



PI 00026948
PI 00026948

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0002694-8

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0002694-8

(22) Data do Depósito: 19/06/2000

(43) Data da Publicação do Pedido: 19/02/2002

(51) Classificação Internacional: A61K 39/205; C12N 5/02; A61P 31/14

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VACINA CONTRA RAIVA EM CÉLULAS VERO, PARA USO HUMANO

(73) Titular: FUNDAÇÃO BUTANTAN, CGC/CPF: 61189445000156. Endereço: Avenida Vital Brasil Nº 1500, Butantã, São Paulo, Brasil (BR/SP), CEP: 05503-900.

(72) Inventor: NEUZA MARIA FRAZATTI GALLINA

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 04/08/2015, observadas as condições legais.

Expedida em: 4 de Agosto de 2015.

Assinado digitalmente por:

Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patentes



"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VACINA CONTRA RAIVA EM CÉLULAS VERO, PARA USO HUMANO".

A presente patente de Invenção refere-se a um novo processo de obtenção de vacina contra raiva em células VERO, para uso humano.

Conforme é do conhecimento dos técnicos no assunto, a vacina contra raiva em células VERO é uma suspensão de vírus rábico purificada e inativada pela Betapropiolactona, obtida a partir de cultura de células VERO infectadas com vírus rábico fixo Pasteur. É usada na imunização de indivíduos contaminados com o vírus da raiva ou com riscos de exposição ao mesmo (veterinários, pesquisadores, pessoas que têm contato com cães, gatos, bovinos e outros animais suscetíveis ao vírus da raiva), respectivamente com esquemas de imunização de pós e pré exposição preconizados pela Organização Mundial de Saúde.

O vírus da raiva é um vírus do tipo RNA, pertencente à família Rabdoviridae, ao gênero Lyssavirus, e infecta o sistema nervoso central. O período de incubação do vírus varia de 1 a 3 meses, havendo, entretanto, casos com período de incubação entre dez dias e 8 meses. A forma mais comum de transmissão do vírus é através de ferimentos produzidos por mordeduras, arranhaduras ou contato de mucosas ou pele ferida com a saliva do animal contaminado pelo vírus. Quando este ultrapassa a barreira da pele, fica temporariamente alojado próximo ao sítio de entrada e, se não for inativado por mecanismos de defesa naturais do

organismo, ou por meios induzidos (vacina contra raiva e soro anti-rábico), o vírus replica-se, penetra nas terminações nervosas, entra no sistema nervoso central (SNC) e chega até o cérebro. O vírus também se expande
5 através dos nervos periféricos para vários tecidos (músculos esqueléticos e do miocárdio, glândulas adrenais e pele). Assim, quando o vírus entra no SNC, a doença se instala ocorrendo, além de outros sintomas característicos, paralisia e morte.

10 Atualmente, a única vacina contra raiva em células VERO licenciada no mundo é a VERORAB, produzida pela "Pasteur Mérieux Connaught" da França, vacina esta feita através da infecção destas células com a amostra de vírus rábico WISTAR PM/WI 38-1503-3M. A obtenção das suspensões
15 virais é em células VERO aderidas a microcarregadores e cultivadas em biorreator.

Os meios de cultura para manutenção das células VERO no biorreator são suplementados com soro fetal bovino ou albumina, e a vacina é purificada por ultrafiltração e
20 ultracentrifugação em gradiente de sacarose. A vacina é comercializada em frascos "unidose" contendo 0,5 ml do produto liofilizado com uma potência de 2,5 UI/ml. O estabilizador usado na liofilização são albumina humana 5%, e maltose.

25 Já a vacina contra raiva para uso humano produzida atualmente no Brasil (por este Requerente e pelo Instituto Tecnológico do Paraná) é a do tipo Fuenzalida & Palacios,

desenvolvida em 1955 e modificada em 11/11/96.

Este tipo de vacina usa como substrato vacinal cérebros de camundongos lactentes infectados com o vírus rábico, sendo que, entretanto, apesar de ser imunogênica e eficaz, dita vacina pode produzir sérios acidentes pós vacinais, reações sistêmicas graves ou neuroparalíticas. Por estas razões, atualmente, no cenário mundial, o uso deste tipo de vacina está restrito a países subdesenvolvidos.

10 No Brasil, no período de 1986 a 1997 foram notificados 546 casos de raiva em humanos e atendidas 4.113.961 pessoas envolvidas em acidentes com animais, das quais 50,07% receberam indicação de tratamento profilático contra raiva. Como a vacina usada atualmente no Brasil
15 (Fuenzalida & Palacios) necessita de um esquema de 10 a 13 doses, dependendo da gravidade e do local onde ocorreu a agressão, a demanda dessa vacina no Brasil é de cerca de 2.000.000 doses/ano.

Estas desvantagens não são apresentadas pela vacina
20 contra raiva em células VERO, a qual, por ser mais potente, necessita de um esquema de vacinação mais curto, ou seja, com 3 a 5 doses, e apresenta reações adversas brandas, não provocando acidentes pós vacinais graves.

Devido ao aprimoramento dos protocolos de registros
25 de acidentes pós vacinais com a vacina do tipo Fuenzalida & Palacios nos postos de atendimento público, principalmente do Estado de São Paulo, o número de acidentes notificados

decorrentes do uso desse tipo de vacina tem aumentado muito nos últimos anos, levando o Ministério da Saúde a ter que importar maiores quantidades de vacina contra raiva em cultivo celular para ser administrada em pessoas alérgicas, com predisposição para problemas neurológicas e baixa resposta imunológica à vacina produzida no Brasil.

A presente invenção descreve um novo processo de obtenção de vacina contra raiva em células VERO visando maior rendimento do produto, e conseqüentemente redução de custos deste imunológico. Para tanto, o referido processo apresenta como principais inovações: o uso de meio de cultura livre de proteínas de origem animal ou humana (VP-SFM) na produção de suspensões de vírus rábico em células VERO aderidas a microcarregadores e cultivadas em biorreator; a purificação do concentrado viral vacinal através de uma resina que reduz a zero o DNA celular residual; e otimização do processo de cultivo de células VERO em biorreator, obtendo-se em tempos menores, maior volume de suspensões de vírus rábico, com melhor título viral.

As principais vantagens do processo aqui inovado consistem no fato de que o uso de um meio de cultura livre de proteínas de origem animal ou humana possibilita maior eficiência da replicação do vírus rábico nas células VERO, permitindo a obtenção, no biorreator, de suspensões com altos títulos virais, e maior grau de pureza; no fato de o emprego de uma resina para purificação do concentrado viral

vacinal que, além de reduzir custos, permite uma purificação mais eficiente, com redução do DNA celular residual a zero.

Considerando tais vantagens, verifica-se que o
5 processo de produção da vacina contra raiva em células VERO, objeto do presente pedido, reduz custos, e origina um produto de melhor qualidade. Ou seja, a vacina resultante apresenta preço competitivo com relação à importada pelo Ministério da Saúde e pode, além de evitar acidentes pós
10 vacinais graves, reduzir a demanda nacional para 1.000.000 doses/ano, diminuindo também gastos com pessoal, seringas, etc.

O objeto da presente Patente de Invenção é um
"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VACINA CONTRA RAIVA EM CÉLULAS
15 **VERO, PARA USO HUMANO"**, o qual prevê a utilização de um meio de cultura livre de proteínas de origem animal ou humana (VP-SFM) na produção de suspensões de vírus rábico em células VERO aderidas a microcarregadores e cultivadas em biorreator, bem como prevê a purificação do concentrado
20 viral vacinal através de uma resina que reduz a zero o DNA celular residual.

Para tanto, o referido processo de preparo de vacina contra raiva em células VERO é constituído das seguintes etapas:

25 a) etapa de preparação do banco de células VERO (Semente e Trabalho) - onde o preparo do banco de células VERO semente (BCS) é feito a partir de subculturas

provenientes de uma ampola contendo células Vero do "Máster Stock" (da Pfizer S.A.), célula esta originária da passagem 124 do American Type Culture Collection - ATCC - (VERO ATCC-CCL81). Já células do BCS são utilizadas para o
5 preparo do banco de células trabalho (BCT). Na produção das suspensões de vírus rábico no biorreator, utiliza-se células do BCT. Os bancos BCS e BCT são armazenados em nitrogênio líquido;

b) etapa de preparação do banco de Vírus Rábico
10 (Semente e Trabalho) - onde os bancos de vírus semente (VRS) e trabalho (VRT) são feitos a partir de suspensões virais obtidas de células VERO, contidas em garrafas, e infectadas com o vírus rábico fixo Pasteur (PV) adaptado em células VERO proveniente do Stock I, do Instituto Pasteur
15 de Paris. O banco de vírus semente é mantido em nitrogênio líquido e o banco trabalho em freezer, a uma temperatura de 70°C negativos. Como nos bancos de células VERO, o VRS dá origem ao VRT, e este é utilizado para infectar as células cultivadas no biorreator;

20 c) etapa de preparação dos meios de cultura - onde, no preparo dos bancos de células VERO e de vírus rábico, é utilizado, para manutenção, o meio de cultura Leibovitz (L₁₅) suplementado respectivamente com 10 e 2% de soro fetal bovino (SFB). Para a produção das suspensões de vírus
25 rábico no biorreator, os meios de cultura usados são, na fase inicial (semeadura), meio L₁₅ suplementado com 5% de SFB, ou meio de cultura livre de proteínas de origem animal

ou humana (VP-SFM) suplementado com 1% de SFB e, após a inoculação do vírus, somente o meio VP-SFM;

d) etapa de produção das suspensões de vírus rábico no biorreator, com as seguintes sub-etapas:

5 - semeadura: onde garrafas com células VERO mantidas em meio L₁₅ suplementado com SFB são tripsinizadas e semeadas na cuba do biorreator contendo microcarregadores e soro fetal bovino, sendo que, para que ocorra aderência das células aos microcarregadores, a cultura é mantida em baixa rotação e a uma
10 temperatura de 36,5°C durante 3 horas. Em todo o processo de cultivo das células no biorreator (crescimento celular e replicação virai), o pH e a concentração de oxigênio dissolvido na cultura são mantidos automaticamente pela adição de gases (O₂, N₂ e CO₂) ;

15 - inoculação do vírus: na qual, quando o crescimento celular atinge a cobertura total de pelo menos 50% dos microcarregadores, o meio de cultura é retirado, a cultura é lavada com uma solução salina tamponada com fosfatos, e em seguida é inoculado o vírus rábico (alíquota proveniente do
20 VRT), sendo que, após o período de adsorção do vírus às células, é colocado o meio de cultura livre de proteínas de origem humana ou animal;

- colheitas das suspensões virais do biorreator: onde são feitas quatro colheitas, uma três dias após a inoculação do vírus e as
25 outras cada 24 horas. As suspensões colhidas são filtradas e estocadas a 70°C negativos;

e) etapa de concentração e purificação - onde as

suspensões virais estocadas a 70°C negativos são descongeladas e concentradas por filtração tangencial utilizando-se o sistema Pellicon. O concentrado obtido é purificado em resina para retenção do DNA celular residual.

5 Durante todo o processo é mantido o pH próximo de 7,0.

f) etapa de inativação e diluição - onde a suspensão de vírus concentrada e purificada é inativada com Betapropiolactona na proporção de 1:4.000. Após a inativação, é retirada uma amostra para o teste de potência
10 da vacina. Com o resultado obtido neste teste, é calculada a diluição final do produto que é feita com solução de salina tamponada com fosfatos, de maneira que cada mililitro da suspensão vacinal tenha no mínimo 2,5 UI.

g) etapa de adição de albumina humana - onde a
15 albumina humana (HSA) é adicionada após a diluição final, sendo que suspensão final deve conter 1% deste componente;

h) etapa da adição de Timerosal - onde, após a diluição final da suspensão final e a adição de HSA, é adicionado o Timerosal na proporção de 1:10.000.

20 Ao longo de todo este processo de produção da vacina contra raiva, são realizados os seguintes testes de controle de qualidade:

nos bancos de células VERO: morfologia celular, cariotipagem, tumorigenicidade, e verificação da ausência
25 de agentes contaminantes através da verificação da ausência de micoplasma, da pesquisa de agentes adventícios em animais, e da verificação da ausência de fungos e

bactérias;

nos bancos de vírus rábico: identidade, titulação do vírus rábico em células BHK₂₁, e verificação da ausência de agentes contaminantes através da pesquisa de agentes
5 adventícios em animais, e da verificação da ausência de fungos e bactérias;

na produção das suspensões de vírus rábico no biorreator: teste de controle das células semeadas através da verificação da morfologia celular e da verificação da
10 ausência de fungos e bactérias, e teste de controle das colheitas de vírus do sobrenadante da cultura do biorreator através da titulação do vírus rábico em células BHK₂₁ e verificação da ausência de fungos e bactérias;

na concentração e purificação das suspensões de vírus
15 rábico: verificação da ausência de fungos e bactérias, titulação do vírus rábico em células BHK₂₁, verificação da ausência de micoplasma, e identidade;

na inativação viral: verificação da ausência de fungos e bactérias, verificação de agentes adventícios em animais,
20 DNA celular residual, prova de potência, verificação da inativação viral, e dosagem de proteínas;

no produto final: prova de potência, toxicidade inespecífica, esterilidade, aspecto e pH, teor de Timerosal, dosagem de proteínas, e estabilidade.

25 O produto final, ou seja, a vacina propriamente dita é apresentada em frasco "unidose", contendo 1,0 ml do produto líquido, com potência de, no mínimo, 2,5 UI/ml.

Assim, oito lotes de vacina contra raiva em células VERO produzidas pela Requerente através do processo aqui descrito, apresentaram resultados satisfatórios em todos os testes preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A média das potências nestes lotes de vacina foi de 8,0 UI/ml, que representa um valor bem superior ao mínimo requerido pela OMS que é de 2,5 UI/ml.

Quanto à pureza do produto, os resultados dos testes de detecção de DNA celular residual foram, para todos os lotes produzidos, igual à zero, sendo que a OMS permite até 100pg de DNA residual por dose de vacina.

Para se avaliar a imunogenicidade do produto, camundongos foram vacinados com três doses de vacina, e os soros obtidos em sangrias exploradoras destes animais foram titulados para se determinar o nível de anticorpos anti-rábicos neutralizantes. Os resultados dos testes demonstraram que em todos os lotes pesquisados houve uma soroconversão de 100% após a segunda dose de vacina.

O estudo da estabilidade da vacina em diferentes temperaturas apresentou resultados satisfatórios para uma vacina líquida.

REIVINDICAÇÕES

1) Processo de obtenção de vacina contra raiva em células vero, para uso humano **caracterizado pelo** fato de ser constituído das seguintes etapas:

- 5 a) etapa de preparação do banco de células VERO (Semente e Trabalho) - onde o preparo do banco de células VERO semente (BCS) é feito a partir de subculturas provenientes de uma ampola contendo células VERO do "Máster Stock" (da Pfizer S.A.), célula esta originária da passagem
10 124 do ATCC (VERO ATCC-CCL81), células do BCS são utilizadas para o preparo do banco de células trabalho (BCT), em que na produção das suspensões de virus rábico no biorreator, utiliza-se células do BCT, onde os bancos BCS e BCT são armazenados em nitrogênio líquido;
- 15 b) etapa de preparação do banco de Virus Rábico (Semente e Trabalho) - onde os bancos de virus semente (VRS) e trabalho (VRT) são feitos a partir de suspensões virais obtidas de células VERO, contidas em garrafas, e infectadas com o virus rábico fixo Pasteur (PV)
20 adaptado em células VERO proveniente do Stock I, do Instituto Pasteur de Paris, onde o banco de virus semente é mantido em nitrogênio líquido e o banco trabalho em freezer, a uma temperatura de 70°C negativos, em que nos bancos de células VERO, o VRS dá origem ao VRT, e este é

utilizado para infectar as células cultivadas no biorreator;

c) etapa de preparação dos meios de cultura - onde, no preparo dos bancos de células VERO e de vírus rábico, é utilizado, para manutenção, o meio de cultura Leibovitz (L₁₅) suplementado, respectivamente, com 10 e 2% de soro fetal bovino (SFB) e para a produção das suspensões de vírus rábico no biorreator, os meios de cultura usados são, na fase inicial (semeadura), meio L₁₅ suplementado com 5% de SFB, ou meio de cultura livre de proteínas de origem animal ou humana (VP-SFM) suplementado com 1% de SFB e, após a inoculação do vírus, somente o meio VP-SFM;

d) etapa de produção das suspensões de vírus rábico no biorreator, com as seguintes sub-etapas:

- semeadura: onde garrafas com células VERO mantidas em meio L₁₅ suplementado com SFB são tripsinizadas e semeadas na cuba do biorreator contendo microcarregadores e soro fetal bovino, sendo que, para que ocorra aderência das células aos microcarregadores, a cultura é mantida em baixa rotação e a uma temperatura de 36, 5°C durante 3 horas, em que todo o processo de cultivo das células no biorreator (crescimento celular e replicação viral), o pH e a

concentração de oxigênio dissolvido na cultura são mantidos automaticamente pela adição de gases (O_2 , N_2 e CO_2) ;

- inoculação do vírus: na qual, quando o crescimento celular atinge a cobertura total de pelo menos 50% dos microcarregadores, o meio de cultura é retirado, a cultura é lavada com uma solução salina tamponada com fosfatos, e em seguida é inoculado o vírus rábico (alíquota proveniente do VRT) , sendo que, após o período de adsorção do vírus às células é colocado o meio de cultura livre de proteínas de origem humana ou animal;

- colheitas das suspensões virais do biorreator: onde são feitas quatro colheitas, uma três dias após a inoculação do vírus e as outras cada 24 horas, em que as suspensões colhidas são filtradas e estocadas a $70^\circ C$ negativos;

e) etapa de concentração e purificação - onde as suspensões virais estocadas a $70^\circ C$ negativos são descongeladas e concentradas por filtração tangencial utilizando-se o sistema Pellicon, concentrado obtido é purificado em resina para retenção do DNA celular residual, em que durante todo o processo é mantido o pH próximo de 7,0;

f) etapa de inativação e diluição - onde a suspensão de vírus concentrada e purificada é inativada com

Betapropiolactona na proporção de 1:4.000, em que após a inativação, é retirada uma amostra para o teste de potência da vacina, onde com o resultado obtido neste teste, é calculada a diluição final do produto, que é feita com 5 solução de salina tamponada com fosfatos, de maneira que cada mililitro da suspensão vacinal tenha no mínimo 2,5 UI;

g) etapa de adição de albumina humana - onde a albumina humana (HSA) é adicionada após a diluição final, sendo que a suspensão final deve conter 1% deste 10 componente;

h) etapa da adição de Timerosal - onde, após a diluição final da suspensão final e a adição de HSA, é adicionado o Timerosal na proporção de 1:10.000

RESUMO

"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VACINA CONTRA RAIVA EM CÉLULAS VERO, PARA USO HUMANO", o qual prevê a utilização de um meio de cultura livre de proteínas de origem animal ou humana (VP-SFM) na produção de suspensões de vírus rábico em células VERO aderidas a microcarregadores e cultivadas em biorreator, bem como prevê a purificação do concentrado viral vacinal através de uma resina que reduz a zero o DNA celular residual.