.11, operando na capacidade máxima seriam produzidos cerca de 5.355.040 frascos na apresentação de 250 UI por ano, logo o custo de processamento final seria de aproximadamente 6,05 milhões USD por ano. Todas essas etapas poderiam também ser terceirizadas para uma empresa especializada.

Para obter o custo total de produção (CTP) foram consideradas as porcentagens descritas na tabela 32 que conduziu a utilização da equação 8 que utiliza como variáveis o valor total anual para matérias-primas da produção (MP), o custo de processamento final, o ISBL e o valor para investimento fixo (IF) já calculados (Peters et al., 1991).

$$CTP = \frac{MP + CPF + (0,066 \times ISBL) + (0,015 \times IF)}{0,62} \quad (8)$$

Tabela 32 Modelo de cálculo para os custos operacionais (Peters et al., 1991).

Custo total de produção (CTP)			
Item			Custo
Custos variáveis	Matérias primas	-	Somatório dos custos das matérias primas da produção (MP)
	Utilidades	-	15% CTP
	Envase, liofilização embalagem e rotulagem	-	Custo de processamento final (CPF)
Custos fixos	Custos desembolsáveis diretos	Mão-de-obra de operação (MOP)	10% CTP
		Supervisão e chefia	10% MOP
		Cargos de laboratório	10% MOP
		Manutenção	4% ISBL
		Despesas gerais	45% MOP
	Custos desembolsáveis indiretos	Despesas gerais	65% MOP e manutenção
		Impostos e seguros	1,5% Investimento fixo (IF)

Dessa forma o gasto com mão de obra operacional, supervisão e chefia, cargos de laboratório e despesas gerais foram obtidos como uma fração do custo total de operação (tabela 33).

Tabela 33 Despesas operacionais do processo para o ano de 2030.

Item			Custo (mil USD)
Custos Variáveis	Matérias-primas	-	110.828,50
	Utilidades	-	29.020,20
	Custo de processamento final	-	6.051,20
Custos Fixos	Custos desembolsáveis diretos	Mão-de-obra de operação (MOP)	19.346,80
		Supervisão e Chefia	1.934,68
		Cargos de laboratório	1.934,68
		Manutenção	1.328,77
		Despesas gerais	8.706,06
	Custos desembolsáveis indiretos	Despesas gerais	13.439,12
		Impostos e seguros	1.698,88
CTP	-	-	193.468,05

6.4. Demonstração do Resultado de Exercício (DRE)

Para realizar a DRE (tabelas) algumas hipóteses precisaram ser feitas e foram aplicadas para a avaliação dos dois cenários anteriormente descritos para o cálculo da receita. Assumiu-se que a demanda projetada para cada ano, exposta no item 4 de demanda de mercado, seria integralmente comprada pelo governo. A planta começaria a ser construída no ano de 2018, finalizando as obras em 2020, começando a operar em 2021. Projetou-se que a planta iria operar por 10 anos. Esse horizonte de planejamento é justificado pelo desenvolvimento de novas tecnologias e versões do FVIII que podem surgir no mercado competindo com a tecnologia hoje disponível. No entanto, existe a possibilidade de operar por um período mais longo (até 20 anos) ou utilizar as instalações para outros fins.

A taxa mínima de atratividade (TMA), que representa o custo de oportunidade do capital da empresa não pode ser calculada por uma equação simples e consiste em um valor subjetivo. O fator tem como objetivo compensar o risco intrínseco ao projeto e os juros que seriam obtidos na melhor aplicação alternativa do capital investido. Para

empresas farmacêuticas, costuma-se admitir que a TMA varie entre 12 e 14%, portanto, escolheu-se trabalhar com uma taxa de 13%.

A contribuição para o imposto de renda foi definida como uma alíquota de 34%. A perda de valor dos bens físicos ao longo do tempo por obsolescência ou desgaste natural foi considerada pelo emprego de uma depreciação linear durante o período de operação. Esse custo não é desembolsado e incide sobre o lucro operacional reduzindo lucro tributável e conseqüentemente o gasto com imposto de renda. O investimento fixo foi aplicado em parcelas durante os anos de construção, sendo 25% gasto no ano de 2018, 60% no ano de 2019 e 15% no ano de 2020. Ao fim do período de 10 anos projetado todo o capital de giro foi recuperado. Dessa forma, o investimento fixo não manteve nenhum valor residual.

As despesas operacionais contemplam os gastos administrativos, logísticos (frete), comerciais, com pesquisa e desenvolvimento (P&D), entre outros, e chegam a representar 50% dos custos de produção de grandes empresas (Hagel, Jagschies, & Sofer, 2008). No relatório de resultados financeiros da empresa *biofarmacêutica Gilead Sciences* para o ano de 2016, foi descrito uma taxa de 11% para despesas com vendas e despesas administrativas, 14% para despesas com P&D (Gilead Sciences 2016). Considerando uma empresa de menor porte, em que maior parte do que é produzido será absorvido pelo SUS, as despesas operacionais foram calculadas como sendo 20% da receita líquida. As tabelas 34 e 35 mostram respectivamente os resultados da análise econômica para os cenários 1 no qual assumiu-se o valor de 0,32 USD por UI e cenário 2 no qual assumiu-se o valor de 1,22 USD por UI.

Tabela 34 Resultados financeiros do processo de produção do FVIIIr para o cenário 1.

Ano	2021	2022	2023	2024	2025
Receita Líquida	413.180.808	415.711.014	418.133.132	420.445.207	422.646.073
Custo Variável	139.657.216	140.499.580	141.305.959	142.075.702	142.808.422
Custo Fixo (sem depreciação)	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010
Despesas operacionais	82.636.162	83.142.203	83.626.626	84.089.041	84.529.215
Lucro Operacional	142.498.420	143.680.221	144.811.537	145.891.453	146.919.426
Depreciação	6.262.280	6.262.280	6.262.280	6.262.280	6.262.280
Lucro tributável	136.236.140	137.417.940	138.549.256	139.629.173	140.657.146
Imposto	46.320.287	46.722.100	47.106.747	47.473.919	47.823.430
Lucro após IR	96.178.132	96.958.121	97.704.789	98.417.534	99.095.997

Ano	2026	2027	2028	2029	2030
Receita Líquida	424.733.921	426.707.440	428.566.121	430.308.321	431.931.981
Custo Variável	143.503.515	144.160.545	144.779.277	145.359.363	145.899.916
Custo Fixo (sem depreciação)	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010
Despesas operacionais	84.946.784	85.341.488	85.713.224	86.061.664	86.386.396

Ano	2026	2027	2028	2029	2030
Lucro Operacional	147.894.612	148.816.397	149.684.610	150.498.284	151.256.658
Depreciação	6.262.280	6.262.280	6.262.280	6.262.280	6.262.280
Lucro tributável	141.632.332	142.554.117	143.422.330	144.236.004	144.994.378
Imposto	48.154.993	48.468.400	48.763.592	49.040.241	49.298.088
Lucro após IR	99.739.619	100.347.997	100.921.018	101.458.043	101.958.570

Tabela 35 Resultados financeiros do processo de produção do FVIIIr para o cenário 2.

Ano	2021	2022	2023	2024	2025
Receita Líquida	1.562.384.153	1.571.951.766	1.581.110.660	1.589.853.441	1.598.175.702
Custo Variável	139.657.216	140.499.580	141.305.959	142.075.702	142.808.422
Custo Fixo (sem depreciação)	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010
Despesas operacionais	312.476.831	314.390.353	316.222.132	317.970.688	319.635.140
Lucro Operacional	1.061.861.096	1.068.672.822	1.075.193.559	1.081.418.040	1.087.343.130
Depreciação	6.262.280	6.262.280	6.262.280	6.262.280	6.262.280
Lucro tributável	1.055.598.816	1.062.410.542	1.068.931.278	1.075.155.760	1.081.080.849

Ano	2021	2022	2023	2024	2025
Imposto	358.903.597	361.219.584	363.436.635	365.552.958	367.567.489
Lucro após IR	702.957.498	707.453.238	711.756.924	715.865.082	719.775.641

Ano	2026	2027	2028	2029	2030
Receita Líquida	1.598.175.702	1.606.070.601	1.613.533.180	1.620.561.514	1.627.149.397
Custo Variável	142.808.422	143.503.515	144.160.545	144.779.277	145.359.363
Custo Fixo (sem depreciação)	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010
Despesas operacionais	319.635.140	321.214.120	322.706.636	324.112.303	325.429.879
Lucro Operacional	1.087.343.130	1.092.963.956	1.098.276.989	1.103.280.925	1.107.971.145
Depreciação	6.262.280	6.262.280	6.262.280	6.262.280	6.262.280
Lucro tributável	1.081.080.849	1.086.701.675	1.092.014.708	1.097.018.645	1.101.708.864
Imposto	367.567.489	369.478.570	371.285.001	372.986.339	374.581.014
Lucro após IR	719.775.641	723.485.386	726.991.988	730.294.586	733.390.131

6.5. Fluxo de caixa descontado

O fluxo de caixa é construído a partir dos dados obtidos no DRE e inclui o período pré-operação. Os fluxos de caixa são corrigidos para apresentar o valor presente dos benefícios projetados, dessa forma, obtém-se o fluxo de caixa descontado. Esse método demonstra o valor de um ativo e sua capacidade de superar ou não os investimentos feitos. As tabelas 36 e 37 respectivamente apresentam o fluxo de caixa para os cenários 1 e 2.

Tabela 36 Fluxo de caixa para o cenário 1.

Ano	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Entradas							
Receitas operacionais líquidas	-	-	-	413.180.808	415.711.014	418.133.132	420.445.207
Capital de giro recuperado	-	-	-	-	-	-	-
Saídas							
Custos de produção	-	-	-	188.046.226	188.888.590	189.694.969	190.464.712
Custos variáveis	-	-	-	139.657.216	140.499.580	141.305.959	142.075.702
Custos fixos	-	-	-	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010
Despesas operacionais	-	-	-	82.636.162	83.142.203	83.626.626	84.089.041
Investimento total	15.655.700	37.573.681	18.786.841	-	-	-	-
Investimento fixo (CAPEX)	15.655.700	37.573.681	9.393.420	-	-	-	-
Capital de giro	-	-	9.393.420	-	-	-	-
Imposto	-	-	-	46.320.287	46.722.100	47.106.747	47.473.919
Fluxo de caixa	-15.655.700	-37.573.681	-18.786.841	96.178.132	96.958.121	97.704.789	98.417.534
Fluxo de caixa descontado	-15.655.700	-33.251.045	-14.712.852	66.656.270	59.466.231	53.030.245	47.271.765
Ano	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030
Entradas							
Receitas operacionais líquidas	420.445.207	422.646.073	424.733.921	426.707.440	428.566.121	430.308.321	431.931.981
Capital de giro recuperado	-	-	-	-	-	-	9.393.420
Saídas							

Ano	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030
Custos de produção	190.464.712	191.197.432	191.892.525	192.549.555	193.168.287	193.748.373	194.288.926
Custos variáveis	142.075.702	142.808.422	143.503.515	144.160.545	144.779.277	145.359.363	145.899.916
Custos fixos	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010
Despesas operacionais	84.089.041	84.529.215	84.946.784	85.341.488	85.713.224	86.061.664	86.386.396
Investimento total	-	-	-	-	-	-	-
Investimento fixo (CAPEX)	-	-	-	-	-	-	-
Capital de giro	-	-	-	-	-	-	-
Imposto	47.473.919	47.823.430	48.154.993	48.468.400	48.763.592	49.040.241	49.298.088
Fluxo de caixa	98.417.534	99.095.997	99.739.619	100.347.997	100.921.018	101.458.043	111.351.990
Fluxo de caixa descontado	47.271.765	42.121.808	37.518.041	33.404.326	29.730.156	26.449.874	25.689.560

Tabela 37 Fluxo de caixa para o cenário 2.

Ano	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Entradas							
Receitas operacionais líquidas	-	-	-	1.562.384.153	1.571.951.766	1.581.110.660	1.589.853.441
Capital de giro recuperado	-	-	-	-	-	-	-
Saídas							
Custos de produção	-	-	-	188.046.226	188.888.590	189.694.969	190.464.712
Custos variáveis	-	-	-	139.657.216	140.499.580	141.305.959	142.075.702
Custos fixos	-	-	-	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010
Despesas operacionais	-	-	-	312.476.831	314.390.353	316.222.132	317.970.688

Ano	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Investimento total	15.655.700	37.573.681	18.786.841	-	-	-	-
Investimento fixo (CAPEX)	15.655.700	37.573.681	9.393.420	-	-	-	-
Capital de giro	-	-	9.393.420	-	-	-	-
Impostos	-	-	-	358.903.597	361.219.584	363.436.635	365.552.958
Fluxo de caixa	-15.655.700	-37.573.681	-18.786.841	702.957.498	707.453.238	711.756.924	715.865.082
Fluxo de caixa descontado	-15.655.700	-33.251.045	-14.712.852	487.184.808	433.894.320	386.313.142	343.843.262
Ano	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030
Entradas							
Receitas operacionais líquidas	1.589.853.441	1.598.175.702	1.606.070.601	1.613.533.180	1.620.561.514	1.627.149.397	1.633.289.032
Capital de giro recuperado	-	-	-	-	-	-	9.393.420
Saídas							
Custos de produção	190.464.712	191.197.432	191.892.525	192.549.555	193.168.287	193.748.373	194.288.926
Custos variáveis	142.075.702	142.808.422	143.503.515	144.160.545	144.779.277	145.359.363	145.899.916
Custos fixos	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010	48.389.010
Despesas operacionais	317.970.688	319.635.140	321.214.120	322.706.636	324.112.303	325.429.879	326.657.806
Investimento total	-	-	-	-	-	-	-
Investimento fixo (CAPEX)	-	-	-	-	-	-	-
Capital de giro	-	-	-	-	-	-	-
Impostos	365.552.958	367.567.489	369.478.570	371.285.001	372.986.339	374.581.014	376.067.207
Fluxo de caixa	715.865.082	719.775.641	723.485.386	726.991.988	730.294.586	733.390.131	745.668.513
Fluxo de caixa descontado	343.843.262	305.948.297	272.146.163	242.004.607	215.136.276	191.193.086	172.030.116

6.6. Valor presente líquido (VPL)

Quando construído o fluxo de caixa, é possível determinar o valor presente de pagamentos futuros, isto é, a diferença entre o investimento feito e o retorno esperado considerando a TMA adequada. O VPL pode ser calculado a partir da equação 9 e representa a vantagem entre a melhor aplicação do capital e o projeto em questão considerando o risco do empreendimento.

$$VPL = \sum_{t=0}^n \frac{FC}{(1+i)^t} \quad (9)$$

FC= Fluxo de Caixa

i= Taxa Mínima de Atratividade(TMA)

n=duração em anos

Para o cenário 1, foi calculado um VPL de 357.718.679 USD, para o cenário 2, foi calculado um VPL de 2.986.074.480 USD. É possível dizer que em ambos os casos o empreendimento é viável. Porém, outras variáveis também precisam ser avaliadas, visto que não existe uma margem definida que estabelece valores de VPL suficientemente atrativos.

6.7. Taxa interna de retorno (TIR)

A TIR é uma taxa de desconto hipotética que pode ser calculada igualando o valor das despesas, ao valor do retorno dos investimentos (valor presente). É a taxa que torna nulo o VPL de um fluxo de caixa. A TIR oferece não só um julgamento qualitativo como quantitativo e é utilizada como um valor a ser comparado com a TMA. A diferença positiva entre a TIR e a TMA permite avaliar a dimensão do risco associado ao projeto. A TIR calculada para o cenário 1 foi de 73,72% e para o cenário 2 foi de 227,53%. Nos dois cenários a TIR foi muito superior a TMA estabelecida de 13%, logo pode-se dizer que o empreendimento é mais rentável do que o melhor investimento financeiro de mercado. Uma margem grande entre a TIR e a TMA é indicativo de um projeto de baixo risco mesmo considerando o caráter preliminar da avaliação econômica.

O prazo de retorno esperado (*Payback*) demonstra o tempo necessário para que o investidor recupere o capital investido e comece a ter lucro efetivamente. O cálculo é simples e consistem em determinar o período em que o valor presente do benefício obtido se iguala ao valor do investimento inicial. Verificou-se que para o cenário 1 e 2 que o tempo aproximado decorrido entre o investimento inicial e o retorno do capital foi de 3 anos e 2 meses. Este parâmetro fornece uma ideia do grau de liquidez e de risco do projeto sendo adequado à avaliação de projetos com vida limitada.

6.8. Análise de sensibilidade

Toda a análise de sensibilidade foi conduzida para o cenário de vendas para o Ministério da Saúde em que o preço utilizado para o cálculo da receita foi de 0,32 USD por UI. Esse cenário seria o mais conservador e mais sensível devido ao preço muito inferior ao de mercado internacional.

Primeiramente foi avaliada a produção mínima capaz de gerar receita suficiente para cobrir os custos de produção. O custo variável foi calculado para diversas capacidades e somado ao custo fixo (estabelecido para a capacidade máxima). O ponto de nivelamento que zera o lucro foi calculado igualando as equações obtidas por regressão linear (figura 15), dessa forma foi calculado que a capacidade mínima para operar sem prejuízos seria de 56.683 mg, o equivalente a 226.734.233 UI.

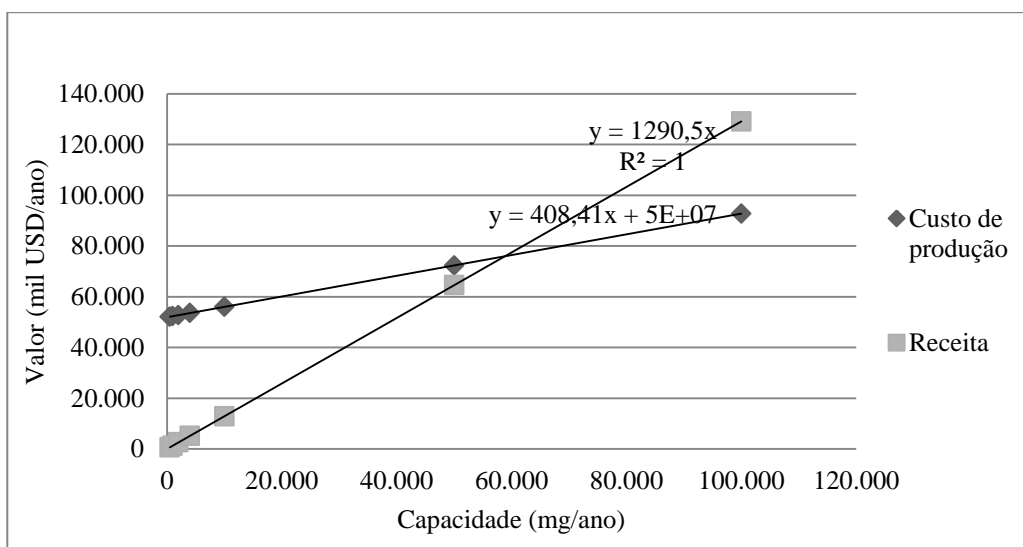


Figura 15 Ponto de nivelamento.

Considerando a operação na capacidade máxima foi determinado o preço mínimo de mercado capaz de garantir um VPL positivo. O valor encontrado novamente por regressão linear foi de 0,20 USD por UI (figura 16).

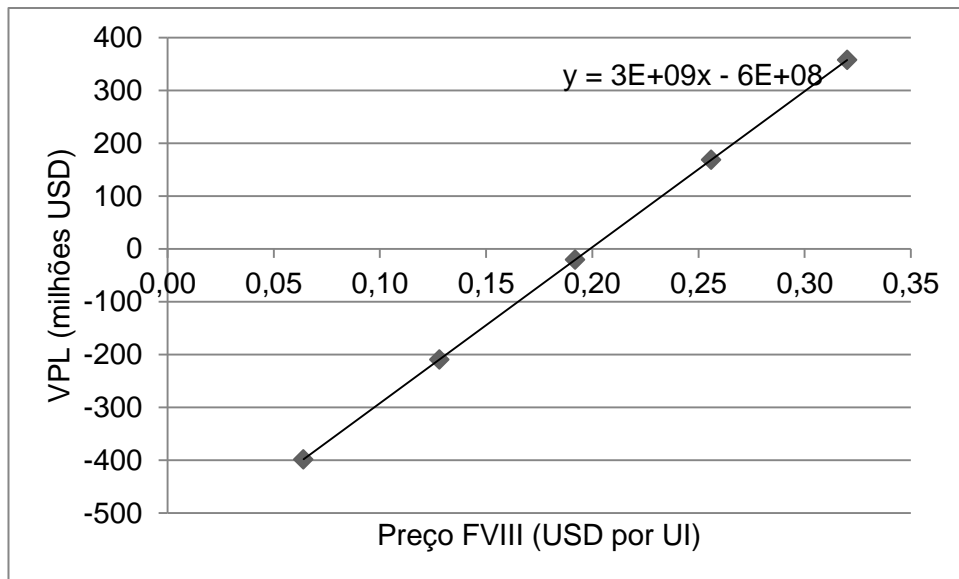


Figura 16 Relação entre preço do FVIII e VPL.

Também se considerou relevante avaliar a influência de flutuações no preço ou na demanda do produto (receita), o custo de aquisição de equipamentos, valor gasto com despesas operacionais e o preço de compra do meio de cultura.

Considerando que a planta foi projetada para operar no seu limite máximo de capacidade, a avaliação de uma demanda superior se justifica pela possibilidade de melhorar a capacidade produtiva da célula ou o rendimento do *downstream* através de investimentos em pesquisa e desenvolvimento. Com um excedente de produção seria possível exportar e aumentar significativamente o VPL e a TIR. O preço de mercado tende a apresentar uma menor variação visto que seria firmado em contratos com o Ministério da Saúde, no entanto um excedente de produção poderia ser exportado a um preço muito superior.

Alterações no custo de aquisição de equipamentos poderiam ocorrer pela necessidade de adição de acessórios, pela mudança nos principais equipamentos escolhidos para a planta, como trocar etapas de cromatografia com membranas por colunas empacotadas ou passar de biorreatores de aço inox para biorreatores do tipo *single use* que acarretariam também em alterações dos principais consumíveis. Porém, essa variável foi sensibilizada de forma independente.

Foi estabelecida para cada parâmetro uma margem de 30% a mais e 30% a menos, com incrementos de 10%. Os resultados obtidos se encontram descritos na tabela 38.

Tabela 38 Análise de sensibilidade do projeto.

	-30,00%	-20,00%	-10,00%	0,00%	10,00%	20,00%	30,00%
Receita							
VPL (mil USD)	74.221	168.720	263.219	357.718	452.217	546.716	641.215
TIR	31%	48%	62%	74%	84%	94%	102%
Aquisição de equipamentos							
VPL (mil USD)	376.823	370.455	364.087	357.718	351.350	344.981	338.613
TIR	91%	84%	79%	74%	70%	66%	62%
Despesas operacionais							
VPL (mil USD)	428.093	404.968	381.343	357.718	334.093	310.469	286.844
TIR	82%	79%	76%	74%	71%	68%	65%
Preço do meio de cultura							
VPL (mil USD)	391.137	379.997	368.858	357.718	346.579	335.439	324.299
TIR	78%	76%	75%	74%	72%	71%	70%

O projeto se mostrou viável em todas as hipóteses mantendo o VPL positivo e TIR com uma boa margem em relação a TMA. Apresentou maior sensibilidade a variações de preço de mercado e demanda e menor sensibilidade a modificações no preço do meio de cultura.

7. Conclusões

A partir da etapa de estimativa da demanda no Brasil, foi proposto um processo em escala industrial utilizando uma tecnologia em desenvolvimento no LECC para a produção de 1,3 bilhões de UI. Os objetivos do projeto foram cumpridos e verificou-se que:

- Como consequência da baixa produtividade específica da célula em questão seria necessário um biorreator de grande volume (aproximadamente 11 mil litros) ou muitos biorreatores de menor volume. Como apresentado, o custo de aquisição de biorreatores nesse caso representa mais da metade do custo total de aquisição de equipamentos. Logo um aumento da produtividade específica teria grande impacto na viabilidade econômica de uma planta para esse processo.
- Sendo o processo proposto em perfusão operando a 2vvd o gasto de meio de cultivo também é muito significativo e influencia principalmente o tempo gasto, a dimensão dos equipamentos das primeiras etapas do *downstream* assim como o custo total de produção.
- Mesmo trabalhando com um preço de venda muito inferior ao de mercado a planta se mostrou economicamente viável considerando todas as hipóteses admitidas com margem de lucro alta, tempo de retorno curto e baixo risco.
- No projeto foi avaliado o cenário menos favorável, no qual foi considerada a obtenção de um produto com baixa atividade específica e um rendimento global de 40% para as etapas do *downstream*. Compreende-se que na prática seria possível obter um produto com maior atividade específica e otimizar o processo para alcançar melhores rendimentos aumentando consideravelmente a atratividade do investimento.

8 Referências bibliográficas

Advate 2016. Acesso em fevereiro de 2016.
http://www.advate.com/myPKFiT/ADVATE_PI_BR.pdf

Alzobie A, Belhani M, Eshghi P, et al. (2013) Establishing a harmonized haemophilia registry for countries with developing health care systems. *Haemophilia*. 19:668–673. DOI: 10.1111/hae.12147

ANVISA. 2010. Considerações e definições para Pesquisa Clínica. Acesso em a 2016.
<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>

Antonarakis, S. E., Rossiter, J. P., Youn, M., Horst, J., de Moerloose, P., Sommer, S. S., ... Inaba, H. (1995). Factor VIII Gene Inversions in Severe Hemophilia. *Blood*, 86(6), 2206–2212.

Arnold, W., & Hiltgartner, M. (1977). The of Joint Surgery. *The Journal of Bone and Joint Surgery.*, 59(68).

Boedeker, B. G. D. (2001). Production processes of licensed recombinant factor VIII preparations. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 27(4), 385–394.
<https://doi.org/10.1055/s-2001-16891>

Bolton, G., Cabatingan, M., Rubino, M., Lute, S., Brorson, K., & Bailey, M. (2005). Normal-flow virus filtration: detection and assessment of the endpoint in bio-processing. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42(Pt 2), 133–142.
<https://doi.org/10.1042/BA20050056>

BOLLATI-FOGOLÍN, M.; COMINI, M. “Clonagem e expressão de proteínas heterólogas em células animais”. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (eds). *Tecnologia do Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica*. 1. ed, Capítulo 1, São Paulo: Roca, 2008

Castilho, L. R., & Medronho, R. A. (2002). Cell Retention Devices for Suspended-Cell Perfusion Cultures, 74, 129–169. https://doi.org/10.1007/3-540-45736-4_7

Charcosset, C. (1998). Purification of proteins by membrane chromatography. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 71(2), 95–110.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199802\)71:2<95::AID-JCTB823>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199802)71:2<95::AID-JCTB823>3.0.CO;2-J)

Cruz, Thayana Araujo da. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM BIOFÁRMACO RECOMBINANTE PRODUZIDO EM CÉLULAS CHO. 2016. Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2015

DEL VALLE, A, Manuel Keeping Biopharmaceutical Cleanrooms Compliant, 2004 Disponível em <http://www.biopharminternational.com/keeping-biopharmaceutical-cleanrooms-compliant>. Acesso em: 10 de dez. 2016.

Eaton, D.;Rodriguez, H; Vekar,G. A. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*, v. 25, n. 2, p. 505–512, 1986.

Evatt, B. (2006). Infectious Disease in the Blood Supply and the Public Health Response. *Seminars in Hematology*, 43(SUPPL. 3), 4–9. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2006.02.001>

Ezban, M., Vad, K., & Kjalke, M. (2014). Turoctocog alfa (NovoEight) - from design to clinical proof of concept. *European Journal of Haematology*, 93(5), 369–376. <https://doi.org/10.1111/ejh.12366>

Fay, P. J. (1993). Factor VIII structure and function. *Thrombosis and Haemostasis*, 70(1), 63–67. <https://doi.org/10.1532/IJH97.05113>

FBH, 2016 Federação Brasileira de Hemofilia <http://www.hemofiliabrasil.org.br/#> Acesso em outubro 2016. Disponível em http://www.hemofiliabrasil.org.br/wp-content/uploads/2016/07/perfil_coagulopatias_hereditarias_brasil_20141.pdf

FBH, 2016 Federação Brasileira de Hemofilia <http://www.hemofiliabrasil.org.br/#> Acesso em outubro 2016. Disponível em http://www.hemofiliabrasil.org.br/wp-content/uploads/2014/05/perfil_coagulopatias_hereditarias_brasil_2012.pdf

FBH, 2016 Federação Brasileira de Hemofilia <http://www.hemofiliabrasil.org.br/#> Acesso em outubro 2016. Disponível em http://www.hemofiliabrasil.org.br/wp-content/uploads/2014/05/perfil_coagulopatias_hereditarias_brasil_2009_2010.pdf

FBH, 2016 Federação Brasileira de Hemofilia <http://www.hemofiliabrasil.org.br/#>
Acesso em outubro 2016. Disponível em http://www.hemofiliabrasil.org.br/wp-content/uploads/2014/05/perfil_coagulopatias_hereditarias_brasil_2007.pdf

FBH, 2016 Federação Brasileira de Hemofilia <http://www.hemofiliabrasil.org.br/#>
Acesso em outubro 2016. Disponível em http://www.hemofiliabrasil.org.br/wp-content/uploads/2014/04/protocolo_inducao_imunotolerancia_pacientes_hemofilia-1.pdf

Ferreira, C. N., Sousa, M O., Dusse, L. M. S. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações.(2010) 416-421 doi 10.1590/S1516-84842010000500016

Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J., Vázquez, E., Villaverde, A.(2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* 8(1) 17 <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-8-17>

Franchini, M. (2010). Plasma-derived versus recombinant Factor VIII concentrates for the treatment of haemophilia A: recombinant is better, 292–296. <https://doi.org/10.2450/2010.0067-10>

Franco, R. F. (2001). Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina*, 34(3–4), 229–237.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Origin. [S.l.]. 1998

GE, Crossflow filtration Method Handbook. Manual de publicação da GEHealthcareBio-SciencesAB,[S.N] 2014, 80 p.

Ghosh, R. (2002). Protein separation using membrane chromatography: Opportunities and challenges. *Journal of Chromatography A*, 952(1–2), 13–27. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00057-2)

Gilead sciences 2016. “Fundamentals – Anual income statement”: Demonstração de resultados anuais. Disponível em <http://investors.gilead.com/phoenix.zhtml?c=69964&p=irol-fundincomea>. Acesso em 08 de dezembro de 2016.

Hagel, L., Jagschies, G., & Sofer, G. (2008). Biopharmaceuticals Today. In *Handbook of Process Chromatography. Development, Manufacturing, Validation and Economics* (pp. 1–22). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374023-6.50003-8>

Healthcare, GE. 2006. “ÄKTAcrossflow Method Handbook.” *gelifesciences*. 01. Acesso em setembro de 2016. [https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314742967685/lit doc11001236AB_20110831014512.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314742967685/lit%20doc11001236AB_20110831014512.pdf)

Kumar, S. R. (2015). Industrial production of clotting factors: Challenges of expression, and choice of host cells. *Biotechnology Journal*, 10(7), 995–1004. <https://doi.org/10.1002/biot.201400666>

Lai, T., Yang, Y., Ng, Say Kong. (2013) Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. *Pharmaceuticals* 5(6) 579-603 DOI 10.3390/ph6050579

Lesnik, R. (1997). 23 Bulk pharmaceutical and biopharmaceutical plant design considerations.

Lillicrap, D., Schiviz, A., Apostol, C., Wojciechowski, P., Horling, F., Lai, C. K., Lollar, P. (2016). Porcine recombinant factor VIII (Obizur; OBI-1; BAX801): Product characteristics and preclinical profile. *Haemophilia*, 22(2), 308–317. <https://doi.org/10.1111/hae.12784>

Mannucci, P. M. (1993). Clinical Evaluation of Viral Safety of Coagulation Factor VIII and IX Concentrates. *Vox Sanguinis*, 64(4), 197–203. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1993.tb03055.x>

McCue, J., Kshirsagar, R., Selvitelli, K., et al. (2015) Manufacturing process used to produce long-acting recombinant factor VIII Fc fusion protein. *Biologicals* 43(4) 213-219 DOI 10.1016/j.biologicals.2015.05.012

Meleady, P., Doolan, P., Henry, M., Barron, N., Keenan, J., O ’sullivan, F., ... Clynes, M. (2011). Sustained productivity in recombinant Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines: proteome analysis of the molecular basis for a process-related phenotype. *BMC Biotechnology*, 11, 78. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-78>

Mellstedt, H., Niederwieser, D., & Ludwig, H. (2008). The challenge of biosimilars. *Annals of Oncology*, 19(3), 411–419. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm345>

- Moreau A, Lacroix-Desmazes S, Stieltjes N, Saenko E, Kaveri SV, D'Oiron R, *et al.* Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe hemophilia A and in normal polyclonal human IgG. *Blood*. 2000;95(11):3435-41
- Morfini, M., & Zanon, E. (2016). Emerging drugs for the treatment of hemophilia A and B. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 8214(August), 1–13. <https://doi.org/10.1080/14728214.2016.1220536>
- Newton-Nash DK, Tollerud D, Guevarra L, Gill JC. Interferon-gamma secretion defects in haemophilia A patients receiving highly purified plasma-derived or recombinant factor VIII. *Br J Haematol*. 1996;95(3):554-60
- Oldenburg, J., Ananyeva, N. M., & Saenko, E. L. (2004). Molecular basis of haemophilia A. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 10 Suppl 4, 133–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2004.01005.x>
- Osterberg, T., Fatouros, a, Neidhardt, E., Warne, N., & Mikaelsson, M. (2001). B-domain deleted recombinant factor VIII formulation and stability. *Seminars in Hematology*, 38(2 Suppl 4), 40–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11449334>
- Paik, S. H., Kim, Y. J., Han, S. K., Kim, J. Y., Park, H., & Park, Y. I. (2012). Comparability studies of new 3rd generation recombinant human factor VIII GreenGene F after improvement of formulation and viral inactivation/removal process. *Biologicals*, 40(6), 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.09.004>
- Pavlou, A. Reichert, J.(2004). Recombinant protein therapeutics-success rates, market trends and values to 2010. *Nature biotechnology* 22(12), 1513-1519 DOI 10.1038/nbt1204-1513
- Peres, B. S., Padilha, G., & Quental, C. (2012). Questões relevantes para a aprovação de medicamentos biossimilares. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 15(4), 748–760. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2012000400007>
- Peters, M. S., Timmerhaus, K. D., & West, R. E. (1991). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*.
- Petrides, D. (2013). *Bioprocess Design and Economics. Bioseparations Science and Engineering*.

Pipe, S. W. (2009). Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia*, 15(6), 1187–1196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2009.02026.x>

Portal da transparência. transparencia.gov.br Acesso em janeiro de 2017. Disponível em

<http://www3.transparencia.gov.br/jsp/licitacoes/licitacaoTexto.jsf?consulta=2&consulta2=0&CodigoOrgao=36000>

Reis, C., Xavier de Lemos Capanema, L., Lins Palmeira Filho, P., Pieroni, J.P., Oswaldo Barros, J., Gomes da Silva, L. BIOTECNOLOGIA PARA SAÚDE HUMANA: TECNOLOGIAS, APLICAÇÕES E INSERÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 29, p. 359-392, mar. 2009

Rondon, Rhaiana. SUS oferta novo medicamento a hemofílicos, 2013. Disponível em: <
<http://www.blog.saude.gov.br/32053-sus-oferta-novo-medicamento-a-hemofilicos.html>
Acesso em: 20 de nov. 2016.

Schellekens, H., & Moors, E. (2010). Clinical comparability and European biosimilar regulations. *Nature Biotechnology*, 28(1), 28–31. <https://doi.org/10.1038/nbt0110-28>

Schulte, S. (2011). Pioneering designs for recombinant coagulation factors. *Thrombosis Research*, 128(SUPPL. 1), S9–S12. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(12\)70003-8](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(12)70003-8)

Searles, J. A., Todd, P., & Kompala, D. S. (1994). Viable Cell Recycle with an Inclined Settler in the Perfusion Culture of Suspended Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology Progress*, 10(2), 198–206. <https://doi.org/10.1021/bp00026a600>

Sekhon, B. S. (2010). Biopharmaceuticals: An overview. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(1), 1–19. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0926-2_1

Shaaltiel, Y., Bartfeld, D., Hashmueli, S., Baum, G., Brill-Almon, E., Galili, G., ... Aviezer, D. (2007). Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnology Journal*, 5(5), 579–590. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00263.x>

Shapiro, A. D. Anti-hemophilic factor (recombinant), plasma/albumin-free method (octocogalpa; ADVATE®) in the management of hemophilia A. *Vascular Health and Risk Management*, v. 3, n. 5, p. 555–565, 2007

- Srivastava, A., Brewer, A. K., Mauser-Bunschoten, E. P., Key, N. S., Kitchen, S., Llinas, A., ... Street, A. (2013). Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*, 19(1), 1–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x>
- Strohl, W. R. (2015). Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs*, 29(4), 215–239. <https://doi.org/10.1007/s40259-015-0133-6>
- STUMM, Vera. Brasil terá nova fábrica de medicamentos biológicos, 2015. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/13759-brasil-tera-nova-fabrica-de-medicamentos-biologicos> Acesso em: 10 de nov. 2016.
- Subramanian, K. . (2015). Perspectives on Technology Trends in Biopharmaceuticals Manufacture. *The Mind of an Engineer*, 433–439. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0119-2>
- Walsh, G. (2002). Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: An issue of nomenclature. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(2), 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00222-6](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00222-6)
- Walsh, G. (2014). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology*, 32(7), 992–1000. <https://doi.org/10.1038/nbt0910-917>
- Wang, W., Wang, Y. J., & Kelner, D. N. (2003). Coagulation factor VIII: Structure and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 259(1–2), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00227-8)
- World federation of Hemophilia (2014) Report on the Annual Global Survey 2014. <http://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1627.pdf>, acessado em dezembro de 2015