



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0721393-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 22/03/2007**

**(45) Data de Concessão: 18/08/2020**

---

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

**(51) Int.Cl.:** A61K 39/12; A61K 39/145; A61K 39/39; C07H 13/06; A61K 39/00.

**(52) CPC:** A61K 39/12; A61K 39/145; A61K 39/39; C07H 13/06; A61K 2039/55572; (...).

**(73) Titular(es):** FUNDAÇÃO BUTANTAN.

**(72) Inventor(es):** 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.

**(86) Pedido PCT:** PCT BR2007000073 de 22/03/2007

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

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 22/09/2009

**(57) Resumo:** MÉTODO PARA OBTER LIPÍDEO A MONOFOSFORILADO DA BORDETELLA PERTUSSIS COMO UM SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE VACINA CELULAR CONTRA COQUELUCHE, mais especificamente, um método de purificação de BpMPLA 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, método de purificação de BpMPLA este que compreende o processamento de um extrato alcoólico geralmente rejeitado da coleta inativada de Bordetella pertussis, a submissão deste extrato final a uma coluna de afinidade e o envio da fração eluída de detergente à hidrólise ácida seguida por neutralização, liofilização e ressuspensão com água para injeção acrescida de detergente suave; o novo BpMPLA é usado em aplicações imunostimuladoras, mais especificamente, como um adjuvante de vacina e, ainda mais especificamente, como um adjuvante de vacina contra gripe, com resultados promissores.

**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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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, Ribí 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 imunoestimuladoras 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;

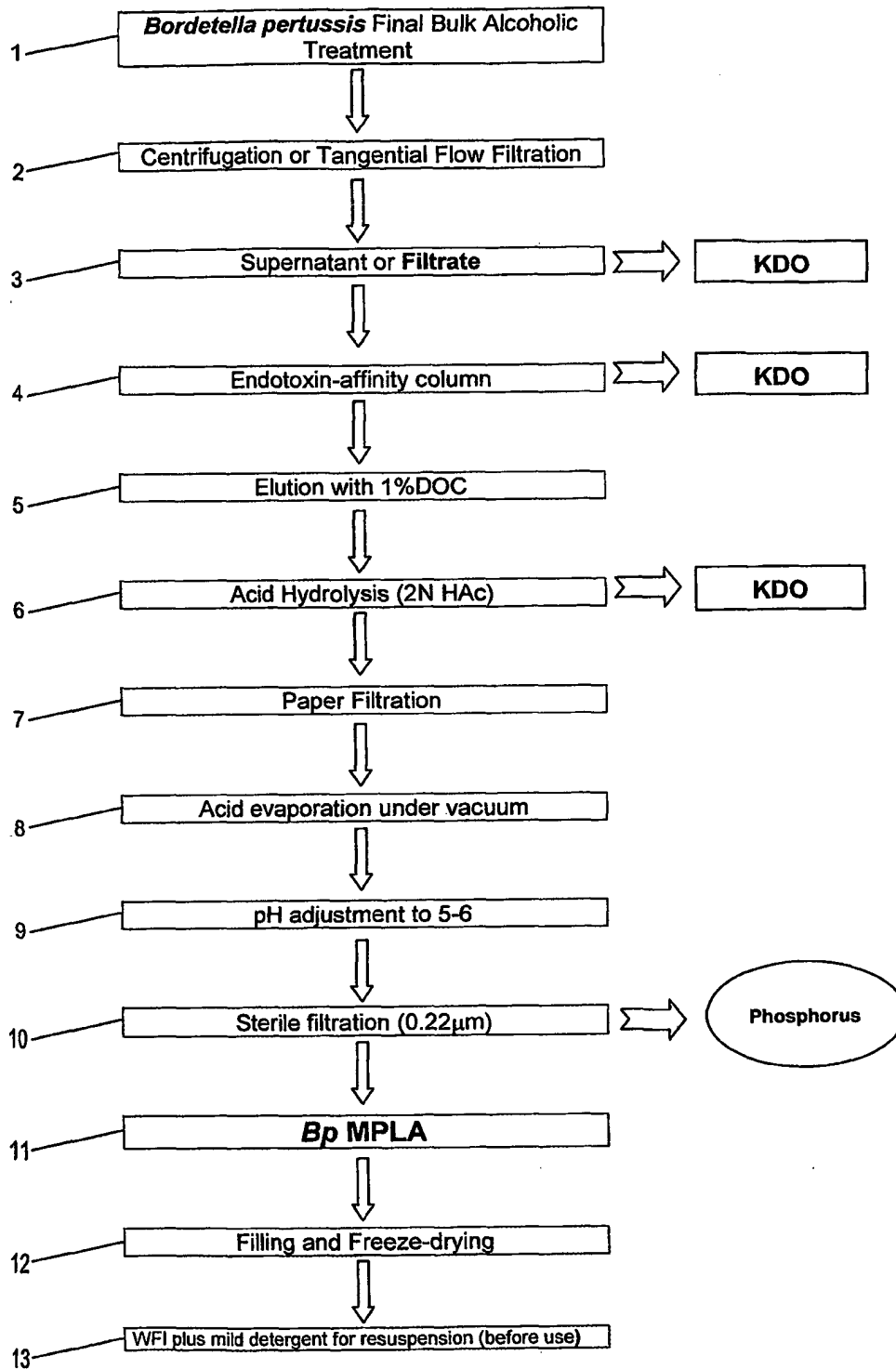
g) Evaporação do ácido sob vácuo (8);

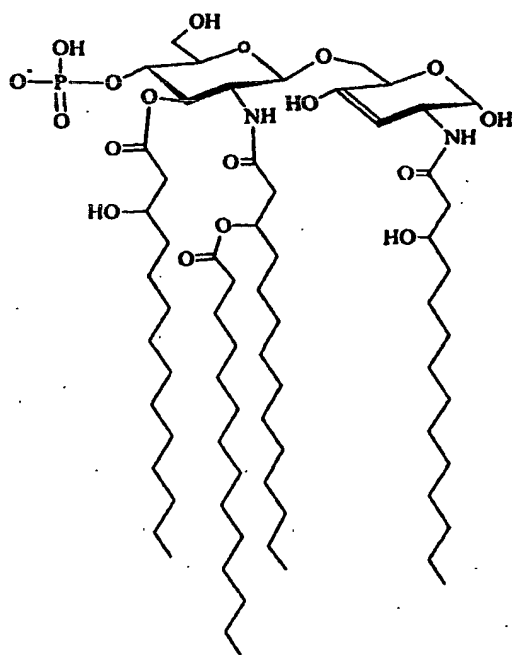
h) Neutralização ao pH 5-6 (9), seguido de uma filtração esterilizante (10), resultando no novo BpMPLA (11);

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**

