

PURIFICAÇÃO INDUSTRIAL DO TOXÓIDE TETÂNICO POR GEL FILTRAÇÃO

Sally Muller Affonso PRADO**
Mary Dalva Caparroz VANCETTO**
Fernando FRATELLI**
Michel Marie PRAL**
José Marcos de OLIVEIRA**
Hisako Gondo HIGASHI*

RESUMO: Com o fracionamento pelo sulfato de amônio ou com a precipitação alcoólica, são obtidos toxóides tetânicos com pureza ao redor de 500 Lf/mg N.P. incompatíveis com as exigências da OMS, de 1000 a 1200 Lf/mg N.P. Foram descritas técnicas eficazes com a utilização da gel filtração em Sephadex G200, G100 e G75 que, no entanto, pela longa duração do processo, dificultam a produção em escala industrial. Introduzimos, assim, uma metodologia baseada na combinação da pré-precipitação pelo sulfato de amônio com a gel filtração em Sephadex G50 com a qual obtivemos toxóides tetânicos com grau médio reprodutivo de pureza ao redor de 2.312, 75 Lf/mg N.P. e resposta imunogênica satisfatória.

UNITERMOS: Purificação, toxina, toxóide tetânico, ultrafiltração, gel filtração, Sephadex

INTRODUÇÃO

De acordo com as Normas da Organização Mundial da Saúde (OMS)⁹ as Anatoxinas Tetânicas (ATT), destinadas à produção de vacinas para uso humano, devem apresentar um grau de pureza igual ou maior do que 1000 Lf/mg N.P. . Os métodos de purificação geralmente utilizados pela maioria dos laboratórios produtores e que atendem às Normas da OMS, baseiam-se na possibilidade de fracionamento da ATT proporcionada pelo seu tratamento com o sulfato de amônio

* Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do Instituto Butantan
** Seção de Vacinas Anaeróbicas do Instituto Butantan
Recebido para publicação em 31.01.92 e aceito em 24.06.92.

(SA)⁶, seguido de diálise e concentração do produto por ultrafiltração molecular. A precipitação alcoólica da ATT foi também descrita⁸ mas, além de não atingir o grau de pureza recomendado pela OMS necessita de equipamentos de custos elevados para a manutenção de temperatura a -5°C durante a maior parte do processamento.

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, para o atendimento em bases econômicas aceitáveis quanto à quantidade requerida de vacina contra o tétano, a técnica de fracionamento da ATT pelo sulfato de amônio parece ser, ainda, a melhor opção. Ocorreram, todavia, com o tratamento da ATT pelo sulfato de amônio seguido de ultrafiltração, de acordo com a metodologia empregada no Instituto Butantan (IB), os seguintes problemas: médias baixas de valores de pureza situando-se em 428,40 Lf/mg de N—protéico; dispêndio elevado de tempo na fase de ultrafiltração e produto final de coloração fortemente acastanhada e persistente revelando comprometimento da sua pureza.

Através de técnicas cromatográficas Latham e cols.⁴, empregando o gel de Sephadex conseguiram separar as proteínas específicas daquelas impurezas responsáveis pela coloração acastanhada do produto. Este mesmo grupo, posteriormente, descreve o método combinado de fracionamento da ATT pelo sulfato de amônio e purificação por cromatografia em géis de Sephadex G100 e G200⁵. Com esta técnica é possível obter ATT com 1000 ou mais Lf/mg N protéico.

Em que pese a obtenção de ATT de elevado grau de pureza pela técnica acima mencionada, a sua aplicabilidade em escala industrial era limitada pelo custo elevado das colunas de Sephadex, além de lentidão no processamento.

Em seqüência às observações de Latham e cols.⁵, os autores, estabeleceram os objetivos deste trabalho que consistiram, essencialmente, na obtenção de ATT com grau de pureza compatível com as Normas da OMS, num período de tempo de processamento cromatográfico menor e a custo relativamente mais baixo.

Para atingir os objetivos propostos foi aplicado o método de fracionamento pelo S.A. em anatoxina bruta, previamente concentrada e, em seguida a diálise, o produto foi submetido ao processamento cromatográfico em coluna de Sephadex G50.

MATERIAIS E MÉTODOS

Toxina Tetânica (TT):

Lotes de 360 litros obtidos por processo fermentativo^{1,2} utilizando a cepa de *C. tetani* Harvard-Caracas, desenvolvida em meio de Müeller modificado por Latham³.

Anatoxina Tetânica (ATT):

Obtidas pela atividade destoxicante de 6‰ V/V de formalina, durante 30 dias a 37°C , sobre as TT previamente concentradas 6 a 10 vezes por ultrafiltração e esterilizadas por filtração através de cartuchos de 0,22 μ .

Testes realizados⁹:

- L+ (Limite Morte)
- MTV (Máximo Valor de Toxina)
- TT — DMM (Dose Mínima Mortal — Camundongos)
- Teor de Nitrogênio protéico
- Limite floculante
- Toxicidade específica
- Atividade antigênica
- ATT — Teor de Nitrogênio protéico
- Limite floculante
- Formaldeído residual

Parâmetros mínimos aceitáveis para as TT e ATT

- TT — Estar estéril e ter título "in vitro" de pelo menos 25Lf/ml.
ATT — Ser atóxica e ter no mínimo 15Lf/ml.

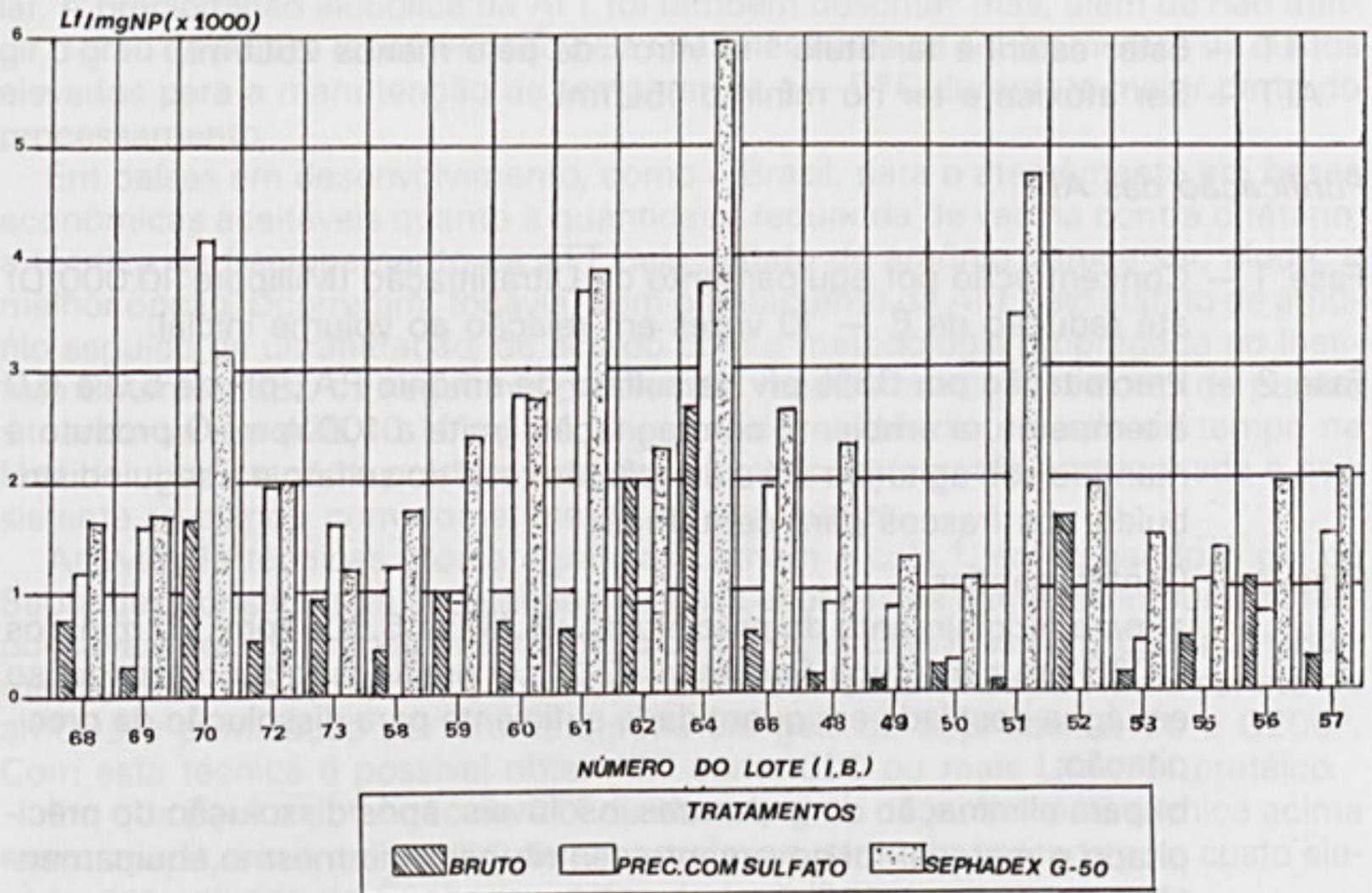
Purificação das ATT

- Fase 1 — Concentração por equipamento de Ultrafiltração (Millipore 10.000 D) até redução de 6 — 10 vezes em relação ao volume inicial.
- Fase 2 — Precipitação por 33% p/v de sulfato de amônio P.A., pH de 5,0 a 6,0 à temperatura ambiente com agitação limite a 100 rpm. O produto é mantido sob agitação até a dissolução total do sulfato e a seguir distribuído nos frascos para centrifugar.
- Fase 3 — Centrifugações
- a) para recolhimento do precipitado de ATT: a 5.000 rpm, 20 minutos a 0°C em centrífuga Beckman J2-21. O precipitado foi ressuspenso em água destilada em quantidade suficiente para dissolução da precipitação;
 - b) para eliminação de impurezas insolúveis: após dissolução do precipitado o material foi novamente centrifugado no mesmo equipamento, a 8.000 rpm, 90 minutos a 0°C.
- Fase 4 — Diálise e Concentração — dialisado em ultrafiltro (Millipore, membrana 10.000 D) até a eliminação do sulfato de amônio, (teste com solução de cloreto de bário). No mesmo equipamento a ATT é concentrada 6 a 10 vezes.
- Fase 5 — Processamento cromatográfico — Uma coluna de vidro de 58 cm de comprimento x 7,5 cm de diâmetro interno foi empacotada com Sephadex G50 tipo médio e equilibrada a pH 6,8 com solução salina tamponada (NaCl: 0,68g; Na₂HPO₄: 0,105g; KH₂PO₄: 0,081g; H₂O dest. qsp 100ml), como segue: 2.700ml de gel foram colocados gradualmente na coluna para que as partículas do Sephadex sedimentassem-se por gravidade. Volume de 900ml de ATT foi aplicado, controlando-se a separação de todas as frações por precipitação com ácido tricloroacético a 20%. De cada fração obtida determinou-se o Lf e aquelas que apresentaram Lf igual ou maior do que 50Lf/ml foram reunidas, acrescentando 0,02% P/V de timerosal como preservativo e o pH corrigido entre 6,0 a 7,0.
- Fase 6 — Esterilização, armazenamento e testes da ATT purificada e concentrada — a esterilização foi efetuada por filtração em membrana inerte de 0,22u (Millipore) e o produto armazenado em frascos de vidro a 4°C. De cada lote de produto purificado foram extraídas amostras para as provas Físico-Químicas, Biológicas e Imunoquímicas segundo recomendações da OMS⁹.

Reutilização da coluna — o gel de Sephadex foi lavado com 10.000 ml de água destilada e ressuspenso em 6.000 ml de água destilada adicionada de 0,02% P/V de azida sódica e a coluna armazenada a 4°C.

PURIFICAÇÃO DE ANATOXINA TETÂNICA

RESULTADOS



Gráf. 1 Comparação da purificação de Anatoxina purificada com a Anatoxina bruta e precipitado com sulfato de amônio.

TABELA 1

Média de pureza antes e após o tratamento cromatográfico e de rendimento.

Nº de lotes de ATT Purificados	Pureza-Lf/mg NP* Cromatografia		Rendimento %
	Antes	Após	
21	881,58	2.312,75	82,63

* NP — Nitrogênio protéico

Os graus de pureza mínimo e máximo observados foram 1.148,15 Lf/mg NP e 5.800 Lf/mg NP, respectivamente.

A atividade imunogênica dos produtos finais diluídos para conter 15Lf/ml foi entre 3UI a 4UI/ml.

Com os equipamentos descritos a purificação de um lote de 45 litros de ATT, compreendendo desde a Fase 1 até a Fase 5, pode ser obtida em 4 dias, empregando como mão-de-obra 2 funcionários.

DISCUSSÃO

Na produção de Toxóide Tetânico ou para o seu uso nas vacinas combinadas este componente deve ser purificado — bem como os outros da vacina combinada — para minimizar os riscos de efeitos colaterais. Os toxóides considerados

de 1ª geração eram grosseiramente purificados e, geralmente, por precipitações pelo sulfato de amônio⁸. Os produtos assim obtidos continuavam demonstrando propriedades alergênicas devido à presença de antígenos dispensáveis. Estes antígenos acessórios também sobrecarregam desnecessariamente o sistema imunitário do receptor. Para a obtenção de toxóides de 2ª geração vêm sendo aplicadas técnicas cromatográficas de purificação às TT ou ATT, segundo preferência dos diferentes produtores. Com estes toxóides a atividade alergizante é diminuta e os mesmos apresentam atividade imunogênica elevada que permite, inclusive, a redução de volume de anatoxina a ser aplicada para a profilaxia.

As técnicas cromatográficas propostas por Latham e cols.^{4,5}, que utilizam o Sephadex G200, G100 e G75, foram experimentadas pelos autores no Instituto Butantan, com as quais obtiveram resultados amplamente satisfatórios quanto ao grau de pureza. No entanto, em nossas condições de trabalho, essas técnicas não puderam ser conciliadas com os volumes relativamente grandes de ATT a serem tratados. Com colunas do tipo simples, cujo fluxo de passagem do material ocorre por gravidade, o tempo dispendido para a coleta das frações foi demasiadamente longo. Constatada esta limitação, os autores resolveram introduzir o sistema de filtração em gel de Sephadex G50, conforme a técnica descrita, através da qual prepararam 2.654.933 doses de Vacina Antitetânica, com um rendimento médio de recuperação de anatoxina igual a 82,63%. O grau médio de pureza obtido foi de 2.312,75Lf/mg NP, praticamente duas vezes superior ao mínimo preconizado pela OMS⁹. As provas de potência realizadas nos lotes purificados demonstraram resultados iguais ou superiores de 3UI/ml no soro de cobaias inoculadas com 1/3 da dose total humana, de acordo com os requisitos⁷ descritos para o produto. O período de tempo consumido para a purificação cromatográfica foi 3 vezes inferior àquele gasto pela técnica de Latham. A reprodutibilidade dos resultados aliada ao custo operacional mais baixo do que o da técnica de Latham e cols., nos autoriza sugerir o método descrito para a purificação do Toxóide Tetânico.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Darío Pinto de Miranda pelas sugestões e assessoria na parte técnica, ao Dr. Rosalvo Guidolin pelas sugestões e revisão do trabalho e à Dra. Ivone K. Yamaguchi pelo auxílio técnico prestado durante a execução do trabalho relativo às reações imunoquímicas.

ABSTRACT: In using the process of fractionation by ammonium sulfate or by alcohol pre-precipitation, it is possible to obtain tetanic toxoids that contain a purity level of approximately 500Lf/mg N.P., incompatible to the requirements of OMS of 1,000 to 1,200Lf/mg N.P. Descriptions of efficient techniques which utilize gel filtration-in Sephadex G200, G100 and G75 — have been made; however, due to the prolonged duration of this process, its use for industrial production is unadvisable. Therefore, we have introduced a methodology based on the combination of pre-precipitation with ammonium sulfate and gel filtration in Sephadex G50 from which we have obtained tetanic toxoids containing an average level of purity reproduction of about 2,312.75Lf/mg N.P. and presenting satisfactory immunologic response.

KEYWORDS: Purification, toxins, tetanus toxoids, ultrafiltration, gel filtration, Sephadex.

PURIFICAÇÃO DE ANATOXINA TETÂNICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HERMET, P. Van. Vaccine production as a unit process. *Prog. Ind. Microbiol.*, v. 13, p. 248-260, 1974.
2. HERMET, P. Preparation of purified: tetanus toxoid. In: *Instructions for the preparation of bacterial and viral vaccines*. Bilthoven: Rijks Inst. Voor de Volksgezondheid, 1979. p. 601-615.
3. LATHAM, W.C., BENT, D.F., LEVINE, L. Tetanus toxin production in the absence of protein. *Appl. Microbiol.*, v. 10, p. 146-152, 1962.
4. LATHAM, W.C., JENNESS, C.P., TIMPERI, R.J.K. Purification and characterization of tetanus toxoids and toxin: fractionation of tetanus toxoid by gel filtration. *J. Immunol.*, v. 95, p. 487-493, 1965.
5. LATHAM, W.C., MICHELSEN, C.B., EDSALL, G. Preparative procedure for the purification of toxoids by gel filtration. *Appl. Microbiol.*, v. 15, p. 616-621, 1967.
6. LEVINE, L., STONE, J.L. The purification of tetanus toxoid by ammonium sulfate fractionation. *J. Immunol.*, v. 67, p. 235-241, 1951.
7. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Division of Biologics Standards. *Minimum requirements: tetanus toxoide*. 4. rev. Bethesda, Md, 1952.
8. PILLEMER, L., GROSSIBERG, D.B., WITTLER, R.G. The immunochemistry of toxins and toxoids — The preparation and immunologic evaluation of purified tetanus toxoid. *J. Immunol.*, v. 54, p. 213-224, 1946.
9. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Manual for the production and control of vaccines: tetanus toxoid*. I.S.I.P.I, WHO, 1977.

63,68	57,213	55,188	12
-------	--------	--------	----

ABSTRACT: In using the process of fractionation by ammonium sulfate or by alcohol pre-precipitation, it is possible to obtain tetanic toxoids that contain a purity level of approximately 200 mg/ml. The requirements of OMS of 1000 to 1500 IU/ml are described. A sufficient technique which utilizes gel filtration in 2000 G₂₀₀ and G75 — have been made, however, due to the prolonged duration of this process, its use for industrial production is undesirable. In this work, we have introduced a methodology based on the combination of precipitation with ammonium sulfate and gel filtration in 2000 G₂₀₀ from which we have obtained tetanic toxoids containing an average level of purity approximately equal to 212.75 IU/ml N.R. and presenting satisfactory immunologic response.