

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0721393-0 A2**

(22) Data de Depósito: 22/03/2007  
(43) Data da Publicação: 02/01/2013  
(RPI 2191)



(51) *Int.Cl.:*  
C07H 13/06  
A61K 39/10

**(54) Título:** MÉTODO PAEA OBTER LÍPIDEO A MONOFOSFORILADO DA BORDETELLA PERTUSSIS COMO UM SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE VACINE CELULAR CONTRA COQUELUCHE

**(73) Titular(es):** Fundação Butantan

**(72) Inventor(es):** DMITRI IOURTOV, ELAINE DARINI, FERNANDA LÚCIO DOS SANTOS, Flávia Saldanha Kubrusly, Hisako Gondo Higashi, ISAIAS RAW, MARIA APARECIDA SAKAUCHI, NOEMI FURUYAMA, SALLY MÜLLER AFFONSO PRADO, SANDRA DE CÁSSIA DIAS

**(74) Procurador(es):** Britânia Marcas e Patentes S/C Ltda

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

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

**(57) Resumo:** TODO PARA OBTER LÍPIDEO 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 pertus.sis (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"**

A presente invenção relaciona-se com a produção do  
5 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  
10 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  
15 enviando a fração de detergente eluída à hidrólise de  
ácido seguida por neutralização, liofilização e  
ressuspensão com água para injeção mais detergente suave.  
O novo **BpMPLA** é usado em aplicações imunoestimuladoras,  
como um adjuvante da vacina. Mais especificamente, o  
20 **BpMPLA** mencionado é usado como adjuvante para vacina  
contra gripe com resultados promissores.

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  
25 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  
5 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 O hidrofílicos. O domínio de núcleo hidrofílico consiste em KDO (2-ceto-3-deoxiotônico);  
10 heptose e açúcares neutros como a galactose. O antígeno O 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  
15 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,  
20 2002).

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  
25 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.

Diversos métodos de produção são descritos e eles  
5 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  
10 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  
15 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 fosfolípidios após extração com clorofórmio e metanol (CM).

20 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.

25 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:

- A Figura 1 é um fluxograma da produção de **BpMPLA** como um subproduto do concentrado de *Bordetella pertussis*;
- 5 - A Figura 2 mostra a principal espécie iônica atribuída ao **MPLA** de *Bordetella pertussis* (**BpMPLA**);
- 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 -/+  
10 Esquire 3000 plus Bruker);
- A Figura 4 é uma tabela mostrando alguns resultados analíticos de **BpMPLA** obtidos pelo presente método.

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

Mais especificamente, a presente invenção relaciona-se a um método de purificação de **BpMPLA** a partir  
20 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).

De acordo com a Figura 1, o presente método  
25 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  
5 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  
10 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);  
15

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  
20 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.

25 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***  
5 ***pertussis* (BpMPLA) a partir da coleta inativada da vacina**  
**de *Bordetella pertussis* (BpMPLA)**

**Obtenção do filtrado rejeitado:**

A coleta inativada da vacina *Bordetella pertussis* foi concentrada pela filtração do fluxo tangencial antes  
10 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  
15 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.

20 **Obtenção da fração rica em endotoxina:**

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  
25 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  
5 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:**

A fração rica em endotoxina (s) foi então  
10 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  
15 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:**

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

#### **Ressuspensão do BpMPLA:**

25 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:**

O espectrofotômetro foi utilizado para todos os  
5 ensaios calorimétricos.

**Determinação de KDO:**

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

**10 Ensaio de fósforo:**

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:**

15 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  
20 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.

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

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.

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

#### Referências:

- 10 - 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-  
15 82.
- Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR (2002) - Structure and function of lipopolysaccharides. Microbes Infec 4:837-51.
- Gupta RK & Siber GR (1995) - Adjuvants for human bacines  
20 - current status, problems and future prospects. Vaccine 13: 1263-76.
- Hunter, RL (2002) - Overview of vaccine adjuvants: present and future. Vaccine 20: S7-S12.
- Karkhanis YD Zeltner JA, Jackson JJ, Carlo DJ (1978) - A  
25 new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. Anal. Biochem. 85:595-601.

- Luderitz O, Galanos C, Rietschel ET (1982) - Endotoxins og Gram-negative bacteria. Pharm Ther 15: 383-402.
- Morrison DC & Ryan JL (1987) - Endotoxins and disease mechanisms. Ann Rev Med. 38: 417-32.
- 5 - 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.
- Myers KR, Snyder DS, Blackman C, Whitaker - K 3-O -  
10 deacylated-4'- monophosphoryl Lipid A (3D-MLA) - (2001) USPTO 60280089.033001.
- Oureshi N, Takayama K, Ribi E (1982) - Purification and structural determination of non-toxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Salmonella thyphimurium*. -  
15 J Biol Chem 257: 11808-15.
- 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.
- 20 - 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 lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity.  
25 Prog Clin Biol Res 231: 25-34.
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F,

Schreier M, Brade H (1994) - Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J 8: 217-225.

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

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

## REIVINDICAÇÕES

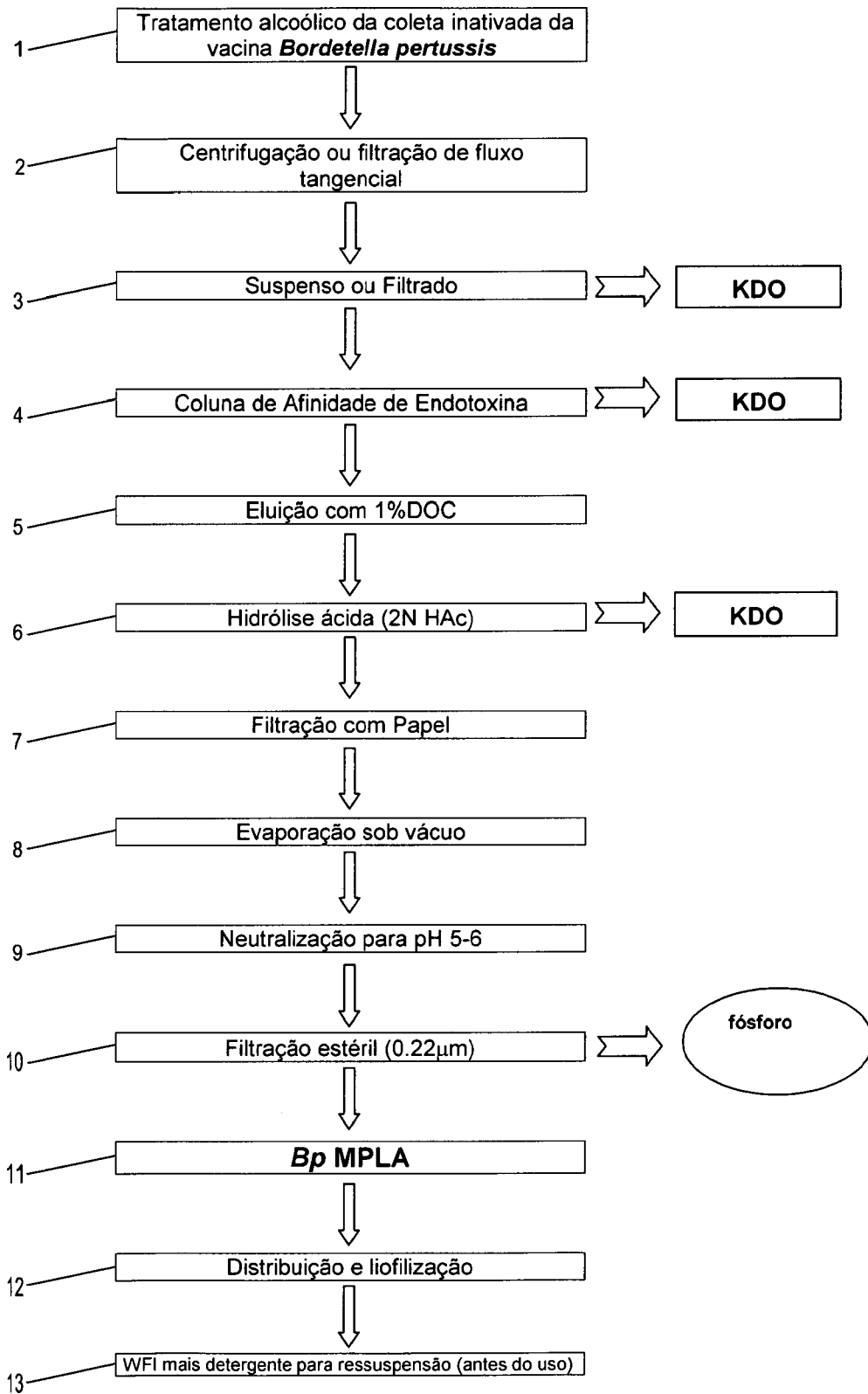
- 1ª) "MÉTODO PARA OBTER LIPÍDEO A MONOFOSFORILADO DA *BORDETELLA PERTUSSIS* COMO UM SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE VACINA CELULAR CONTRA COQUELUCHE", mais especificamente, método de purificação de *BpMPLA* a partir do processamento de um extrato alcoólico geralmente rejeitado ou filtrado da coleta inativada da vacina de *Bordetella pertussis* (subproduto da produção de vacina principal), caracterizado pelas seguintes etapas:
- 10 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*,  
15 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  
20 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);
  - 25 e) Envio da fração eluída à hidrólise de ácido, com ácido acético (2N Hac) a 100°C durante 60 minutos (6);

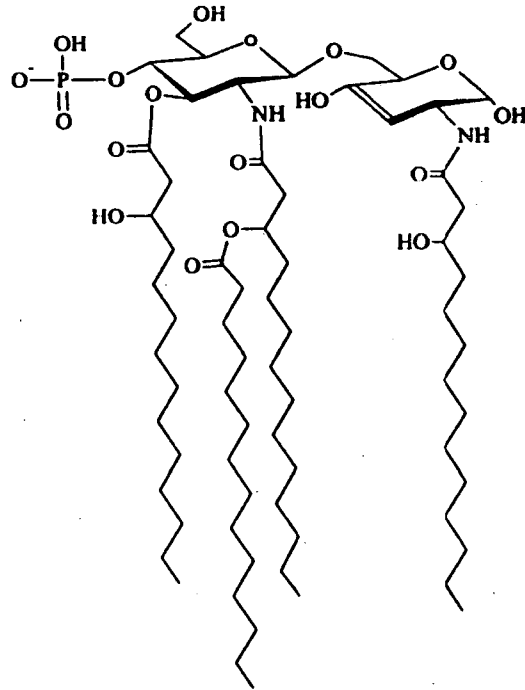
- f) Filtração, mais especificamente, filtração com papel simples (7), para separar o precipitado de detergente;
- g) Evaporação do ácido sob vácuo (8);
- h) Neutralização ao pH 5-6(9), seguido de uma filtração esterilizante (10), resultando no novo **BpMPLA** (11);
- i) Distribuição e liofilização (12) do novo **BpMPLA**;
- j) Ressuspensão do novo **BpMPLA** com água para injeção (WFI) mais detergente (12) antes do uso.

2ª) "MÉTODO PARA OBTER LIPÍDEO A MONOFOSFORILADO DA  
10 **BORDETELLA PERTUSSIS** COMO UM SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE  
**VACINA CELULAR CONTRA COQUELUCHE**", de acordo com a  
reivindicação 1, caracterizado por o referido **BpMPLA**  
ressuspenso ser usado em aplicações imunoestimuladoras.

3ª) "MÉTODO PARA OBTER LIPÍDEO A MONOFOSFORILADO DA  
15 **BORDETELLA PERTUSSIS** COMO UM SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE  
**VACINA CELULAR CONTRA COQUELUCHE**", de acordo com a  
reivindicação 1, caracterizado por o referido **BpMPLA**  
ressuspenso ser usado como um adjuvante de vacina.

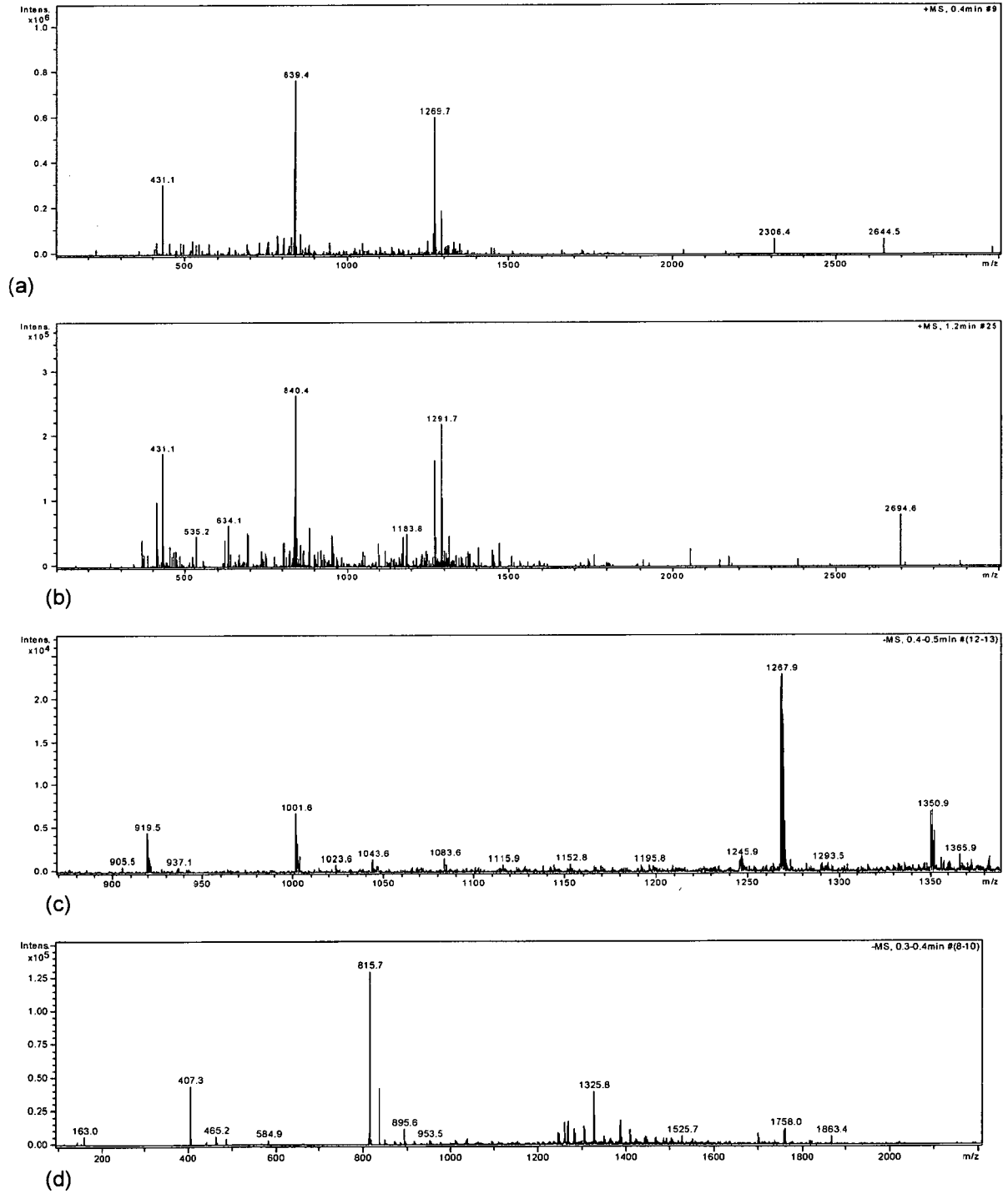
4ª) "MÉTODO PARA OBTER LIPÍDEO A MONOFOSFORILADO DA  
20 **BORDETELLA PERTUSSIS** COMO UM SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE  
**VACINA CELULAR CONTRA COQUELUCHE**", de acordo com a  
reivindicação 1, caracterizado por o referido **BpMPLA**  
ressuspenso ser usado como um adjuvante para a vacina  
contra gripe.

**FIG. 1**

**FIG. 2****FIG. 4**

Teste	Resultados	Limites
Espectrometria de massa tipo "electrospray" (ESI-MS)	1267-1291	Propriedade adjuvante
Fósforo	775 nmolesP/mg	400-800 nmolesP/mg
KDO	≤1.0% (0,03%)	≤1.0%



**FIG. 3**

## 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  
5 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  
10 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  
15 injeção acrescida de detergente suave; o novo **BpMPLA** é usado em aplicações imunoestimuladoras, mais especificamente, como um adjuvante de vacina e, ainda mais especificamente, como um adjuvante de vacina contra gripe, com resultados promissores.