



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

CARTA PATENTE Nº PI 0202458-6

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 0202458-6

(22) Data do Depósito: 13/06/2002

(43) Data da Publicação do Pedido: 11/05/2004

(51) Classificação Internacional: A61K 39/10; A61P 37/04; C12N 7/02

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VACINA PERTUSSIS ACELULAR

(73) Titular: FUNDAÇÃO BUTANTAN. CGC/CPF: 61189445000156. Endereço: Av Vital Brasil, 1500, Butantã, São Paulo, SP, BRASIL(BR), 05503-900

(72) Inventor: ISAIAS RAW; WALDELY DE OLIVEIRA DIAS; DENISE SILVINA PICCINI QUINTAS HORTON; NOEMI FURUYAMA; WAGNER QUINTILIO; MARIA APARECIDA SAKAUCHI

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 27/02/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 27/02/2018

Assinado digitalmente por:
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patente



"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VACINA PERTUSSIS ACELULAR"

Objetivo: Refere-se o presente invento ao desenvolvimento de uma nova vacina anti-coqueluche acelular, também conhecida como vacina pertussis acelular, e a qual, obtida através do referido processo e a partir de ultrafiltração molecular de filtrados de cultivo de *Bordetella pertussis*, em membrana de 30 kDa, se apresenta mais purificada e menos tóxica do que a vacina pertussis celular tradicional.

Estado da Arte: A coqueluche, também conhecida como pertussis ou "tosse comprida" é uma doença infecciosa causada pela introdução de uma bactéria, a *Bordetella pertussis*, no trato respiratório superior. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, essa doença acomete anualmente cerca de 60 milhões de crianças, sendo responsável por 600000 mortes, principalmente em países subdesenvolvidos ou em vias de desenvolvimento, com condições sanitárias precárias, ou deficiências nos programas de vacinação.

A vacina celular anti-pertussis foi descrita na década de 1940, por Kendrick e colaboradores. É uma vacina preparada com células bacterianas, obtidas à partir de centrifugação ou filtração da cultura em meio líquido, submetida à inativação por formaldeído, timerosal ou tratamento térmico. A imunização com tais vacinas tem sido mundialmente aceita, com eficácia no controle da doença. Embora as vacinas celulares sejam muito eficientes, efeitos

colaterais indesejáveis e por vezes de gravidade considerável, a elas relacionados, levaram ao desenvolvimento das vacinas acelulares, menos tóxicas. As vacinas pertussis acelulares são compostas pelos principais elementos antigênicos da bactéria. Dois componentes receberam especial atenção na composição das vacinas acelulares, como essenciais para a indução do efeito protetor: a toxina pertussis (PT), que é o principal componente das vacinas acelulares até agora descritas e a hemaglutinina filamentosa (FHA). A toxina pertussis é um importante fator de virulência da bactéria, responsável por grande parte de sua atividade tóxica, tendo sido recentemente descrita uma vacina constituída por PT geneticamente destoxificado. A hemaglutinina filamentosa (FHA) é uma proteína relacionada à adesão da bactéria ao sítio de infecção. Outros componentes têm sido introduzidos nas vacinas acelulares mais recentes, como a pertactina ou proteína de 69kDa, uma proteína de membrana externa da bactéria, e fímbrias, também relacionadas à adesão da bactéria. Essas preparações, em sua maioria, diferem entre si qualitativa e/ou quantitativamente quanto aos componentes antigênicos utilizados, uma vez que a formulação final ainda não está totalmente definida.

Na produção das modernas vacinas acelulares, a massa celular bacteriana é descartada e os antígenos componentes da vacina são obtidos por vários passos de cromatografia, à partir de sobrenadantes ou filtrados de

cultivo. Para a obtenção desses antígenos são necessárias várias etapas de purificação exaustiva de cada um dos componentes antigênicos da bactéria, em sua maioria excretados no meio de cultura. As várias etapas de purificação, aliadas ao baixo rendimento do processo encarecem sobremaneira o produto final.

Descrição da Invenção: O presente invento refere-se à obtenção de uma vacina pertussis acelular, à partir de preparações antigênicas semi-purificadas de *Bordetella pertussis*, obtidas por filtração tangencial em membrana de 30kDa, do filtrado de cultivo em fermentador de *Bordetella pertussis*.

Para tanto, primeiramente a nível de bancada, em laboratório, procedeu-se às seguintes etapas:

a) Cultivo de *Bordetella pertussis*, cepa 137 e obtenção de filtrado de cultivo - Cepa liofilizada de *B.pertussis* 137 é ressuspensa em solução salina 0,85%, semeada em tubos com meio de Bordet-Gengou, e incubada a 35°C, por 72 horas. O cultivo é transferido para outro tubo contendo meio de Bordet-Gengou e incubado a 35°C, por mais 24 horas. O crescimento é inoculado em erlenmeyer de 500ml com 100ml de meio Stainer-Scholte modificado, e submetido a 35°, com agitação a 150rpm. Após 18 horas o cultivo é transferido para frascos de 20 litros com 6 litros do mesmo meio e incubado a 35°C, com agitação, por 18 horas. Este cultivo é inoculado em pré-fermentador (150 litros), contendo 60 litros do meio. Após o crescimento bacteriano por 18 horas

a 35°C, 40 litros do crescimento são transferidos para o fermentador (750 litros), com 400 litros do meio de cultivo. Após 18 horas a 35°C, o cultivo é submetido a filtração tangencial (0,22µm), de forma a se obter a massa
5 de células para a produção da vacina celular e o filtrado de cultivo para a obtenção da vacina acelular. São realizados testes de pureza durante todo o processo para avaliar a presença de microrganismos contaminantes.

b) Produção de Lotes Piloto (volumes de filtrado de cultivo de 15 a 30 litros): amostras de 15 a 30 litros de filtrado
10 de cultivo foram submetidas a filtração tangencial em membrana de 30 kDa, obtendo-se frações filtradas pela membrana (Filtrados 30K), que devem ser descartadas e as retidas pela membrana (Concentrados 30K), estas últimas
15 classificadas como Lotes Piloto de Vacina Pertussis Acelular. Estes procedimentos encontram-se resumidos no Esquema 1, apresentado no final deste relatório. Esses lotes foram avaliados por testes imunoquímicos quanto ao seu teor antigênico, toxicidade e esterilidade. Foram
20 produzidos 15 lotes piloto de vacina pertussis acelular, designados como Lotes piloto 2 a 15, numerados na sequência de sua realização.

c) Avaliação dos Lotes Piloto de Vacina Pertussis Acelular:
Foi feita a avaliação imunoquímica dos lotes piloto de
25 vacina acelular (concentrado 30K), tendo sido identificados, em cada um deles, alguns dos elementos antigênicos mais importantes da bactéria (toxina pertussis

- PT e hemagglutinina filamentosa - FHA), por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) contra anticorpos monoclonais homólogos. O conteúdo de endotoxina (lipopolissacarídeo - LPS) das preparações foi estimado por método colorimétrico de dosagem de KDO (2-cet-3-deoxiocetano (3-deoxioctanato), utilizando-se uma curva padrão de KDO purificado. Os resultados da caracterização dos diferentes lotes estão na Tabela I.

Para a produção em escala industrial, procedeu-se ao cultivo bacteriano da mesma forma descrita acima e o filtrado foi processado como a seguir:

a) Produção de Lotes Experimentais em escala industrial (200 a 300 litros): Para o escalonamento do processo em escala industrial, o filtrado de cultivo foi submetido à ultrafiltração molecular, em membrana de 30 kDa , em sistema fechado acoplado à filtração tangencial para separação das células bacterianas. A fração filtrada pela membrana de 30kDa (Filtrado 30K) foi descartada e a que ficou retida (Concentrado 30K), foi submetida à filtração esterilizante (0,22µm), originando a preparação final (Lote experimental), como ilustrado no Esquema 2.

b) Avaliação dos Lotes Experimentais de Vacina Pertussis Acelular - Foram produzidos 7 lotes de vacina pertussis acelular, designados como Lotes experimentais, numerados na seqüência de sua realização. Os lotes foram avaliados por testes imunológicos quanto ao seu teor antigênico, toxicidade e esterilidade. Foram avaliados e identificados

alguns dos elementos antigênicos importantes da bactéria (toxina pertussis - PT e hemagglutinina filamentosa - FHA), por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) contra anticorpos monoclonais homólogos. O conteúdo de LPS das preparações
5 foi estimado por método colorimétrico de dosagem de KDO (2-cet-3-deoxiocetano (3-deoxioctanato), utilizando-se uma curva padrão de KDO purificado. Os resultados dessa caracterização dos diferentes lotes estão na Tabela II.

Considerando-se o valor médio da concentração de
10 toxina pertussis (PT) nas vacinas acelulares descritas na literatura como sendo igual a 20µg/dose, estimou-se o número de doses de vacina acelular obtido em cada lote experimental (Tabela III).

O processo ora inovado é tecnicamente original, à
15 medida em que permite o acoplamento da linha de produção da vacina tradicional com o da nova vacina, permitindo a obtenção simultânea das duas. Nesse processo para a vacina acelular prevalece a utilização de preparações semi-purificadas de filtrados de cultivo, em etapas simples de
20 processamento, resultando num produto composto por uma mistura de antígenos, excretados para o meio de cultivo. A vacina pertussis obtida pelo presente processo, é uma preparação potente e inócua, contendo todos os antígenos que vêm sendo incluídos nas modernas vacinas acelulares. A
25 vacina tem-se mostrado imunogênica, levando a altos títulos de anticorpos e resposta humoral em camundongos. Após destoxificação adequada, a vacina foi avaliada quanto a seu

efeito protetor *in vivo*. Testes realizados em laboratório pela Requerente atestam padrão semelhante de atividade protetora em camundongos, comparáveis ao obtido com a vacina comercial usada como padrão. A simplicidade técnica deste processo implica em redução do custo operacional. A produção de vacina acelular contra coqueluche, a baixo custo, terá um grande impacto na Saúde Pública Nacional, alternativa de uma vacina indicada principalmente para população de risco, como crianças com problemas neurológicos, onde a administração da vacina celular é contra-indicada.

ESQUEMA 1

Amostra: - *B.pertussis* 137, meio SS modificado, fermentador de 400 litros, cultivo de 20h



Filtração tangencial: 0.22 μ m



**Filtrado de cultivo
(15 a 30 litros)**

massa bacteriana



Filtração tangencial (30 kDa)

Vacina pertussis celular



**Filtrado 30K
(descartado)**

**Concentrado 30k (Lote piloto)
(avaliação de PT; FHA e LPS)**

TABELA I

Avaliação de Antígenos nos lotes piloto

Lote Piloto	PT (μg/ml)	FHA (μg/ml)	KDO (μg/ml)
2	26.40	3.00	6.32
3	29.30	3.80	2.56
4	5.28	0.60	3.36
5	26.40	2.25	8.01
6	1.98	0.67	0.71
7	8.80	5.00	5.60
8	16.28	7.00	8.95
9	4.62	0.50	5.90
10	9.25	0.28	4.98
11	3.96	1.16	9.50
12	26.40	6.66	ND
13	29.70	10.00	ND
14	6.60	3.57	ND
15	26.40	8.33	ND

ND = não determinado

ESQUEMA 2

**Amostra: - *B.pertussis* 137, meio SS modificado, fermentador (750 litros);
cultivo de 20h**



Filtração tangencial: 0.22 μ m



Filtrado 0.22 μ m

Massa Bacteriana



ultrafiltração molecular (30 kDa)

Vacina Pertussis Celular



**Filtrado 30K
(descartado)**

Concentrado 30k



Filtração esterilizante (0.22 μ m)

**Vacina Pertussis Acelular (Lote experimental)
(avaliação de PT; FHA e LPS)**

TABELA II

Avaliação de antígenos no filtrado de cultivo e preparações vacinais

LOTE EXPERIMENTAL	Fração	Volume (litros)	Concentração de Antígenos		
			PT (μ g/ml)	FHA (μ g/ml)	KDO (μ g/ml)
2	Filtrado 0.22 μ m	250	0,567	0,08	0,984
	Vacina acelular	5	0,059	0,0	1,369
3	Filtrado 0.22 μ m	250	0,858	0,06	2,827
	Vacina acelular	15	8,250	0,05	1,202
4	Filtrado 0.22 μ m	250	1,32	0,36	2,986
	Vacina acelular	15,8	12,67	1,30	1,077
5	Filtrado 0.22 μ m	250	1,98	0,05	3,532
	Vacina acelular	16,5	18,48	0,08	1,35
6	Filtrado 0.22 μ m	300	0,39	0,008	2,12
	Vacina acelular	17	0,97	0,0	0,94
7	Filtrado 0.22 μ m	300	1,98	0,09	2,26
	Vacina acelular	17,5	9,77	0,04	1,39

TABELA III
Número estimado de doses nos lotes experimentais

LOTE EXPERIMENTAL	volume (litros)	PT (mg)	FHA (mg)	Número estimado de doses
2	5	0,3	0,0	15
3	15	123,7	0,75	6185
4	15,8	200,2	20,54	10010
5	16,5	304,9	1,32	15245
6	17	16,5	0,0	825
7	17,5	170,9	0,70	8545

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de vacina *pertussis* acelular, que utiliza filtrado de cultura da cepa *Bordetella pertussis* 137 como matéria prima para a produção da vacina, **caracterizado pelo** fato de o referido filtrado de cultura obtido por filtração tangencial (0.22µm) ser submetido a ultrafiltração molecular em membrana de 30 kDa, e pelo fato de o concentrado 30K resultante, retido na referida membrana, é o concentrado obtido pela ultrafiltração a ser submetido à filtração esterilizante (0.22µm), originando a vacina *pertussis* acelular.