



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0721393-0

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 0721393-0

(22) Data do Depósito: 22/03/2007

(43) Data da Publicação Nacional: 02/01/2013

(51) Classificação Internacional: A61K 39/12; A61K 39/145; A61K 39/39; C07H 13/06; A61K 39/00.

(52) Classificação CPC: A61K 39/12; A61K 39/145; A61K 39/39; C07H 13/06; A61K 2039/55572; C12N 2760/16034.

(54) Título: MÉTODO PARA OBTER LIPÍDEO A MONOFOSFORILADO DA BORDETELLA PERTUSSIS COMO UM SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE VACINA CELULAR CONTRA COQUELUCHE

(73) Titular: FUNDAÇÃO BUTANTAN. CGC/CPF: 61189445000156. Endereço: AVENIDA VITAL BRASIL, 1500 BUTANTAN, SÃO PAULO, SP, BRASIL(BR), 05503-900

(72) Inventor: ISAIAS RAW; FLÁVIA SALDANHA KUBRUSLY; DMITRI IOURTOV; MARIA APARECIDA SAKAUCHI; FERNANDA LÚCIO DOS SANTOS; SANDRA DE CÁSSIA DIAS; ELAINE DARINI; NOEMI FURUYAMA; SALLY MÜLLER AFFONSO PRADO; HISAKO GONDO HIGASHI.

(87) Publicação PCT: WO 2008/134830 de 13/11/2008

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 22/03/2007, observadas as condições legais

Expedida em: 06/09/2022

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

MÉTODO PARA OBTER LIPÍDEO A MONOFOSFORILADO DA *BORDETELLA PERTUSSIS* COMO UM SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE VACINA CELULAR CONTRA COQUELUCHE

[0001] A presente invenção relaciona-se com a produção do Lipídeo A Monofosforilado de *Bordetella pertussis* (BpMPLA) como um subproduto da produção de vacina celular da coqueluche, mais especificamente como um subproduto da vacina celular contra coqueluche obtida pelo processo desenvolvido por Raw *et al*, na solicitação de patente pendente PCT/BR2004/000172. Mais especificamente, relaciona-se com um método de purificação de BpMPLA a partir do processamento de um extrato alcoólico geralmente rejeitado da coleta inativada final da vacina *Bordetella pertussis*, sujeitando-a a uma coluna de afinidade e enviando a fração de detergente eluída à hidrólise de ácido seguida por neutralização, liofilização e ressuspensão com água para injeção mais detergente suave.

[0002] O novo BpMPLA é usado em aplicações imunoestimuladoras, como um adjuvante da vacina. Mais especificamente, O BpMPLA mencionado é usado como adjuvante para vacina contra gripe com resultados promissores.

[0003] A lise das bactérias gram-negativas faz com que elas liberem lipopolissacarídeo (LPS) a partir da membrana externa de sua parede celular. Para a maioria dos objetivos, os termos lipopolissacarídeos ou LPS e endotoxina são sinônimos. A indução dos anticorpos bactericidas por LPS é bem conhecida, mas diversas reações após a injeção em animais ou humanos contradiz o uso de LPS em vacinas (Luderitz *et al*, 1982; Morrison & Ryan, 1987, Rietschel *et*

al, 1994). Foi observado que o componente de LPS mais responsável pela atividade endotóxica é o Lipídeo A. LPS é composto de um lipídeo hidrofóbico (Lipídeo A), uma cadeia de polissacarídeos de núcleo hidrofílico e uma cadeia lateral de polissacarídeos antigênicos hidrofílicos. O domínio de núcleo hidrofílico consiste em KDO (2-ceto-3-deoxiotônico); heptose e açúcares neutros como a galactose. O antígeno externo consiste em unidades de dois a oito açúcares repetidos muitas vezes. O Lipídeo A abrange um número de espécies que têm a mesma estrutura geral do Lipídeo A (dois resíduos de GlcNAc-P acilados), mas diferem do número de resíduos de ácido graxo. A remoção da hidrólise das cadeias de polissacarídeo de LPS produz o Lipídeo A, tanto ocorrendo naturalmente, na forma de difosforila citotóxica, quanto na forma de monofosforila menos tóxica (Rietschel *et al*, 1987, Caroff *et al*, 1988; Erridge *et al*, 2002).

[0004] A diversidade biológica do Lipídeo A destoxificado é exemplificada por suas atividades multifuncionais, incluindo agir como um adjuvante contra os antígenos da vacina. O Lipídeo A Monofosforilado é um componente do Sistema Adjuvante Ribi (Oureshi *et al*, 1982; Takayama & Oureshi 1991, Gupta & Siber, 1995, Hunter, 2002). O peso molecular aproximado (ou médio) é de 1,7-1,8 kDa, dependendo do número e identidade das cadeias de ácido graxo presentes. A composição do ácido graxo varia dependendo do método de produção.

[0005] Diversos métodos de produção são descritos e eles levam em conta os esforços para atenuar os atributos tóxicos de LPS sem diminuir os benefícios imunoestimuladores

destes compostos. Myers *et al* descreveu métodos de produção de 3D-MLA (2001, 2003). Nestes métodos, o LPS obtido a partir de bactéria gram-negativa de cápsula extremamente rugosa pode sofrer desfosforilização e descarboxilação utilizando soluções minerais ácidas de força moderada (p.ex. 0,1 N HCl) seguido da hidrólise de base (por exemplo, CM 2:1 (v/v) saturada com 0,5M Na₂CO₃ pH 10,5) sob condições controladas seguida de rápida evaporação do solvente. Ou as células sofrem extração com solução de álcool alifático (75 peso percentual do álcool com 1 a 4 carbonos em água) produzindo células pobres em fosfolipídios após extração com clorofórmio e metanol (CM).

[0006] A presente invenção é um método alternativo para obter o Lipídeo A Monofosforilado de *Bordetella pertussis* (BpMPLA) como um subproduto da produção da vacina celular contra coqueluche, para uso em aplicações imunoestimuladoras como um adjuvante da vacina.

[0007] Uma apreciação mais completa da presente invenção e muitas das vantagens dela derivadas são prontamente compreendidas através da descrição detalhada a seguir, em conjunto com os desenhos que acompanham o presente pedido, quais sejam:

[0008] A Figura 1 é um fluxograma da produção de BpMPLA como um subproduto do concentrado de *Bordetella pertussis*;

[0009] A Figura 2 mostra a principal espécie iônica atribuída ao MPLA de *Bordetella pertussis* (BpMPLA);

[0010] A Figura 3 são diagramas mostrando espectros de massa por ionização de MPLA de *Bordetella pertussis*,

ionização positiva (a e b) e ionização negativa (c e d) (ESP -/+ Esquire 3000 plus Bruker);

[0011] A Figura 4 é uma tabela mostrando alguns resultados analíticos de BpMPLA obtidos pelo presente método.

[0012] O objeto da presente patente de invenção é um "MÉTODO PARA OBTER LIPÍDEO A MONOFOSFORILADO DA *BORDETELLA PERTUSSIS* COMO UM SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE VACINA CELULAR CONTRA COQUELUCHE", para uso em aplicações imunoestimuladoras como um adjuvante da vacina.

[0013] Mais especificamente, a presente invenção relaciona-se a um método de purificação de BpMPLA a partir do processamento de um extrato alcoólico geralmente rejeitado, suspenso ou filtrado a partir da coleta inativada da vacina de *Bordetella pertussis* (subproduto da produção da vacina principal).

[0014] De acordo com a Figura 1, o presente método apresenta as seguintes etapas:

a) Tratamento alcoólico da coleta inativada da vacina de *Bordetella pertussis* (1) (1g da massa úmida a 20ml da solução de solvente - 1g/20ml);

b) Centrifugação ou filtração do fluxo tangencial (2) do referido tratado alcoólico da vacina de *Bordetella pertussis*, resultando em um extrato alcoólico, suspenso ou filtrado (3);

c) Submissão do referido extrato alcoólico, suspenso ou filtrado (3) obtido a partir da coleta inativada da vacina de *Bordetella pertussis* a uma coluna de afinidade (4), mais especificamente a uma coluna de afinidade de endotoxina, que

usa o ligante polimixina B imobilizada, resultando em uma fração de endotoxina enriquecida;

d) Eluição da referida fração enriquecida de endotoxina com deoxicolato de sódio (1% DOC) (5);

e) Envio da referida fração eluída à hidrólise de ácido, com ácido acético (2N Hac) a 100°C durante 60 minutos (6);

f) Filtração, mais especificamente, filtração de papel simples (7), para separar o precipitado de detergente;

g) Evaporação do ácido sob vácuo (8);

h) Neutralização ao pH 5-6 (9), seguindo de uma filtração estéril (10), resultando no novo BpMPLA (11);

i) Distribuição e liofilização (12) do referido novo BpMPLA;

j) Ressuspensão (13) do referido novo BpMPLA com água para injeção (WFI) mais detergente antes do uso.

[0015] O novo BpMPLA é usado em aplicações imunoestimuladoras, como um adjuvante da vacina. Mais especificamente, o BpMPLA suspenso mencionado é usado como adjuvante para vacina contra gripe.

Exemplo 1:

Métodos Gerais:

Preparação do Lipídeo A Monofosforilado de *Bordetella pertussis* (BpMPLA) a partir da coleta inativada da vacina de *Bordetella pertussis* (BpMPLA)

Obtenção do filtrado rejeitado:

[0016] A coleta inativada da vacina *Bordetella pertussis* foi concentrada pela filtração do fluxo tangencial antes do tratamento com solução alcoólica para diminuição da contaminação de LPS por lipídeos e proteínas. Para a

realização desta etapa, deve ser conhecida a massa úmida/ml da coleta inativada Volume Final *Bp*, e então calcular a cada 1g de massa úmida a 20ml da solução de solvente (1g/20ml). Após o tratamento alcoólico, uma nova filtração de fluxo tangencial foi feita para remover o solvente e o filtrado rejeitado foi utilizado como material inicial para purificar o *BpMPLA*. A determinação de KDO foi realizada nesta etapa.

Obtenção da fração rica em endotoxina:

[0017] O filtrado rejeitado foi, então, passado por uma coluna de afinidade de endotoxina (coluna de polimixina) e eluída com 1% de solução de deoxicolato de sódio (1% DOC) com o volume máximo de 2 volumes da coluna. A capacidade de ligação da endotoxina por ml de gel foi anteriormente determinada para a coleta inativada de *Bordetella pertussis* para evitar sobrecarga. A capacidade ligante do gel de até 2mg LPS/ml foi determinada. A cromatografia de afinidade foi realizada em temperatura do refrigerador (2-8°C). A amostra foi lentamente bombeada sobre o gel por períodos determinados de tempo (8-16hr), em vez de usar uma simples filtração gravitacional pela coluna. O volume da fração rica em endotoxina eluída foi determinado, e também o conteúdo de KDO.

Hidrólise do ácido da fração rica em endotoxina:

[0018] A fração rica em endotoxina (s) foi então submetida a uma hidrólise de ácido com 2N de ácido acético (v/v) a 100°C durante uma hora. O precipitado de detergente foi removido pela filtração com papel antes da evaporação do ácido sob vácuo seguida de um ajuste de pH a pH 5-6 com 3N de NaOH. O filtrado neutralizado recuperado rendeu o *BpMPLA*

e deve ser um material negativo para a determinação de KDO. A avaliação do fósforo foi realizada para determinar a concentração do Lipídeo A.

Filtração estéril, distribuição e liofilização de BpMPLA:

[0019] O BpMPLA foi submetido à filtração esterilizante com membrana de PVDF com porosidade de 0,22 µm antes da distribuição e da liofilização sem nenhum estabilizador ou crioprotetor. O líofilo de BpMPLA foi analisado por espectrometria de massa.

Ressuspensão do BpMPLA:

[0020] A ressuspensão dos frascos com BpMPLA foi realizada com água para injeção, que continha um detergente suave para evitar agregação.

Exemplo 2:

Métodos Analíticos:

Ensaio calorimétricos:

[0021] O espectrofotômetro foi utilizado para todos os ensaios calorimétricos.

Determinação de KDO:

[0022] O ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBA) de Karkhanis *et al* (1978) foi utilizado para determinação de KDO.

Ensaio de fósforo:

[0023] Neste procedimento, o fosfato contido em amostras do Lipídeo A é satisfatoriamente estimado por determinação de fósforo (Rouser *et al*, 1970).

Análise de BpMPLA por espectrometria de massa:

[0024] A espectrometria de massa foi a ferramenta analítica utilizada para medir a massa molecular de BpMPLA. A amostra foi inserida diretamente na fonte de ionização, ou passou por cromatografia de líquido em alta pressão (HPLC) *en route* à fonte de ionização. O método de ionização utilizado foi a Ionização por Eletrospray (ESI). Para detectar os íons negativamente carregados da amostra, a análise foi feita utilizando o modo de ionização negativa. O equipamento usado foi o Esquire 3000 plus, Bruker.

[0025] A Figura 2 mostra a principal espécie iônica atribuída ao MPLA de *Bordetella pertussis* (BpMPLA).

[0026] A Figura 3 são diagramas mostrando espectros de massa por ionização tipo Eletrospray (ESI) de BpMPLA, ionização positiva (a e b) e ionização negativa (c e d) (ESP +/- Esquire 3000 plus Bruker). Os resultados das análises de massa de BpMPLA mostraram que a principal espécie iônica observada foi 1291.7 m/z.

[0027] A Figura 4 é uma tabela mostrando alguns resultados analíticos de BpMPLA obtidos pelo presente método.

Referências:

[0028] Caroff M, Tacken A, Szabó L (1988) - *Detergent-accelfoited hydrolysis of bacterial endotoxins and determination of the anomeric configuration of glycosyl phosphate present in the "isolated lipid A" fragment of the Bordetella pertussis endotoxin*. Carbohydr Res 2:273-82.

[0029] Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR (2002) - *Structure and function of lipopolysaccharides*. Microbes Infec 4:837-51.

[0030] Gupta RK & Siber GR (1995) - *Adjuvants for human bacines - current status, problems and future prospects*. Vaccine 13: 1263-76.

[0031] Hunter, RL (2002) - *Overview of vaccine adjuvants: present and future*. Vaccine 20: S7-S12.

[0032] Karkhanis YD Zeltner JA, Jackson JJ, Carlo DJ (1978) - *A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria*. Anal. Biochem. 85:595-601.

[0033] Luderitz O, Galanos C, Rietschel ET (1982) - *Endotoxins og Gram-negative bacteria*. Pharm Ther 15: 383-402.

[0034] Morrison DC & Ryan JL (1987) - *Endotoxins and disease mechanisms*. Ann Rev Med. 38: 417-32.

[0035] Myers KR, Snyder DS (2003) - *Methods for the production of 3-O-deactivated-4' -monophosphoryl lipid a (3D-MLA)* -United States Patent Application 20030031684 -Kind Code A1 February 13, 2003, Corixa Corporation, Seattle WA.

[0036] Myers KR, Snyder DS, Blackman C, Whitaker - K *3-O -deacylated-4' - monophosphoryl Lipid A (3D-MLA)* - (2001) USPTO 60280089.033001.

[0037] Oureshi N, Takayama K, Ribi E (1982) - *Purification and structural determination of non-toxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of Salmonella thyphimurium*. -J Biol Chem 257: 11808-165.

[0038] Raw I, Kubrusly FS, Dias WO, Esteves MI, Furuyama N, Horton DSPQ, Leme E, Quintilio W, Sakauchi MA, Prado SMA, Higashi HG - *Process for obtention of new cellular pertussis vaccine* - PCT/BR2004/000172 - WO/2006/002502.

[0039] Rietschel ET, Brade H, Brade L, Brandenburg K, Schade FU, Seydel U, Zahringer U, Galanos C, Luderitz O, Westphal O, Labischinski H, Kusumoto S, Shiba T (1987) - *Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysacharides: relation of chemical structure to biological activity*. Prog Clin Biol Res 231: 25-34.

[0040] Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova FE, Schreier M, Brade H (1994) - *Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function*. FASEB J 8: 217-225.

[0041] Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto - *A Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots*. Lipids. 1970 5(5): 494-6.

[0042] Takayama KK, Oureshi N (1991) - *Novel lipid A derivatives and uses therefore*. WO 91/01134- PCT/US90/04145.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para obter lipídeo A monofosforilado da *Bordetella pertussis* (BpMPLA) como um subproduto da produção de vacina celular contra coqueluche, mais especificamente, método de purificação de BpMPLA para aplicações imunostimuladoras e como um adjuvante de vacina, a partir do processamento de um extrato alcoólico geralmente rejeitado ou filtrado da coleta inativada da vacina de *Bordetella pertussis* (subproduto da produção de vacina principal), **caracterizado pelo** fato de compreender as seguintes etapas:

a) Tratamento alcoólico da coleta inativada da vacina *Bordetella pertussis* (1) (1g da massa úmida a 20ml da solução de solvente - 1g/20ml);

b) Centrifugação ou filtração de fluxo tangencial (2) do tratado alcoólico da vacina *Bordetella pertussis*, resultando em um extrato alcoólico, suspenso ou filtrado (3);

c) Submissão do extrato alcoólico, suspenso ou filtrado (3) a partir da coleta inativada da vacina de *Bordetella pertussis* a uma coluna de afinidade (4), mais especificamente a uma coluna de afinidade de endotoxina, que usa como ligante polimixina B imobilizada, resultando em uma fração enriquecida de endotoxina;

d) Eluição da fração enriquecida de endotoxina com deoxicolato de sódio (1% DOC) (5);

e) Envio da fração eluída à hidrólise de ácido, com ácido acético (2N Hac) a 100°C durante 60 minutos (6);

f) Filtração, mais especificamente, filtração com papel

simples (7), para separar o precipitado de detergente;

g) Evaporação do ácido sob vácuo (8);

h) Neutralização ao pH 5-6 (9), seguido de uma filtração esterilizante (10), resultando no novo *BpMPLA* (11);

i) Distribuição e liofilização (12) do novo *BpMPLA*;

j) Ressuspensão do novo *BpMPLA* com água para injeção mais detergente (12) antes do uso.

FIG. 1

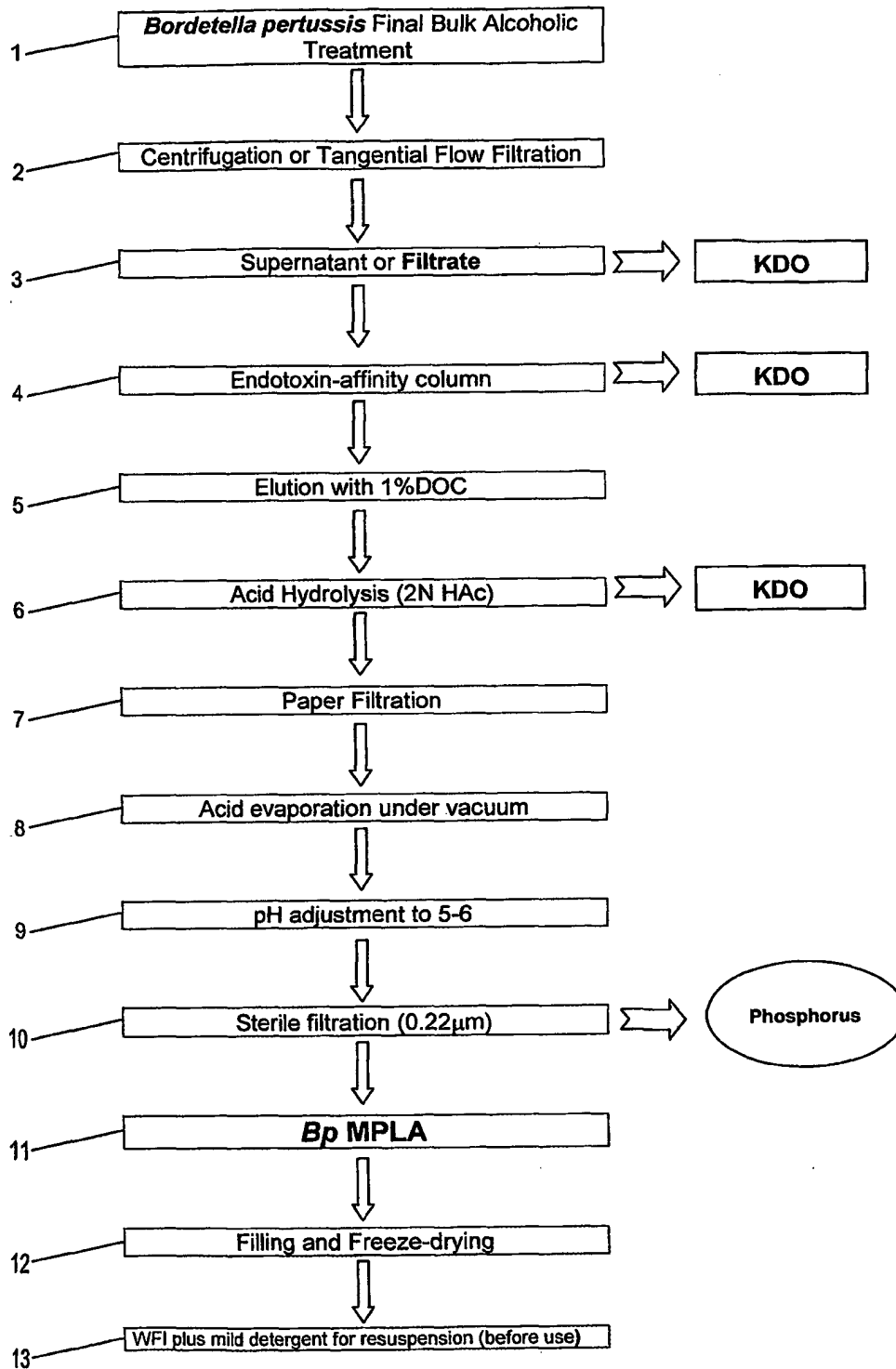
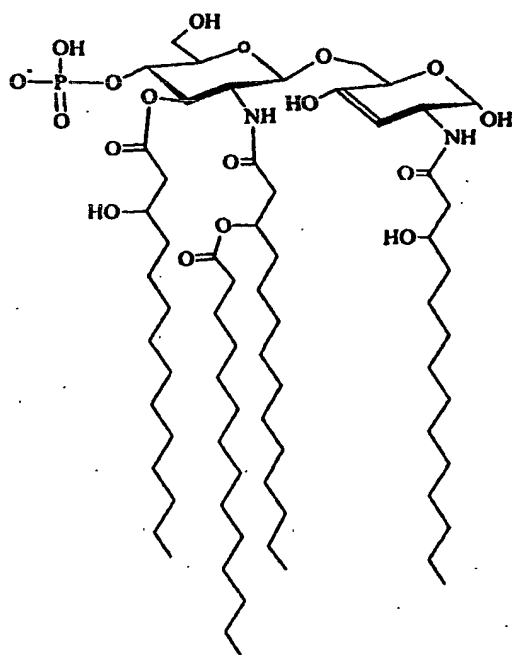


FIG. 2**FIG. 4**

Test	Results	Limits
Electrospray Mass Spectrometry (ESI-MS)	1267-1291	Adjuvant Property
Phosphorus	775 nmolesP/mg	400-800 nmolesP/mg
KDO	<1.0% (0,03%)	<1.0%

FIG. 3

