



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

(21) **PI 1005054-0 A2**

(22) Data de Depósito: 29/09/2010
(43) Data da Publicação: 24/04/2013
(RPI 2207)



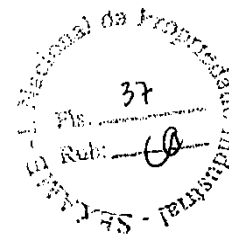
(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/08

(54) **Título:** VACINA DE DOSE ÚNICA CONTRA BOTULISMO

(73) **Titular(es):** Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

(72) **Inventor(es):** Armando da Silva Cunha Junior, Edson de Souza Moura, Luiz Guilherme Dias Heneine

(57) **Resumo:** VACINA DE DOSE ÚNICA CONTRA BOTULISMO. A presente tecnologia refere-se a formulações de vacinas contendo toxóides botulínicos para imunização em dose única (single shot) utilizando quitosana como adjuvante para a administração em animais e humanos.



VACINA DE DOSE ÚNICA CONTRA BOTULISMO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente tecnologia refere-se a formulações de vacinas contendo toxóides botulínicos para imunização em dose única (*single shot*) utilizando quitosana como adjuvante para a administração em animais e humanos.

O grupo de infecções e intoxicações causadas por bactérias do gênero *Clostridium* são chamadas clostridioses, sendo altamente letais. Esses organismos têm a habilidade de passar à forma resistente de esporo quando expostos a condições adversas, podendo se manter potencialmente infectantes no solo por longos períodos. Dessa forma, representam um perigo significativo para as populações animal e humana. Muitos processos infecciosos que afetam as explorações bovinas e ovinas são determinados pelos clostrídeos, existindo cerca de 100 espécies distribuídas em áreas geográficas distintas. A maioria é constituinte da microbiota intestinal, porém apenas dez delas são capazes de causar enfermidades nos animais, causando grandes prejuízos econômicos. Os principais patógenos deste gênero são: *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. perfringens*, *C. haemolyticum* e *C. difficile* (SONGER, J.G. Clostridial Diseases of Animals. In: ROOD, J.I. et al. The Clostridia: molecular biology and pathogenesis. New York: Academic Press, 1997, p. 153-182).

Muitas doenças causadas por bactérias do gênero *Clostridium*, são endêmicas por todo mundo. A prevalência de um ou de outro agente e as manifestações clínicas correspondentes variam de país para país e de região para região. Estas enfermidades levam a perdas consideráveis no rebanho, uma vez que o tratamento na grande maioria dos casos é impraticável, sendo o prognóstico desfavorável (UZAL, F. A.; KELLY, W. R.; PARSONS, P. G. Enterotoxaemia in goats in Australia. Aust. Vet. J., v. 76, n. 8, p. 543, 1998).

Não existem dados oficiais sobre a prevalência das clostridioses bovinas, incluindo o botulismo no Brasil. As informações disponíveis baseiam-se na experiência casuística e extrapolações de alguns poucos pesquisadores envolvidos com o assunto. Nesse sentido, pode-se estimar que o botulismo matou mais de oito milhões de bovinos no Brasil nos últimos 18 anos. Os

grandes surtos ocorreram a partir de 1985, com grande intensificação de surtos de botulismo bovino até o início dos anos 90. Desde então, continuaram as mortes, mas em ritmo inferior aos anos anteriores. O grande problema da quantificação do botulismo bovino no Brasil reside no fato de que os veterinários e proprietários muitas vezes não reconhecem devidamente o problema e freqüentemente convivem com coeficientes de mortalidade elevados, mas atribuem o fato como sendo próprio do negócio. Considerando a taxa anual de mortalidade média do rebanho bovino nacional em torno de 3,5% (incluindo a mortalidade de bezerros), pode-se estimar que mais de seis milhões de bovinos morra anualmente. Considerando ainda, que no mínimo 10% dessa mortalidade sejam causados pelo botulismo, são 600.000 animais por ano. O botulismo é um problema sanitário que a cada dez anos mata o correspondente à metade da população bovina do estado de São Paulo (MOZZER, Otto. Cultivo em alta densidade do *Clostridium botulinum* tipo D visando à fabricação de vacinas veterinárias. 149 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo-USP, Instituto de Pesquisas Tecnológicas-IPT, Butantan, São Paulo, 2004).

Devido às características ecológicas dos agentes, sendo ubiqüitários do trato digestivo dos animais e solo e pela forma de resistência da natureza através de esporos, a erradicação das enfermidades causadas por bactérias do gênero *Clostridium* é praticamente impossível. Entretanto, o controle é possível pela implementação de programas baseados em medidas adequadas de manejo e principalmente na utilização de vacinas em todo o rebanho, já que os animais estão em permanente contato com os agentes e com os fatores que poderão desencadear as enfermidades. Nos últimos anos, ocorreram modificações expressivas nos sistemas de criações de animais domésticos. A alta concentração de animais implica em se ter uma proteção em massa, frente a uma série de enfermidades, que passaram a ser comuns com as novas técnicas de manejo implantadas. A tendência atual é a utilização de vacinas com múltiplos antígenos contra várias enfermidades em única ocasião. Esta prática visa minimizar os problemas de estresse e manejo, assim como evitar

reações tipo anafiláticas à inoculação de produtos tóxicos, inflamações locais, traumas de inoculações, reações aos adjuvantes, dor e febre entre outros.

As clostridioses pelo seu caráter agudo, e pela sua alta letalidade, requerem para o seu controle o emprego de vacinas bastante eficientes, aliadas a medidas de manejo que possibilitem minimizar os fatores que poderão predispor à ocorrência das enfermidades. No controle das clostridioses, principalmente aquelas na qual a imunidade antitóxica é determinante para proteção dos animais, a utilização do toxóide é seguramente a principal medida de controle (LOBATO, F. C. F; ASSIS, R.A. Controle e profilaxia das clostridioses. A Hora Vet., v. 19, n. 113, p. 29-33, 2000).

A utilização de alimentos e água de boa qualidade, eliminação de cadáveres das pastagens e suplementação mineral de fósforo constituem as medidas para profilaxia e controle da doença. Ressalta-se, entretanto, que a vacinação é o mais importante fator para redução de mortalidade. Todos os bovinos com idade acima de quatro meses devem ser vacinados anualmente (BARROS, C.S.L. et al. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil. São Paulo: Agns Gráfica & Editora, 2006. 207 p. (Coleção Vallée) BROWN, A.T.; GREGORY, A.R.; ELLIS, T.M.; HEARNDEN, M.N. Comparative immunogenicity of two bivalent botulinum vaccines. Australian Veterinary Journal, v. 77, n. 6, p. 388-391, 1999).

Em áreas de risco de surtos, a melhor alternativa de prevenção é a vacinação do rebanho com toxóide C e D. Os anticorpos contra toxóides C e D agem bloqueando a ligação das toxinas ao receptor, ou seja, agem como neutralizadores da toxina. Experimentos demonstraram que anticorpos podem atuar extracelularmente por interferir na ligação da toxina botulínica (BoNT) com a superfície da célula, bem como intracelularmente pela inativação de qualquer BoNT que tenha escapado da primeira linha de defesa (QUEIROZ, Rosângela Alencar. Desenvolvimento de teste de imunoabsorção enzimática para detecção de anticorpos contra as toxinas C e D de *Clostridium botulinum* em bovinos. 2001. 52f. Dissertação (Mestrado em biologia parasitária) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (interinstitucional ATASSI M.Z.; OSHIMA, M. Structure, activity, and immune (T and B cell) recognition of

botulinum neurotoxins. *Critical Reviews in Immunology*, v. 19, p. 219-260, 1999).

Steinman et al. realizaram estudo sobre os níveis de anticorpos antitoxina D em bovinos em Israel após surto ocorrido ao sul do país envolvendo 28 diferentes propriedades e que resultou na morte de 600 bovinos. O esquema de vacinação oficial era o mesmo adotado no Brasil, em que a revacinação dos primovacinados ocorre em até quatro semanas após a primeira e, em seguida, a vacinação é anual. Verificou-se que os animais foram expostos a altos níveis de BoNT D na ocasião do surto e que, portanto, seria necessário altos níveis de anticorpos neutralizantes no soro. Contudo, o nível de anticorpos neutralizantes contra BoNT reduz significativamente ao longo do tempo tanto em humanos e quanto em animais. Deste modo, os autores propuseram uma mudança no esquema de vacinação antitoxina D para cada seis meses após a primeira vacinação. (STEINMAN, A.; GALON, N.; ARAZI, A. et al. Cattle immune response to botulinum type D toxoid: results of a vaccination study. *Vaccine*, v. 25, p. 7636 – 7640, 2007. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA (Brasil). Instrução normativa nº 23, de 18 de março de 2002. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 21 mar 2002. n. 55, Seção 1).

Brown et al. (1999) avaliaram o desempenho de duas vacinas bivalentes, contendo toxóides botulínicos tipo C e D, após administração única em bovinos. Uma das vacinas é produzida pela Websters, com o nome comercial de Singvac compreendendo uma emulsão oleosa, a outra vacina utilizada no estudo pertence à empresa CSL sendo uma vacina convencional de hidróxido de alumínio. O estudo evidenciou que ambas apresentaram títulos similares para anticorpos tipo D enquanto a vacina Singvac induziu uma maior resposta imunogênica para tipo C em comparação com a vacina convencional. Também foi verificada alta concentração de anticorpos para botulismo C e D em bezerras antes da vacinação, resultado que foi associado à imunidade passiva, uma vez que as mães já haviam sido vacinadas várias vezes. Porém a vacina Singvac trata-se de emulsão dupla oleosa, resultando normalmente em maior reação local e dano em carcaça. (BROWN, A.T.; GREGORY, A.R.; ELLIS,

T.M.; HEARNDEN, M.N. Comparative immunogenicity of two bivalent botulinum vaccines. Australian Veterinary Journal, v. 77, n. 6, p. 388-391, 1999).

No Brasil, diversas empresas comercializam vacinas contra botulismo
5 tipo C e D associadas a outros antígenos ou não. Em geral, estas vacinas
utilizam como adjuvante hidróxido de alumínio ou alumínio de potássio. A
posologia descrita nas bulas indica para animais primovacinados uma dose de
reforço em até 4 semanas. Considerando as condições de criação extensiva no
Brasil, esta dose de reforço aumenta o manejo de animais e pode resultar em
10 baixa adesão ao tratamento. Além disso, o custo da revacinação é outro fator
negativo para cumprimento da posologia.

Apesar dos avanços da área de biotecnologia e síntese bioquímica, o
uso de peptídeos e proteínas em medicina é limitado devido à baixa
biodisponibilidade decorrente da pouca estabilidade dessas moléculas frente à
15 degradação proteolítica e hidrolítica, baixa permeabilidade para atravessar
barreiras biológicas e curta meia-vida no sistema circulatório. A busca por
alternativas para administração de vacinas levou Preis & Langer (1979) a
aplicarem a tecnologia da liberação controlada de fármacos no campo da
imunização. Nos últimos anos, um dos mais importantes avanços na área de
20 sistemas de liberação controlada é o emprego de sistemas particulados
(nanopartículas, nanocápsulas e micropartículas) e de sistemas de gelificação
in situ para liberação de peptídeos e proteínas, visto que são capazes de
modificar a liberação do ativo (ISSA, M.M.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.;
ARTURSSON, P. Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs.
25 Drug Discovery Today: Technologies, v. 2, n. 1, 2005. TIPTON, A. J.; DUNN,
R.L. In situ gelling systems. In: SENIOR, J.; RADOMSKY, M. Sustained-release
injectable products. Englewood: Interpharm Press, 2000, p. 241-278).

Em comparação com outras formas farmacêuticas, a microencapsulação
e a gelificação *in situ* com o uso de polímeros biodegradáveis são alternativas
30 muito promissoras para obtenção de vacinas de administração única, *single
shot*, que podem ser administradas de maneira simples, sem a necessidade de
técnicas cirúrgicas, contando apenas com o auxílio de seringa.

(JAGANATHAN, K.S.; RAO, Y.U.; SINGH, P. et al. Development of a single dose tetanus toxoid formulation based on polymeric microspheres: a comparative study of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) versus chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 294, n. 1-2, p.23-32, 2005. SENIOR, J.; RADOMSKY, M. Sustained-release injectable products. Denver: Interpharm Press, 2000).

Entre os polímeros utilizados para obtenção de micropartículas, a quitosana, um poliaminossacarídeo natural, tem atraído atenção considerável para uso na área de saúde como polímero com baixa toxicidade apresentando características favoráveis tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesividade e propriedade adjuvante. A quitosana é utilizada em diferentes aplicações tanto para engenharia de tecidos biológicos como em sistemas de liberação controlada de vacinas por diferentes vias de administração incluindo as vias oral, nasal e outras mucosas, porque é capaz de aumentar o transporte de bio-macromoléculas tais como peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos e plasmídios através da superfície biológica. (KANG M. L.; KANG, S.G.; JUANG, H-L. et al. In vivo induction of mucosal immune responses by intranasal administration of chitosan microspheres containing *Bordetella bronchiseptica* DNT. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 63, p. 215-220, 2006. NISHIMURA, K.; NISHIMURA, S.; NISHI, N. et al. Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine*, v. 2, n. 1, p.93-99, 1984).

Na área veterinária, o sucesso da terapia pela administração de vacina depende tanto do método de liberação quanto da preparação do antígeno. A facilidade de administração é especialmente importante para grandes animais. Como vacinar um rebanho, no período adequado, sem prejudicar a produtividade? Muitas vacinas requerem duas ou três doses e representa grande transtorno devido à dificuldade de manejo. Vacinas que apresentem ação prolongada, pulsátil, de liberação programada ou que possam ser administradas com o menor manejo possível, são muito desejadas. A vacina ideal deve apresentar alta imunogenicidade e antigenicidade específica, ausência de efeitos colaterais, ser de baixo custo, estável, adaptável à

vacinação em massa e, teoricamente, deve estimular uma resposta imune distinguível da devida a uma infecção natural de forma que a imunização e a erradicação possam prosseguir simultaneamente. (BOWERSOCK, T.L.; MARTIN, S. Controlled release vaccines in veterinary medicine. In: Controlled Release Veterinary Drug Delivery. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2000. cap. 10, p. 269-310. BRAMWELL, V. W.; EYLES, J. E.; ALPAR, H. O. Particulate delivery system for biodefense subunit vaccines. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 57, n. 9, p.1247-1265, 2005).

Desde algumas décadas atrás, houve considerável aumento do interesse de desenvolver efetivos sistemas de liberação para proteínas a fim de atender a grande variedade de proteínas recombinantes que foram obtidas para aplicação terapêutica. A chave para o sucesso é a obtenção de um eficiente sistema que permita a proteína alcançar o sítio de ação no tempo e duração adequada. Quatro fatores principais devem ser considerados: a via de administração, o perfil de liberação, o método de liberação e o modo de fabricação da formulação. O desenvolvimento de um sistema de liberação para proteína depende das características como tamanho molecular, meia vida biológica, imunogenicidade, estabilidade conformacional, dose, local e taxa de liberação, farmacocinética e farmacodinâmica. Além do grande desafio em estabelecer um padrão de liberação adequado e reprodutível, deve-se atentar para a manutenção da integridade da estrutura tridimensional durante todas as etapas de preparação e mesmo durante a liberação. Em muitas situações, devido à fragilidade da natureza protéica, ocorre redução de sua atividade biológica e imunogênica. Essas modificações podem ser por desnaturação ou por degradação química envolvendo oxidação, deaminação, hidrólise, entre outras. (SINHA, V.R.; TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. Journal Controlled Release, v. 90, n. 3, p. 261-280, 2003. SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potencial applications of chitosan in veterinary medicine. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 56, n. 10, p. 1467-1480, 2004).

Amplamente estudado nos últimos anos, sistema de liberação utilizando microesferas de quitosana tem sido utilizado para veicular antibióticos, antihipertensivos, agentes antitumorais, proteínas, peptídeos e vacinas. Em

revisão feita por Issa et al. (2005) foram apontadas as áreas de engenharia de tecidos biológicos e vacinas como principais aplicações da quitosana como material biomédico. (ISSA, M.M.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.; ARTURSSON, P. Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. Drug Discovery Today: Technologies, v. 2, n. 1, 2005).

Propriedades tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade estimularam a utilização da quitosana em formulações farmacêuticas e bioprodutos.

Somando a essas vantagens, a propriedade mucoadesiva e a atividade imunoadjuvante estão sendo extensivamente pesquisadas. Foi demonstrado que a quitosana é capaz de induzir tanto a ativação de macrófagos como linfócitos T citotóxicos. Kosaka et al. (1996) demonstraram que implantes subcutâneos de quitosana em cães aumentaram o número de células sangüíneas brancas, particularmente neutrófilos e ativou tanto células polimorfonucleares quanto macrófagos. (ALPAR, H.O.; GROVES, M.J. Vaccines: ancient medicines to modern therapeutics. In: GROVES, M.J. Pharmaceutical Biotechnology. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. cap. 12, p. 307-332. ILLUM, L.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M. et al. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 51, n. 1-3, p. 81-96, 2001. JIANG, T.; ABDEL-FATTAH, W.I.; LAURENCIN, C.T. In vitro evaluation of chitosan/poly (lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials, v. 27, n. 28, p. 4894-4903, 2006. KOSAKA, T.; KANEKO, Y.; NAKADA, Y. et al. Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. The Journal of Veterinary Medical Science, v. 58, n. 10, p. 963-967, 1996).

Testes clínicos utilizando quitosana não têm reportado nenhum efeito inflamatório ou reação alérgica após a implantação, injeção, administração tópica e oral em seres humanos. Sua biodegradação por lisozimas resulta na liberação de amino-açúcares que são incorporados às vias metabólicas da glicosaminoglicana e glicoproteína ou excretados (CHATELET, C.; DAMOUR,

O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, v. 22, n. 3, p. 261-268, 2001).

Jaganathan et al. (2005) prepararam microesferas carregadas com toxóide tetânico em matrizes de quitosana e PLGA (ácido polilático-co-glicólico) e observou que em presença de estabilizante ambas apresentaram resultados satisfatórios resultantes de um bom nível de antitoxina, com reduzido efeito *burst* em comparação com vacinas formuladas com hidróxido de alumínio. Os resultados demonstraram que microesferas de toxóide tetânico têm potencial aplicação para modular a liberação, ressaltando que em comparação ao PLGA, a quitosana torna o custo final do produto mais viável. (JAGANATHAN, K.S.; RAO, Y.U.; SINGH, P. et al. Development of a single dose tetanus toxoid formulation based on polymeric microspheres: a comparative study of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) versus chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 294, n. 1-2, p.23-32, 2005).

Como alternativa aos sistemas que utilizam *pellets* ou micropartículas, as pesquisas na área de tecnologia farmacêutica têm se direcionado para utilização de uma grande variedade de substâncias que podem ser utilizadas para obtenção dos sistemas de gelificação *in situ*, ou seja, que após a administração se transformam em sistema de depósito (*Depot*). Estes sistemas apresentam atributos como baixa viscosidade antes da injeção e capacidade de rapidamente modificarem sua forma física após a administração. Além disso, são oportunos para liberação local e muitos desses materiais, após a injeção, assumem estado amorfo e podem fluir e preencher espaços vazios, apresentado alto potencial para aplicação como material em engenharia de tecidos. (BAJPAI, A.K.; SHUKLA, S.K.; BHANU, S. et al. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*, v. 32, p. 1088-1118, 2008. PACKHAEUSER, C.B.; SCHNIEDERS, J.; OSTER, C.G. et al. In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 445-455, 2004. TIPTON, A. J.; DUNN, R.L. In situ gelling systems. In: SENIOR, J.; RADOMSKY, M. Sustained-release injectable products. Englewood: Interpharm Press, 2000, p. 241-278).

Uma formulação administrada por via subcutânea ou intra-muscular pode encontrar diferentes ambientes condições de pH, osmolaridade, temperatura e concentração de água. Em adição, pode-se também conduzir reações *in situ* tais como *cross-linking* de acrilatos. Todos esses métodos têm sido explorados e alguns desses sistemas conhecidos como *smart gels* já estão em estágio de estudos clínicos e outros disponíveis para comercialização. Os desafios dessa tecnologia para os formuladores é trabalhar dentro de uma estreita janela entre segurança e toxicidade e desenvolver sistemas que sejam funcionais dentro das condições biológicas. Sistemas de liberação responsivos utilizam várias propriedades dos polímeros, tais como: transição térmica reversível, intumescimento, transição vítrea e fusão cristalina. (TIPTON, A. J.; DUNN, R.L. In situ gelling systems. In: SENIOR, J.; RADOMSKY, M. Sustained-release injectable products. Englewood: Interpharm Press, 2000, p. 241-278. BAJPAI, A.K.; SHUKLA, S.K.; BHANU, S. et al. Responsive polymers in controlled drug delivery. Progress in Polymer Science, v. 32, p. 1088-1118, 2008).

O pedido de patente AU 753804 se refere a vacinas para a prevenção de doenças clostridiais em dose única. Compreendendo um adjuvante oleoso, um emulsificante como o oleato de manitol e uma fase aquosa compreendendo um ou mais antígenos clostridiais selecionado a partir do grupo: *Clostridium perfringens* tipo A, B, C e D, *Clostridium septicum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi* tipo B, *Clostridium sordelli*, *Clostridium haemolyticum* e *Clostridium botulinum* C e D. Entretanto a vacina é de natureza oleosa o que provoca maior reação no local de aplicação.

Já o pedido de patente WO2010052492 descreve uma vacina intranasal contra o vírus H5N1 compreendendo antígeno inativado H5N1, sialidase de *Clostridium perfringens* A estirpe 107 e quitosana. Nesse pedido de patente a utilização da sialidade da bactéria teve o objetivo de potencializar o antígeno do vírus influenza.

Porém nenhum dos documentos supracitados descreve formulações de vacinas contendo toxóides botulínicos para imunização em dose única (*single shot*) utilizando quitosana como adjuvante para o tratamento de botulismo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Curva turbidimétrica da precipitação de quitosana em presença de sulfato de sódio em pH 3,0 e 5,0.

Figura 2: Fotomicrografias das microesferas de quitosana contendo toxóide botulínico tipo D. Aumentos de 3.000(A) e 10.000 vezes(B) (15kV).

Figura 3: Resposta imune por ensaio de soroneutralização realizado com vacinas formuladas com toxoide botulínico tipo D (50.000DL50) utilizando micropartículas de quitosana comparada com hidróxido de alumínio. Foram utilizados 06 cobaios a cada ponto e o título é resultado do pool de amostras.

Figura 4: Resposta imune por ensaio de soroneutralização realizado com vacinas formuladas com toxoide botulínico tipo D (75.000DL50) utilizando micropartículas de quitosana comparada com hidróxido de alumínio. Foram utilizados 06 cobaios a cada ponto e o título é resultado do pool de amostras.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

A presente tecnologia refere-se a formulações de vacinas contendo toxóides botulínicos para imunização em dose única (*single shot*) utilizando quitosana como adjuvante para a administração em animais e humanos.

A presente invenção pode ser mais bem entendida através dos seguintes exemplos, não limitantes de tecnologia:

EXEMPLO 1: OBTENÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA

A obtenção da toxina botulínica foi realizada por fermentação de *C. botulinum* tipo D em biorreator de 10L contendo 8,1L de meio de cultura e em estado de anaerobiose com borbulhamento de nitrogênio (MOZZER, Otto. Cultivo em alta densidade do *Clostridium botulinum* tipo D visando à fabricação de vacinas veterinárias. 149 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo-USP, Instituto de Pesquisas Tecnológicas-IPT, Butantan, São Paulo, 2004).

Com a finalidade de separar células do meio fermentado, realizou-se duas técnicas clássicas: centrifugação ou microfiltração convencional.

Para concentração de proteínas foram utilizadas duas alternativas: *salting out* ou ultrafiltração em *Hollow Fiber*. Na técnica de *salting out*, foi pesada quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ suficiente para obtenção de saturação de 10, 25, 40, 60 e 85% e acrescentadas consecutivamente durante o processo. A
 5 adição do sal foi feita de forma lenta e sob agitação a temperatura de 4°C. Após precipitação, manteve-se o sistema sob agitação por mais 30 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000g por 10 minutos em centrífuga. Em caso de formação de *pellet*, separou-se o sobrenadante para continuidade do processo e o *pellet* formado foi ressuspensionado em tampão de
 10 fosfato de sódio 10mM, pH 6,0, contendo azida sódica 0,5% m.V^{-1} . Em seguida, adicionou-se mais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em quantidade suficiente para obtenção da saturação em teste. Este procedimento foi finalizado quando a saturação da solução chegou a 85%. Os *pellets* ressuspensionados foram dialisados em tubos de celulose de corte molecular de 12kDa lavando-se por 5 vezes, em volume 10
 15 vezes maior, utilizando como eluente tampão fosfato de sódio 10mM, pH 6,0. Em seguida, as soluções foram liofilizadas e avaliadas por eletroforese. A segunda técnica testada para concentração foi a filtração tangencial. Foi utilizado cartucho *Hollow Fiber* corte 30kDa e bomba de lóbulos. O meio contendo toxina foi concentrado em aproximadamente 4 vezes.

20 A obtenção do toxoide foi realizada pela diálise contra solução contendo formol em concentração de 0,6 a 1,2% a 37°C por 10 dias. Alternativamente, utilizou-se método de iodinação. Neste caso, a toxina botulínica semipurificada foi submetida ao processo de destoxificação pela incorporação controlada de iodo até saturação, seguindo método proposto por Heneine & Heneine (1998).
 25 (HENEINE, I.F.; HENEINE, L.G. Stepwise iodination. A general procedure for detoxification of proteins suitable for vaccine development and antiserum production (Review). *Biologicals*, v. 26, n. 1, p. 25-32, 1998).

EXEMPLO 2: PREPARAÇÃO DA VACINA DE MICROPARTÍCULAS

Foram dissolvidos sob condições assépticas o equivalente a 0,25%p/V
 30 de quitosana em uma solução aquosa contendo 1,0%p/V de Poloxamer 407 e quantidade suficiente de ácido acético para obter pH 3,0 ou 5,0. A solução foi filtrada em membrana 0,22 μm . Em seguida, foram gotejados sobre a solução

de quitosana a solução de sulfato de sódio 20% $m.V^{-1}$ contendo quantidade suficiente de toxoide botulínico, previamente esterilizada por filtração, a um fluxo de 3 $mL.min^{-1}$, sob agitação mecânica constante de 400RPM. Em seguida, a vacina foi envasada em frascos de vidro sob condições assépticas. A
5 concentração da solução de sulfato de sódio utilizada foi determinada através da análise dos dados obtidos nas análises por turbidimetria (Figura 1) que demonstram a relação entre a absorvância e a concentração de sulfato de sódio em pH 3,0 e 5,0. Observou-se que a partir da adição de 1,25mL da solução de sulfato de sódio 20% $m.V^{-1}$ a diferença nas leituras de absorvância da
10 suspensão em comprimento de onda de 500nm é mínima. Os resultados permitiram estabelecer o volume em excesso de 1,5mL da solução de sulfato de sódio 20% $m.V^{-1}$ para procedimentos de preparo de partículas. O pH final da vacina pode ser corrigido com utilização de hidróxido de sódio para faixa de 3,0 a 8,0.

15 Adicionalmente, a distribuição granulométrica laser microesferas de quitosana contendo toxóide botulínico tipo D foi avaliada por difração de raios laser e verificou-se uma distribuição típica conforme Figura 2 (A e B). Apesar da influência do processo de preparo, tipicamente 90% das micropartículas apresentam diâmetro menor que 45 μm . As micropartículas obtidas
20 demonstraram boa uniformidade de tamanho através da avaliação do índice span em que se obtiveram valores típicos em torno 1,3.

A microscopia eletrônica de varredura das micropartículas com aumento de 3.000 vezes (Figura 2 A) e 10.000 vezes (Figura 2 B) mostra a formação de micropartículas com forma aproximadamente esférica, superfície lisa e não
25 porosa. A fotomicrografia com aumento de 10.000 vezes (Figura 2 B) mostra a formação de agregados de pequenas partículas.

EXEMPLO 3: PREPARAÇÃO DA VACINA NA FORMA DE GEL

Foram dissolvidos o equivalente a 1,0%p/V de quitosana em uma solução aquosa contendo quantidade suficiente de ácido clorídrico para a
30 obtenção de pH entre 4,0 ou 5,0. A solução foi filtrada em membrana 0,22 μm . Em seguida, foi transferido 25mL da preparação estéril para um béquer de

100mL , o pH foi ajustado para pH 6,0 a 6,5 utilizando solução estéril de hidróxido de sódio 0,17M. O toxoide botulínico foi adicionado sobre a preparação mantendo a mesma sob agitação por pelo menos 20 minutos. Posteriormente foi adicionado quantidade suficiente de solução de hidróxido de sódio para se obter pH em torno de 6,8 a 7,2. Em seguida o volume foi completado com salina 0,9%p/V e a preparação homogeneizada.

EXEMPLO 4: TESTE *IN VIVO* DA VACINA CONTRA BOTULISMO TIPO D

Os testes biológicos foram realizados em seis cobaios, divididos entre machos e fêmeas, pesando entre 350 a 450g. Sendo que as micropartículas administradas em formulações com pH entre 5,0 a 7,0 apresentaram pouca reação local com regressão do edema ao longo do estudo de 42 dias.

Através do teste de soroneutralização, comparou-se a resposta imune entre a vacina preparada com micropartículas e com hidróxido de alumínio como adjuvante. As Figuras 3 e 4 apresentam o resultado da análise de anticorpos neutralizantes antibotulismo tipo D pelo teste de soroneutralização realizado com duas amostras diferentes de toxoides botulínicos tipo D. O título de anticorpos foi obtido pelo *pool* de amostras de soro coletado de 6 cobaios a cada ponto.

Os gráficos apresentados nas Figuras 3 e 4 mostram que em ambos ensaios a utilização de micropartículas de quitosana resultou em aumento da resposta imune ao longo do tempo do experimento. Além da resposta imune superior àquela apresentada quando se utilizou hidróxido de alumínio como adjuvante, a quitosana promoveu uma sustentação dos níveis de anticorpos durante o período dos ensaios. Os resultados mostram que a qualidade do antígeno influencia o resultado, sendo que o nível de anticorpos do segundo experimento (Figura 4) é inferior ao primeiro, apesar de utilizar 75.000DL50 para preparação. No entanto, a utilização de micropartículas de quitosana resultou em resposta imunológica maior e sustentada por mais tempo quando comparada ao hidróxido de alumínio.

REIVINDICAÇÕES

1. **VACINA CONTRA BOTULISMO**, caracterizada por compreender: 0,1 a 2,5% p/v de quitosana, 10 a 1000 DL50 de toxóide botulínico, e opcionalmente ao menos um adjuvante fisiologicamente aceitável.
- 5 2. **VACINA CONTRA BOTULISMO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo toxóide botulínico ser preferencialmente tipo C ou D.
3. **VACINA CONTRA BOTULISMO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelos adjuvantes serem selecionados do grupo compreendendo alumínio de potássio, hidróxido de alumínio ou saponina.
- 10 4. **VACINA CONTRA BOTULISMO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por poder conter 0,5 a 2,5%p/v de tensoativo e solução coagulante 10 a 30 %m.v⁻¹.
- 15 5. **VACINA CONTRA BOTULISMO**, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo tensoativo ser preferencialmente selecionado do grupo compreendendo polissorbato 80, óleo de rícino etoxilado, solutol ou polaxamer.
- 20 6. **VACINA CONTRA BOTULISMO**, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo coagulante ser preferencialmente selecionado do grupo compreendendo: sulfato de sódio, tripolifosfato, glutaraldeído, formaldeído D,L-gliceraldeído, alginato de sódio, dextrana, colágeno, ácido tripolifosfato, ácido hialurônico, genipina, epiclorigrina, hialuronato de sódio, gliceraldeído ou glioxal.
- 25 7. **VACINA CONTRA BOTULISMO**, de acordo com as reivindicações 1 a 6 caracterizada por se apresentar preferencialmente na forma de micropartículas ou gel.
8. **VACINA CONTRA BOTULISMO**, caracterizada por ser utilizada em dose única (*single shot*) na imunização de animais e humanos.

FIGURAS

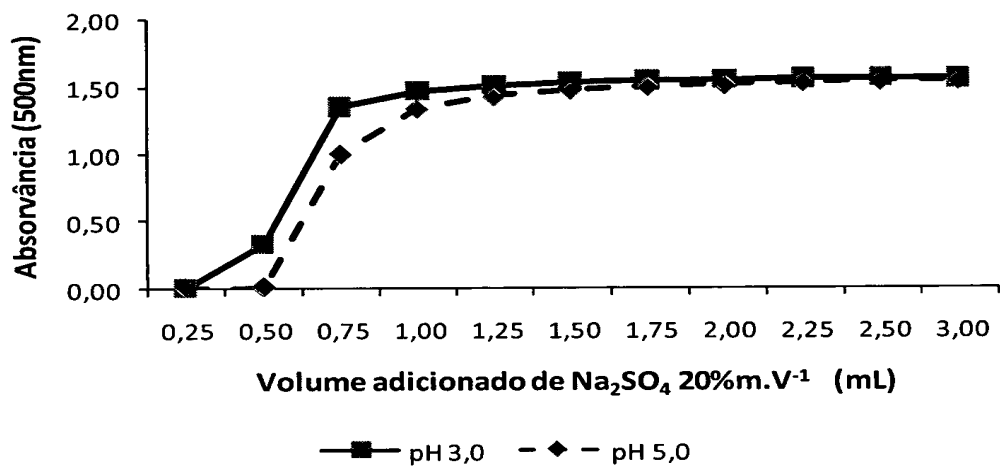


Figura 1

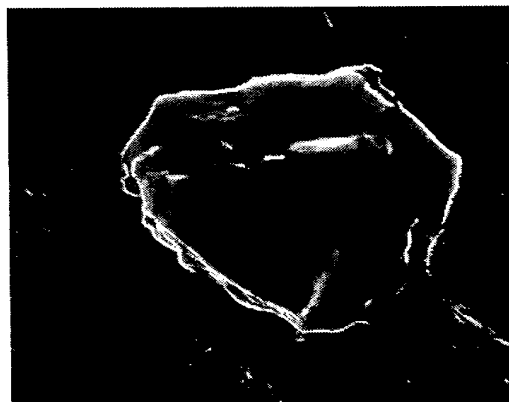


Figura 2 A



Figura 2B

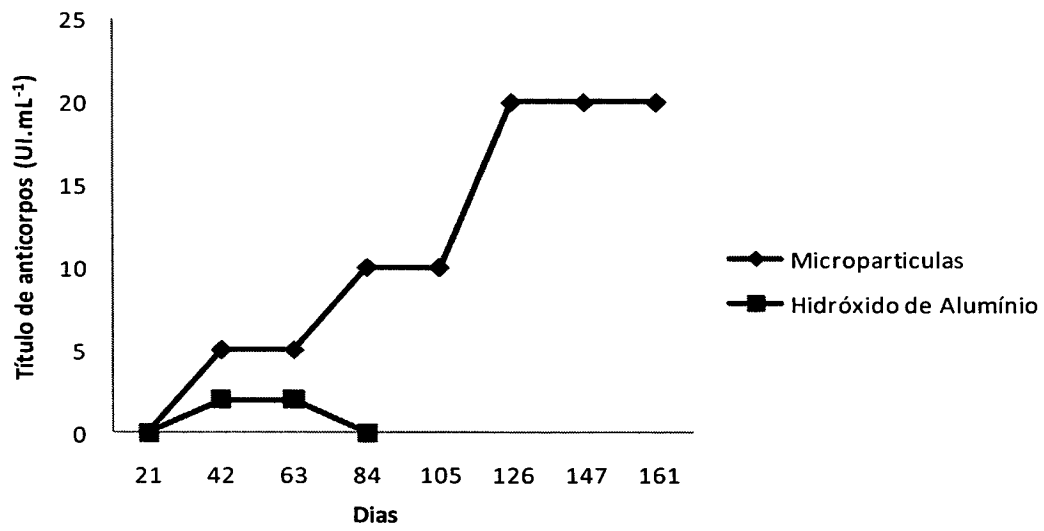


Figura 3

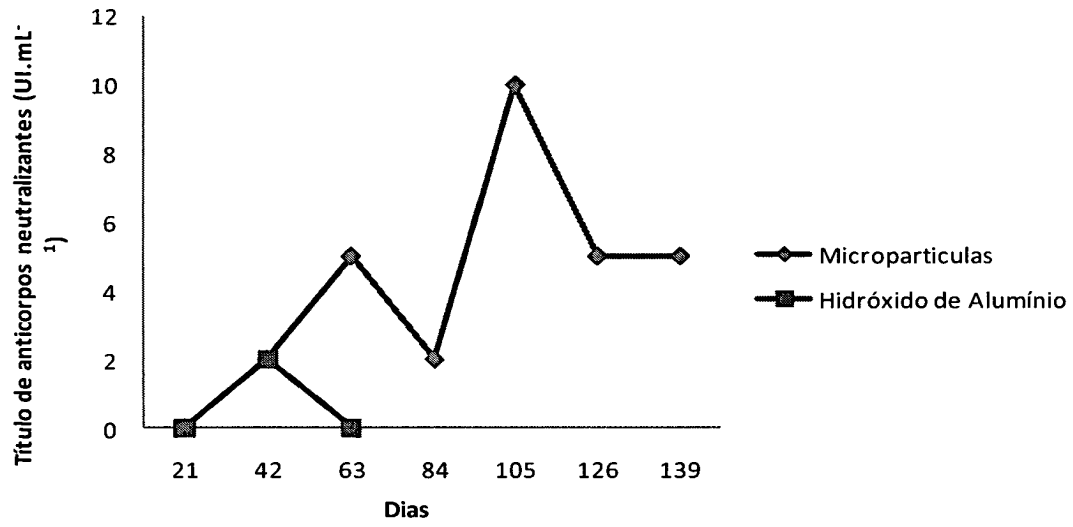


Figura 4



RESUMO

VACINA DE DOSE ÚNICA CONTRA BOTULISMO

A presente tecnologia refere-se a formulações de vacinas contendo toxóides botulínicos para imunização em dose única (*single shot*) utilizando quitosana como adjuvante para a administração em animais e humanos.