



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

(11) PI 0611752-0 B1

(22) Data do Depósito: 02/06/2006

(45) Data de Concessão: 24/04/2018



(54) Título: DISPOSITIVO E PROCESSO PARA PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE COMPOSTOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS

(51) Int.Cl.: C12M 1/00; C12M 1/04

(30) Prioridade Unionista: 17/06/2005 DE 10 2005 028 171.0

(73) Titular(es): MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA

(72) Inventor(es): BERND DÖLLE; MICHAEL PFEIL

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"DISPOSITIVO E PROCESSO PARA PRODUÇÃO FERMENTATIVA
DE COMPOSTOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS".**

[001] A presente invenção refere-se a um processo e a um dispositivo para a produção fermentativa de materiais biologicamente ativos, sendo que o fermentador se encontra em um isolador, que se encontra novamente em uma câmara de trabalho ou é adjacente ao mesmo e em que tanto no isolador quanto também na câmara de trabalho predomina uma diferença de pressão comparada com a pressão ambiental.

[002] O trabalho com compostos biologicamente ativos exige medidas de segurança elevadas na produção, para resguardar funcionários de possíveis perigos ou envenenamentos. Compostos biologicamente ativos são produzidos ou utilizados freqüentemente para fins farmacêuticos, razão pela qual eles precisam corresponder às altas exigências quanto a pureza, especialmente na produção. A construção usual de instalações para a produção de compostos altamente puros consiste em uma primeira câmara interna, que é fechada para fora e é envolvida por uma segunda câmara. Na segunda câmara encontram-se as pessoas que trabalham com o material biológico, enquanto a elaboração do material biológico se realiza principalmente na primeira câmara. As duas câmaras estão ligadas uma com a outra por comportas fecháveis. A primeira câmara é usualmente uma caixa de luva, de maneira que os estágios do processo podem ser efetuados com auxílio de luvas a partir da segunda câmara. A segunda câmara é usualmente isolada do mundo exterior, mas está ligada com ele através de comportas fecháveis. Nas duas câmaras predominam, de maneira ideal, condições estéreis ou condições ambientais puras. Para impedir uma contaminação do material biologicamente ativo com partículas ambientais, germes

microbiológicos e similar, predomina um excesso de pressão na primeira câmara, tipicamente um excesso de pressão de 15 Pa. Na segunda câmara, ao contrário, predomina uma subpressão comparada com a primeira câmara, no entanto, um excesso de pressão comparado com o meio ambiente. Com isso, impede-se, que partículas ou germes da segunda câmara penetrem na primeira câmara. Dessa maneira, o material biologicamente ativo é protegido contra contaminações do meio ambiente.

[003] No caso da produção de compostos biologicamente ativos através de um processo de fermentação, há estágios de processo, que são efetuados em um aparelho, pelo menos, aberto por um breve período. Um tal estágio de processo, por exemplo, é a inoculação. Este estágio precisa ser efetuado, na maioria das vezes, manualmente. Neste procedimento, no qual o dispositivo (recipiente, frasco) com o material aberto (banco de células) é aberto – mesmo que também por um breve período -, pode ocorrer a formação de aerossol. Isso também é válido para os passos intermediários dos estágios da pré-cultura até o início da fermentação. Aqui é aberta uma conexão do fermentador – mesmo também por um breve período -, com o que pode ocorrer a formação de aerossol. Do mesmo modo, é possível, que na elaboração do produto de fermentação, da substância biologicamente ativa, ocorra a formação de aerossol. Neste caso, há o perigo ambiental da exposição com germes, bactérias ou substâncias tóxicas. Devido a subpressão relativa na segunda câmara em relação à primeira câmara, os aerossóis podem penetrar da primeira para a segunda câmara, o que pode pôr em risco as pessoas que trabalham na segunda câmara. Apesar disso, para garantir a segurança de trabalho, é preciso tomar outras medidas de segurança, tais como, por exemplo, vacinação do pessoal de trabalho, uso de uniformes de segurança e outras.

[004] Por isso, há a necessidade de um processo e um dispositivo, com os quais os materiais biologicamente ativos podem ser preparados através de fermentação, em que os materiais são protegidos contra contaminação do meio ambiente e simultaneamente a exposição do pessoal com aerossóis é reduzida ou inteiramente impedida.

[005] Este objetivo é resolvido de acordo com a invenção, pelo dispositivo e processo de acordo com as reivindicações anexas.

[006] Consequentemente, a presente invenção refere-se a um dispositivo e a um processo para a produção de agente biologicamente ativo por meio de fermentação, preferentemente em forma altamente pura, sendo impedida uma contaminação do material biológico com partículas e germes do meio ambiente e ao mesmo tempo, reduzida a possibilidade de um risco do pessoal que trabalha com o material biológico. Preferentemente, o processo de fermentação contém pelo menos um estágio de inoculação. O processo de fermentação contém especialmente pelo menos um estágio efetuado manualmente e de modo particularmente preferido, este estágio é o estágio de inoculação.

[007] O processo de acordo com a invenção e o dispositivo de acordo com a invenção, utilizado para esse fim, permitem a aplicação de técnicas de produção e purificação comprovadas, que estão ou podem estar ligadas com a formação de aerossol, sem que, neste caso, um risco fundamental das pessoas encarregadas com o processo de produção e/ou de elaboração esteja ligado com o meio ambiente através da formação de aerossol. Em outras palavras, o dispositivo de acordo com a invenção e o processo de acordo com a invenção diminuem a exposição das pessoas envolvidas com a produção e meio ambiente do material biologicamente ativo, bactérias e/ou germes, e ao mesmo tempo, permite a aplicação de técnicas

estabelecidas, que permitem uma produção e purificação eficientes do material biologicamente ativo, embora estas estejam fundamentalmente ligadas com uma formação de aerossol.

[008] O dispositivo de acordo com a invenção, contém, pelo menos, uma câmara de isolamento (isolador), que é envolvida por uma câmara de trabalho ou é adjacente à mesma. A câmara de trabalho está ligada com o meio ambiente através de uma comporta de pressão. Tanto no isolador, quanto também na câmara de trabalho predomina uma subpressão em comparação com a pressão do meio ambiente, sendo que a pressão no isolador é menor do que a pressão na câmara de trabalho. Na comporta de pressão predomina um excesso de pressão em relação à pressão do meio ambiente. Nesse caso, o isolador contém pelo menos um fermentador, no qual o material biologicamente ativo é preparado por fermentação.

[009] No dispositivo de acordo com a invenção, o material biologicamente ativo é preparado e/ou elaborado no isolador. Neste caso, um isolador, tal como utilizado aqui, é um sistema delimitado hermeticamente frente ao meio ambiente, que se encontra fundamentalmente em permuta energética com seu meio, no entanto, não permite nenhum transporte de material descontrolado com seu meio. Transporte de material controlado com seu meio, por exemplo, a carga com ou a remoção de equipamentos, reagentes, materiais de partida, produtos intermediários e produtos finais, pode ser efetuado através de uma ou mais comportas, reservatórios basculantes duplos, através dos chamados β -ports em conexão com α -containers ou α -bags. O transporte de material controlado é possível antes, durante ou após a fermentação e/ou a purificação do produto de fermentação ou do material biologicamente ativo.

[0010] O isolador, regulado através de instalações apropriadas, pode ser acionado com excesso de pressão ou subpressão. Do

mesmo modo, é possível, que seja produzida uma atmosfera de gás inerte no isolador. O isolador dispõe tipicamente de um ou mais tubo(s) de alimentação e remoção de ar, sendo que estes são providos tipicamente de filtros. Com isso, obtém-se no isolador preferentemente um número de germes menor do que 100, preferentemente menos do que 10 e de modo mais preferido, menos do que 1 germe/m³. Tais filtros são conhecidos pelo técnico. Um exemplo de tais filtros são os filtros HEPA (high efficiency particulate air).

[0011] Os equipamentos, aparelhos ou objetos que podem ser encontrados no isolador podem ser movimentados ou servidos através de um comando externo ou através de entradas de luva isoladas encontradas no isolador, que são acionadas, movimentadas ou servidas a partir da câmara de trabalho.

[0012] O isolador é fabricado preferentemente inteira ou parcialmente de um material, que é biologicamente inerte ou de fácil limpeza ou permite uma descontaminação ou esterilização *in situ*. Nesse caso, prefere-se um material, que permite especialmente a esterilização com formalina, óxido de etileno ou peróxido de hidrogênio em forma de vapor (VHP). Tais materiais são, por exemplo, vidro, aço inoxidável ou materiais plásticos, tal como, por exemplo, PVC. Preferencialmente, o isolador é fabricado de maneira tal, que seu lado interno consiste inteira ou parcialmente em vidro e/ou de aço inoxidável ou de outros materiais adequados, por exemplo, materiais plásticos. Nesse caso, utilizam-se tanto materiais plásticos duros, quanto também macios (isoladores hard- e soft-wall). Luvas são fabricadas tipicamente de neoprene, hypalon, vinila ou outros materiais apropriados.

[0013] Tipicamente, o isolador dispõe de uma instalação para o controle e regulação de temperatura.

[0014] O isolador encontra-se tipicamente em uma câmara de

trabalho ou é adjacente a esta. Entre o isolador e a câmara de trabalho existe uma diferença de pressão. No isolador predomina, nesse caso, uma pressão mais baixa do que na câmara de trabalho, que novamente apresenta uma pressão mais baixa do que a pressão ambiental. A pressão ambiental perfaz 101325 Pa, mas pode variar conforme a situação geográfica ou condição das intempéries.

[0015] Tipicamente, a pressão de funcionamento no isolador é uma subpressão de 20 até 200 Pa, preferentemente de 40 até 100 Pa e do modo mais preferido, de 55 até 75 Pa, sendo que a subpressão refere-se à pressão do meio ambiente (101325 Pa).

[0016] Usualmente, a pressão de funcionamento no isolador é em torno de 10 até 100, preferentemente 20 até 80, de modo particularmente preferido, em torno de 40 até 60 Pa mais baixa do que na câmara de trabalho.

[0017] Em uma forma de concretização da invenção, um valor típico da diferença de pressão entre o isolador e a câmara de trabalho, dentro de oscilações da técnica de medição e as condicionadas pelo equipamento, é de 35 até 57 Pa e preferentemente de cerca de 45 Pa, isto é, a pressão no isolador é em torno de cerca de 35 até 57 ou em torno de cerca de 45 Pa mais baixa do que na câmara de trabalho.

[0018] A alimentação de ar para e do isolador ocorre preferentemente através de filtros, de modo que no isolador predomina um índice de germes de no máximo 100, preferentemente no máximo de 10 germes/m³ e do modo mais preferido, preferentemente no máximo, de 1 germe/m³.

[0019] A câmara de trabalho de acordo com a invenção, é um sistema hermético, que por um lado, está ligado hermeticamente com o isolador através de uma ou mais aberturas fecháveis com a finalidade de trocar substâncias e trocar equipamentos e, por outro lado, está ligado hermeticamente com o meio ambiente para a troca de

substâncias e equipamentos e/ou acesso através de, pelo menos uma comporta de pressão fechável. A câmara de trabalho envolve ou aproxima-se ao isolador. A alimentação de ar para e da câmara de trabalho ocorre preferentemente através de filtros, de maneira que na câmara de trabalho predomina um índice de germes de no máximo 200, preferentemente no máximo 100 e do modo mais preferido, de no máximo 10 germes/m³. Tais filtros estão à venda no comércio, por exemplo, pelo nome filtros HEPA.

[0020] A câmara de trabalho apresenta preferentemente uma temperatura de cerca de 19 até 26°C e uma umidade relativa do ar de 40 até 60 %. O primeiro e o segundo isolador apresentam independentes um do outro, uma temperatura e uma umidade relativa do ar, tal como é usual e apropriada para a execução da produção e purificação do material biologicamente ativo.

[0021] Na câmara de trabalho predomina uma pressão de funcionamento que é maior do que a do isolador, no entanto, há uma diferença de pressão em relação à pressão ambiente e para a comporta de pressão.

[0022] Tipicamente a pressão na câmara de trabalho é de 5 até 50, preferentemente 10 até 30, de modo particularmente preferido, de 12 até 18 Pa mais baixa do que a pressão ambiente.

[0023] Em uma forma de concretização da invenção, um valor típico da diferença de pressão em relação à pressão ambiente dentro de oscilações da técnica de medição e as condicionadas pelo equipamento, é de 15 Pa, isto é, a pressão na câmara de trabalho é de cerca de 15 Pa mais baixa do que a pressão ambiente.

[0024] A câmara de trabalho está ligada com o meio ambiente através de, pelo menos, uma comporta de pressão fechável. Na comporta predomina um excesso de pressão em relação à pressão ambiente de 10 até 100 Pa, preferentemente de 20 até 80 e do modo

mais preferido, de 25 até 35 Pa.

[0025] Usualmente, há uma diferença de pressão da comporta de pressão para a câmara de trabalho de 10 até 200, preferentemente de 20 até 100, de modo particularmente preferido, de 40 até 60 Pa.

[0026] Em uma forma de concretização, um valor típico da diferença de pressão entre a comporta de pressão e a câmara de trabalho dentro de oscilações da técnica de medição e as condicionadas pelo equipamento, é de 45 Pa, isto é, a pressão de trabalho na câmara de trabalho é cerca de 45 Pa mais baixa do que na comporta de pressão.

[0027] Usualmente, há uma diferença de pressão da comporta de pressão para o isolador de 10 até 300, preferentemente de 50 até 200, de modo particularmente preferido, de 80 até 100 Pa. Um valor típico da diferença de pressão entre a comporta de pressão e o isolador dentro das oscilações da técnica de medição e as condicionadas pelo equipamento, é de 90 Pa, isto é, a pressão de trabalho no isolador é em torno de cerca de 90 Pa mais baixa do que na comporta de pressão.

[0028] Em uma forma de concretização particularmente preferida, o dispositivo de acordo com a invenção, abrange pelo menos um outro isolador. Esse ao menos outro isolador pode encontrar-se na mesma câmara de trabalho como o primeiro isolador ou ser adjacente à mesma câmara de trabalho e ele também pode estar hermeticamente ligado com o primeiro isolador, por exemplo, através de uma ou mais comportas fechadas, reservatórios basculantes duplos ou ports. No entanto, os isoladores também podem não estar ligados uns com os outros. O, pelo menos um outro isolador tem preferentemente as mesmas propriedades tais como as mencionadas para o primeiro isolador.

[0029] No isolador de acordo com a invenção, efetua-se

tipicamente um estágio de fermentação, preferentemente um estágio de fermentação, no qual é produzido o material biologicamente ativo. Preferentemente, esse estágio de fermentação contém uma ou mais inoculações. Por isso, o isolador de acordo com a invenção, contém pelo menos um fermentador.

[0030] No isolador são efetuados tipicamente também um ou mais estágios das medidas necessárias para a purificação do material biológico. Nesse caso, a fermentação e purificação podem ser efetuadas em um e no mesmo isolador ou também em diferentes isoladores, por exemplo, a fermentação no primeiro isolador e a purificação no segundo.

[0031] O estágio de fermentação, que tem por objeto a síntese do material biologicamente ativo, é efetuado em um fermentador. Nesse caso, pode tratar-se eventualmente de um fermentador de funcionamento anaeróbio ou aeróbio. Conforme a técnica do aparelho, o fermentador é equipado de maneira correspondente às respectivas condições de fermentação, como é do conhecimento dos técnicos nesse campo. No caso do fermentador pode tratar-se de um fermentador para a fermentação em batelada, para a fermentação em semibatelada, fermentação em batelada repetida ou fermentação contínua. Preferentemente, trata-se de um fermentador para a fermentação em batelada.

[0032] O estágio de fermentação também pode abranger o pré-cultivo ou cultivo inicial para a inoculação do fermentador principal. As diferentes medidas e equipamento tecnológico de processo correspondente, que é necessário para esse fim, é do conhecimento dos técnicos na área e abrangem, entre outras, um ou mais fermentadores, que permitem uma primeira e/ou segunda expansão do material de vacina da cepa do produtor que produz o material biologicamente ativo. As medidas relacionadas com o mesmo,

abrangem, por exemplo, também o estabelecimento de um banco de células de trabalho, a primeira expansão do material celular, a segunda expansão do material celular e o próprio estágio de fermentação, sendo que pelo próprio estágio de fermentação é entendido especialmente o crescimento das células para a síntese do composto biologicamente ativo. Esses estágios são preferentemente efetuados na temperatura ou gradiente de temperatura definida pelo respectivo organismo produtor. Nesse caso, a temperatura é adaptada eventualmente continuamente ou descontinuamente às condições de produção.

[0033] No isolador também podem ser efetuados um ou mais estágios ou medidas necessárias para a purificação do material biologicamente ativo. De maneira correspondente, o isolador contém as instalações necessárias para este fim.

[0034] A purificação do material biologicamente ativo também pode ser efetuada em um segundo isolador do dispositivo de acordo com a invenção. Caso seja efetuada apenas uma parte das medidas para a purificação no segundo isolador, a outra parte das medidas necessárias é efetuada no primeiro ou em um ou vários outros isoladores.

[0035] Determinadas medidas necessárias ou que estão em relação com a produção do material biologicamente ativo, também podem ser efetuadas do lado de fora de um isolador, especialmente quando essas não estão ligadas com a formação de um aerossol ou o material biologicamente ativo está presente em uma forma ou um recipiente, dos quais/do qual não parte nenhum risco das pessoas envolvidas com a produção ou manuseio ou do meio.

[0036] No caso da fermentação, na qual é produzido o material biologicamente ativo, trata-se preferentemente da fermentação de bactérias, de modo particularmente preferidos são bactérias da família

Clostridium botulinum. Isso é igualmente válido para cepas de *Clostridium botulinum* recombinantes ou geneticamente modificadas, bem como para outros sistemas de expressão heterólogos recombinantes ou geneticamente modificados (por exemplo, *E. coli*).

[0037] Com o equipamento instalado, podem ser fundamentalmente produzidos todos os compostos biologicamente ativos, especialmente proteínas, que são sintetizadas através do cultivo fermentativo de microorganismos.

[0038] O composto biologicamente ativo, que é produzida pelo processo de fermentação, é preferentemente uma toxina, especialmente uma toxina botulínica e a mais preferida, uma neurotoxina botulínica.

[0039] Toxina botulínica é produzida pelas bactérias *Clostridium botulinum* e ocorre em diferentes tipos de soro: toxina botulínica do tipo A, B, C, D, E, F, G. A toxina botulínica produzida pelo *Clostridium botulinum* é um complexo da neurotoxina botulínica, isto é, da proteína responsável pelo efeito tóxico e de proteínas complexantes, que como tais, não são tóxicas. Essas proteínas são hemaglutininas com diferentes massas molares, bem como pelo menos uma proteína não hemaglutinante. Os complexos da neurotoxina botulínica e da proteína de complexo (bacteriana) são geralmente designados como toxina botulínica. A do tipo A, B e C estão comercialmente à venda, o tipo A, por exemplo, como BOTOX®. Esses complexos podem ser ulteriormente elaborados para complexos com diferentes composições da proteína e pureza até formar a própria neurotoxina botulínica. Por isso, o termo neurotoxina botulínica no âmbito desta invenção é utilizado para descrever a proteína, que é responsável pelo efeito tóxico, isto é, pela toxina botulínica de alta pureza, que é livre de proteínas bacterianas do complexo. A neurotoxina botulínica do tipo A apresenta uma massa molecular de cerca de 150 kDa e é vendida

comercialmente pela requerente sob a marca registrada Xeomin[®].

[0040] No âmbito desta invenção são apropriadas todas as formas da "toxina botulínica", especialmente os diversos tipos sorológicos, os diferentes complexos de neurotoxina botulínica e proteínas do complexo, a própria neurotoxina botulínica, bem como toxinas botulínicas ou neurotoxinas botulínicas correspondente modificadas ou produzidas de forma recombinante, inclusive as correspondentes mutações, deleções e outras. Para mutantes apropriados, fazemos referência aos mutantes, que são descritos na WO 2006/027207 A1. Além disso, no âmbito da presente invenção, podem ser produzidas misturas de diferentes tipos sorológicos (em forma complexante ou de alta pureza e/ou recombinante), por exemplo, misturas de toxinas botulínicas dos tipos A e B ou misturas de neurotoxinas botulínicas dos tipos A e B.

[0041] A produção de neurotoxina botulínica do tipo A e B é descrita, por exemplo, no pedido de patente internacional WO 00/74703. Em consequência da propriedade vantajosa de uma imunogeneidade praticamente inexistente de neurotoxina botulínica (isolada) frente aos complexos de neurotoxina botulínica e proteínas do complexo, há assim, especialmente uma importante necessidade, de disponibilizar dispositivos e processos para a produção industrial segura e confiável de neurotoxina botulínica, tal como o faz a presente invenção.

[0042] A escolha e/ou número de isoladores concretamente utilizados é selecionada livremente pelo técnico em função do composto biológico a ser produzido. No âmbito da purificação concreta da neurotoxina botulínica detalhadamente descrita aqui, resulta vantajosamente a utilização de, pelo menos, dois isoladores. Nesse caso, os isoladores diferenciam-se especialmente com respeito à temperatura predominante neles ou em uma parte deles. Desse modo,

no âmbito da presente invenção, é preferível que o primeiro isolador funcione a uma temperatura mais elevada, por exemplo, de cerca de 20 até cerca de 50°C e o segundo isolador funcione a temperaturas mais baixas na faixa de, por exemplo, cerca de -5 até +25°C. No primeiro isolador decorrem aqueles estágios da produção, bem como da purificação, na medida em que tornem necessária uma temperatura correspondentemente mais elevada ou que podem ser efetuados nessa temperatura. Nesses incluem-se especialmente a inoculação, a fermentação e/ou a precipitação da cepa produtiva. Ao contrário, no segundo isolador são efetuados aqueles estágios do processo de produção e especialmente da purificação da neurotoxina, que exigem uma temperatura correspondentemente mais baixa ou que de maneira particularmente vantajosa, podem ser efetuados nessa faixa de temperatura.

[0043] Além disso, será reconhecido, que aqueles estágios na produção geral e da fermentação e da purificação em especial, que podem ser efetuados nas duas faixas de temperatura e, com isso, em cada um dos dois isoladores, são efetuados, por fim, naquele isolador, que é vantajoso sob o ponto de vista de seu dimensionamento e do consumo de energia resultante em consequência do dimensionamento para a manutenção das condições de reação correspondentes para a execução dos estágios de reação, especialmente da temperatura ou sob o ponto de vista da capacidade de manuseio ou possibilidade de execução de cada uma das medidas.

[0044] O segundo isolador é construído fundamentalmente de maneira semelhante ao do primeiro isolador, no entanto, é provido de instalações e objetos de equipamento ou características de equipamentos técnicos de aparelhos, tais como são necessários para a execução dos estágios de purificação ou das medidas para esse fim planejados no segundo isolador. Os objetos de equipamentos

correspondentes são conhecidos pelos técnicos nesse campo. Estágios de purificação preferidos, que são efetuados no segundo isolador são, nesse caso, medidas, que são selecionadas do grupo abrangendo precipitação, extração, centrifugação, diálise e cromatografia. De maneira correspondente, o segundo isolador contém uma ou várias instalações de precipitação, instalações de extração, instalações de centrifugação, instalações de diálise e/ou instalações de cromatografia. Preferentemente, uma instalação de precipitação abrange um reservatório de reação, no qual está contida a solução a ser submetida à precipitação, provida de um tubo de alimentação, para acrescentar o(s) composto(s) necessário(s) para a precipitação. Além disso, o dispositivo de precipitação abrange fundamentalmente agentes de remoção, para remover ou o sobrenadante ou o precipitado. Nesse caso, as instalações apropriadas são conhecidas pelo técnico. Uma instalação de extração abrange tipicamente um reservatório de reação, no qual está contido o líquido a ser extraído, um tubo de alimentação para acrescentar o meio de extração, bem como um dispositivo, para separar o líquido contendo o extrato do líquido extraído. Uma instalação de centrifugação abrange tipicamente uma centrífuga para separar misturas líquido-líquidas ou misturas líquidas-sólidas. A instalação de cromatografia abrange tipicamente uma coluna de cromatografia, que é enchida com material de cromatografia, bem como uma admissão e uma saída, bem como reservatórios com meios apropriados, para alimentar a coluna de cromatografia ou para eluir a mesma. No caso da cromatografia pode tratar-se, por exemplo, da cromatografia Size-Exclusion, HPLC ou cromatografia de afinidade.

[0045] Desse modo está no contexto da invenção, que no caso, de serem utilizados dois ou mais isoladores, estes estão ligados uns com os outros, de modo que meramente todo o dispositivo que

compreende os dois isoladores abrange um tubo de admissão e entrada de ar e saída de ar e os dois isoladores estão ligados com um ou mais tubos intermediários. No entanto, também está no contexto da presente invenção, que tanto o primeiro isolador, quanto também o segundo isolador e/ou cada outro isolador apresentam em cada caso e independentes uns dos outros, um tubo de entrada de ar e um de saída de ar.

[0046] O primeiro e segundo isolador apresentam preferentemente uma pressão interna reduzida comparada com a pressão externa. Desse modo está no contexto da presente invenção, que ambos os isoladores apresentam uma pressão interna idêntica. No entanto, está também no contexto da presente invenção, que ambos os isoladores apresentam pressões internas diferentes. Nesse caso, é especialmente preferível, que a pressão interna daquele isolador seja mais baixa comparada com a do outro isolador, no qual a probabilidade da formação de aerossol condicionada pelos estágios de processo efetuados no respectivo isolador seja maior.

[0047] Na utilização dos dois isoladores, a presença de um composto entre os isoladores na forma de uma passagem, por exemplo, na forma de uma comporta entre os dois isoladores é vantajosa, pois desse modo, assegura-se que a transferência do material produzido ou purificado para os diferentes estágios da produção ou da elaboração possa ser realizada, sem que a barreira formada pelo isolador seja rompida. Em princípio, para o mesmo objeto serve também a concretização do dispositivo ou de cada isolador individual ou pelo menos de um isolador do dispositivo de acordo com a invenção, com o dispositivo de esterilização. Dispositivos de esterilização correspondentes são conhecidos pelos técnicos na área e compreendem, por exemplo, um gerador para a produção de peróxido de hidrogênio em forma de vapor. Nesse caso, a

utilização de peróxido de hidrogênio em forma de vapor é particularmente vantajosa, tendo em vista as condições de subpressão no/nos isolador(es).

[0048] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um processo para a produção fermentativa de um composto biologicamente ativo, sendo que o processo abrange um estágio de fermentação para a produção do composto biologicamente ativo e uma purificação do composto biologicamente ativo, sendo que a produção fermentativa e/ou a purificação é inteira ou parcialmente efetuada em um ou mais isoladores. Preferencialmente, o estágio de fermentação e uma ou várias partes da purificação em um primeiro isolador e uma ou várias partes da purificação em um segundo isolador. Em uma forma de concretização preferida, o estágio de fermentação contém pelo menos um estágio de inoculação. Preferencialmente, esse estágio é efetuado manualmente. Também está no contexto da presente invenção, que são utilizados outros isoladores. No caso do material biologicamente ativo, trata-se preferentemente de uma toxina botulínica, especialmente de uma neurotoxina botulínica, tal como descrito aqui. As características publicadas em relação com o dispositivo de acordo com a invenção, representam também características, tanto individuais, quanto também em combinação desejada do processo de acordo com a invenção.

[0049] Medidas em relação com a elaboração são centrifugação, diálise, extração, precipitação, precipitação de sulfato de protamina, precipitação de sulfato de amônio, solubilização de precipitados presentes tipicamente como pélletes, diálise, estágios de cromatografia ou processos de cromatografia e filtração. No caso dos processos de cromatografia, trata-se preferentemente uma sequência de vários processos de cromatografia individuais. Nesse caso, pode tratar-se em cada caso do mesmo processo de cromatografia ou de

um processo de cromatografia diferente. Preferencialmente, no caso de o composto farmacologicamente ativo ser neurotoxina botulínica do tipo A, trata-se de uma seqüência de três estágios de cromatografia com a utilização de materiais de coluna apropriados. Nesse caso, é possível e preferível, que o respectivo eluato seja submetido a uma diálise antes de ser aplicado na próxima coluna.

[0050] Após a própria fermentação e separação do meio de fermentação das células, o meio de fermentação é submetido a uma primeira precipitação com o objetivo, de remover proteínas grandes. Essa precipitação é efetuada preferencialmente no primeiro isolador. A centrifugação do precipitado obtido dessa maneira é efetuada preferencialmente já no segundo isolador. A precipitação é preferencialmente uma precipitação ácida. Condições de reação para uma tal precipitação ácida são conhecidas pelo técnico na área. Tipicamente utiliza-se 3N H₂SO₄, para acidificar o sobrenadante para um pH de 3,5. A centrifugação é efetuada tipicamente a 2400 x g por 20 minutos a 4°C. O pélete obtido através da centrifugação é lavado, preferentemente repetidas vezes, com água.

[0051] No caso da cepa de *Clostridium* utilizada, trata-se preferentemente de *C. botulinum* tipo A, que foi armazenado como cultura mãe em um meio apropriado a temperaturas que asseguram a estabilidade. Para a fermentação utiliza-se preferentemente o processo descrito por DasGupta B. R. e outros em *Toxicon*, volume 22, nº 3, páginas 414 até 424, 1984. Nesse caso, 2 % do meio N-Z-amina tipo A são adicionados com 0,5 % de extrato de levedura e 0,6 % de pasta de levedura autoclavada e com 4N NaOH é ajustado um pH de 7,2 e em seguida, o meio preparado dessa maneira é autoclavado. Nesse meio é acrescentada glicose (20 % em peso, por volume) de glicose autoclavada separadamente, o que resulta em uma concentração de glicose de 0,5 % no meio. A incubação foi efetuada

sem agitação a 37°C, sendo que a fermentação foi interrompida após 96 horas. Está no contexto da presente invenção, que além da fermentação às bateladas descrita acima, também podem ser efetuadas a fermentação em semibateladas fermentações às bateladas repetidas ou fermentações contínuas. As medidas necessárias para esse fim e as necessidades técnicas de aparelhagem são conhecidas pelos técnicos na área.

[0052] Em um outro estágio, partindo do pélete, o precipitado é novamente dissolvido com o objetivo, de liberar a toxina do pélete. Medidas para esse fim são conhecidas pelos técnicos e entre outras, descritas por DasGupta B. R. e outros (vide acima). Por exemplo, a extração pode ser efetuada por meio de tampão de ácido cítrico-citrato trissódico a 0,1 M, pH 5,5 por uma hora. A essa extração segue-se, imediatamente um outro estágio de centrifugação, tipicamente com 9800 x g por 20 minutos a 4°C. O pélete obtido dessa maneira pode ser eventualmente extraído outra vez tal como descrito acima. O sobrenadante da extração e no caso da repetição da extração, os dois sobrenadantes, foi imediatamente submetido a uma precipitação com sulfato de protamina. Foi permitido continuar a precipitação a 8°C durante a noite. Em seguida, o precipitado foi novamente centrifugado por 20 minutos a 4°C e 12000 x g. No estágio da precipitação de sulfato de protamina remove-se especialmente DNA.

[0053] O sobrenadante obtido após a centrifugação é submetido a uma precipitação de sulfato de amônio ou no primeiro isolador ou no segundo isolador, sendo que aqui são removidas outras proteínas maiores. Após a precipitação com sulfato de amônio, é novamente introduzido um estágio de centrifugação e em seguida, o pélete obtido dessa maneira é dissolvido outra vez e opcionalmente submetido a uma diálise. Em seguida, o extrato obtido do pélete preferentemente dializado é novamente centrifugado e submetido a uma sequência de

estágios de cromatografia com o objetivo, de purificar a neurotoxina botulínica, purificar especialmente até a homogeneidade. Os estágios de cromatografia individuais servem, nesse caso, especialmente para remover o sulfato de protamina, DNA residual, partes de pequenas proteínas e proteínas de tamanho médio, bem como as hemaglutininas do complexo de neurotoxina botulínica-proteína. Para esse fim, efetua-se uma seqüência de vários estágios de cromatografia em uma forma de concretização preferida. Depois, o eluato é filtrado. Nesse caso, a filtração serve para reduzir os germes do eluato, que depois contém preferentemente a neurotoxina botulínica pura e nenhuma proteína do complexo. Opcionalmente antes da filtração o eluato pode ser diluído ou acrescentados coadjuvantes apropriados.

[0054] Em outros estágios, é efetuada uma nova filtração estéril após a adição dos coadjuvantes. Nesse caso, a filtração é efetuada em reservatórios de reação, que em seguida, preferentemente em um estágio separado do processo, são submetidos a uma liofilização. O produto liofilizado obtido dessa maneira é fechado.

[0055] Os técnicos na área reconhecerão, que antes da inoculação, bem como após diversos estágios do processo, preferentemente da precipitação do sulfato de amônio e da filtração no primeiro isolador, este é submetido a uma descontaminação ou a uma esterilização. No caso da esterilização trata-se preferentemente de um tal, que é efetuada por meio de peróxido de hidrogênio em forma de vapor (VHP).

[0056] As características da invenção publicadas no relatório descritivo acima e nas reivindicações podem ser essenciais tanto individualmente, quanto também em combinação desejada para a realização da invenção em diversas formas de concretização.

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo para a produção fermentativa de um composto biologicamente ativo, caracterizado pelo fato de que o dispositivo compreende, pelo menos, um primeiro isolador, que contém um fermentador e que é envolvido por uma câmara de trabalho, sendo que a câmara de trabalho está ligada com o meio ambiente através de uma comporta de pressão, sendo que no isolador e na câmara de trabalho predomina em cada caso uma subpressão, em que a pressão (em relação à pressão ambiente) no isolador é mais baixa do que a pressão (em relação à pressão ambiente) na câmara de trabalho e sendo que na comporta de pressão predomina um excesso de pressão em relação à pressão ambiente.

2. Dispositivo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a pressão no isolador é de 20 até 200 Pa mais baixa do que a pressão ambiente.

3. Dispositivo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a pressão na câmara de trabalho é de 5 até 50 Pa mais baixa do que a pressão ambiente.

4. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a pressão na comporta de pressão é de 10 até 100 Pa mais elevada do que a pressão ambiente.

5. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o dispositivo compreende, pelo menos, um segundo isolador, sendo que o segundo isolador preferentemente não contém um fermentador.

6. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o dispositivo e/ou o primeiro e/ou o segundo isolador compreende pelo menos um tubo de entrada de ar e um de saída de ar, sendo que o tubo de entrada de

ar e de saída de ar está provido de um filtro, sendo que o filtro é preferentemente um filtro HEPA.

7. Dispositivo de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a pressão interna do primeiro isolador e do segundo isolador é igual.

8. Dispositivo de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a pressão interna do primeiro isolador é diferente da pressão interna do segundo isolador.

9. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que o primeiro e o segundo isolador estão ligados uns com os outros por uma passagem, sendo que a passagem permite um transporte de material do primeiro para o segundo isolador e preferentemente também um transporte de material do segundo isolador para o primeiro isolador.

10. Dispositivo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a passagem é uma comporta.

11. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o dispositivo compreende uma instalação de esterilização e/ou uma instalação de desinfecção.

12. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o primeiro isolador compreende um fermentador que trabalha anaerobicamente.

13. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o primeiro isolador compreende uma instalação de precipitação.

14. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o primeiro isolador compreende uma instalação de filtração.

15. Dispositivo de acordo com qualquer uma das

reivindicações 5 a 14, caracterizado pelo fato de que o segundo isolador compreende uma instalação de extração.

16. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 15, caracterizado pelo fato de que o segundo isolador compreende uma instalação de precipitação.

17. Dispositivo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 16, caracterizado pelo fato de que o segundo isolador compreende pelo menos uma instalação de cromatografia.

18. Processo para a produção fermentativa de um composto biologicamente ativo, caracterizado pelo fato de que compreende

- um estágio de fermentação para a produção do composto biologicamente ativo,

- um estágio de purificação do composto biologicamente ativo,

sendo que o processo é efetuado em um dispositivo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

19. Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o composto biologicamente ativo é uma toxina ou uma outra proteína obtida por fermentação, preferentemente uma toxina botulínica, especialmente uma neurotoxina botulínica.

20. Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a toxina botulínica é uma toxina botulínica de *Clostridium botulinum* dos tipos A, B, C, D, E, F ou G ou é uma mistura de dois ou mais destes tipos, preferentemente é uma toxina botulínica do tipo A.

21. Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a toxina botulínica ou a mistura das toxinas botulínicas é uma neurotoxina botulínica ou uma composição de neurotoxinas botulínicas.

22. Processo de acordo com qualquer uma das

reivindicações 18 a 21, caracterizado pelo fato de que o estágio de fermentação é efetuado no primeiro isolador e a purificação (estágio) é efetuada inteira ou parcialmente em um segundo isolador.

23. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, caracterizado pelo fato de que o estágio de fermentação e uma parte da purificação são efetuados no primeiro isolador e uma outra parte da purificação (estágio) é efetuada no segundo isolador.

24. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 23, caracterizado pelo fato de que o estágio de fermentação e a precipitação e filtração do produto do estágio de fermentação são efetuados no primeiro isolador como parte da purificação (estágio).

25. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 24, caracterizado pelo fato de que o primeiro isolador e o segundo isolador são operados com temperaturas iguais ou diferentes.

26. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 25, caracterizado pelo fato de que a temperatura no primeiro/ou segundo isolador é alterada em função do respectivo estágio do processo.

27. Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a temperatura no primeiro isolador perfaz de cerca de 20 até cerca de 50°C e a temperatura no segundo isolador perfaz cerca de -5 até cerca de +25°C.

28. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 27, caracterizado pelo fato de que o processo compreende os seguintes estágios, preferentemente nesta ordem:

a) no primeiro isolador

- inoculação do meio de fermentação com a cepa produtora

para o composto biologicamente ativo, de preferência, manualmente;

- fermentação da cepa produtora;
- separação do sobrenadante das células da cepa

produtora; e

- precipitação do sobrenadante;

b) no segundo isolador:

- centrifugação do sobrenadante precipitado com formação de um pélete;

- extração do pélete, centrifugação e obtenção de um sobrenadante;

- precipitação do sobrenadante com subsequente centrifugação com formação de um sobrenadante;

c) no primeiro ou segundo isolador:

- precipitação do sobrenadante;

- centrifugação do precipitado;

- solubilização do pélete obtido através da centrifugação do precipitado;

- diálise do pélete solubilizado e centrifugação do dialisado;

- submissão do dialisado à cromatografia

- filtração do eluato obtido.