

Desenvolvimento da vacinas BCG recombinante neonatal contra coqueluche¹

Luciana Cezar de Cerqueira Leite²

Eu queria agradecer à organização deste simpósio pelo convite para falar um pouco sobre a minha experiência com o desenvolvimento de uma vacina e quais os problemas que encontramos no processo de patentear produtos.

Basicamente estamos investindo no desenvolvimento da vacina neonatal de BCG recombinante contra coqueluche. Esse estudo foi realizado no Cento de Biotecnologia com colaboração de muitas pessoas. Estávamos tentando desenvolver uma vacina quádrupla, BCG/DPT (DPT é a vacina contra Tétano, Difteria e Pertussis), visando ampliar a cobertura. Vou me concentrar na Pertussis, que é a que avançou mais e cujo processo está sendo transferido para a produção.

A vacina de Pertussis imuniza contra a tosse comprida ou coqueluche e as vacinas atuais que existem são de dois tipos: uma vacina celular inativada, e agora temos diferentes versões de vacinas acelulares. Estas são chamadas de DPT celular ou DPT acelular. Essas vacinas são administradas em doses aos dois, quatro e seis meses, com reforço a um ano e meio e cinco anos, no total de cinco doses necessárias para atingir a proteção máxima contra essas doenças.

¹ Transcrição de palestra feita no XXII Workshop Temático do CAT / CEPID: Da bancada ao produto

² Pesquisadora do Centro de Biotecnologia ã Instituto Butantan. lcclite@butantan.gov.br

Estas vacinas são extremamente eficientes quando o esquema de vacinação completo é cumprido, apesar disso ainda temos no mundo, de vinte a quarenta milhões de casos de coqueluche. Uma parte ocorre porque não se alcança a vacinação completa com DPT. 1% desses casos leva à morte, principalmente em crianças abaixo de seis meses de idade. Isso ocorre porque tanto o DPT celular como acelular, não são efetivos em crianças abaixo de seis meses. Existe, então, uma janela de oportunidade para infecção até seis meses de idade e essa é uma das questões que vamos tentar resolver.

Porque utilizar o BCG recombinante para tentar resolver esses problemas? Porque o BCG apresenta uma série de vantagens: entre elas a elevada segurança da vacina e principalmente porque pode ser dada ao nascimento e envolve baixos custos de produção. Essas são vantagens que poderiam ser importantes neste caso.

A nossa pergunta inicial era: se é possível fazer uma vacina de BCG/DPT tetravalente, que tipo de resposta imune seria induzida e qual o nível de proteção seria obtida usando essa vacina em camundongos neonatos?

Então, falando sobre o processo de produção de uma vacina recombinante, basicamente temos que escolher um gene de uma proteína antigênica capaz de conferir proteção contra o respectivo patógeno e um vetor de expressão em micobactéria. Temos que fazer a construção do plasmídeo de expressão e realizar a transformação de BCG competente. O vetor de expressão tem gene de resistência a antibiótico, portanto é feita uma seleção dos transformantes com este antibiótico. Isolados os clones, é verificado se aquelas bactérias expressam o antígeno heterólogo. Se for o caso, prepara-se a vacina, que é administrada em camundongos e analisada quanto à indução de resposta imune específica e, tendo-se um modelo animal adequado, avalia-se a proteção contra desafio.

Esse é o processo que foi realizado para BCG-DPT e eu vou concentrar nos resultados de Pertussis. Aqui o antígeno usado para Pertussis é a subunidade S1 da toxina Pertussis, que havia sido modificada por mutação sitio-dirigida no laboratório do Dr. Rino Rappuoli,

na Itália. O Dr. Rino era inicialmente de uma empresa pequena chamada Sclavo, que depois virou Biocine, que depois foi adquirido pela Chiron e agora ele é da Novartis (grande multinacional na área de vacinas). Essa vai ser uma questão importante para a gente pensar como vai ser esse patenteamento depois. Além disso, era necessário um vetor de expressão. Utilizamos vetores desenvolvidos no Instituto Pasteur – eles haviam desenvolvido vários vetores de expressão com o promotor da beta-lactamase. Esses vetores foram cedidos para o Butantan e fizemos as construções baseadas nesses vetores.

Pode-se ver a expressão dos antígenos de tétano e de difteria, mas não vou entrar em detalhes, e também pode-se ver a expressão do antígeno S1PT de Pertussis. Pode-se observar no Western Blot, revelado com anticorpo anti-toxina pertussis, que o S1PT pode ser expresso em fusão, com a seqüência sinal ou com a beta-lactamase inteira nos extratos de BCG.

Obtida uma bactéria que expressa o antígeno e que pode, talvez, servir de vacina, nós temos que testar se esta vacina funciona. O teste em geral é realizado da seguinte forma: os animais são imunizados com a vacina, depois de quinze dias avalia-se a resposta imune induzida contra a toxina Pertussis e faz-se um desafio intracerebral com a *Bordetella Pertussis* numa dose letal; se os animais estão protegidos, eles não morrem e é computada a sobrevivência.

Os camundongos foram imunizados e foi verificado o tipo de resposta imune induzido. Neste caso, não houve indução de resposta humoral, mas de uma resposta celular, que era verificada nos esplenócitos dos animais imunizados, pela elevada produção de interferon gama específica contra PT. Então os animais foram imunizados e depois de quinze dias foram desafiados com uma dose letal de *Bordetella pertussis*. Pode-se observar que dos animais não imunizados, a grande maioria morre. A imunização com a vacina DPT convencional do Butantan apresenta uma alta sobrevivência e o BCG-Pertussis apresenta também uma elevada sobrevivência.

Bom, com isso mostramos que esta cepa tem um potencial como vacina, para usar na imunização contra Pertussis, mas para

fazer uma vacina para ser usada em humanos, de fato, muita coisa tem que acontecer antes disso. Uma será verificar a resposta imune em camundongos neonatos, já que a proposta será imunizar as crianças ao nascimento. Outra questão será verificar a resposta imune induzida contra a micobactéria, porque não se quer prejudicar a proteção induzida por BCG contra tuberculose. Além disso, será necessário conseguir a expressão desse antígeno de uma forma estável, sem gene de resistência a antibiótico. Depois disso, teremos que fazer a produção de todo esse processo em condições de boas práticas de fabricação, para ir para os ensaios clínicos. Então a primeira questão foi verificar no modelo de camundongos neonatos, que tinha sido recentemente estabelecido, se essa imunização oferecia proteção contra desafio. Considera-se que um camundongo de uma semana é mais ou menos equivalente a uma criança de 28 dias, então nós propomos um esquema de imunização de uma dose no dia 5, às vezes uma segunda dose no dia 12 e um desafio no dia 21, que ainda é considerado um período de infância inicial.

Caracterizamos a resposta imune e a proteção em camundongos neonatos. Pode-se ver que 100% do grupo Salina morre, e que os animais imunizados com DPT também morrem. Isso reproduz o que é verificado em humanos, que não são protegidos nessa idade; e a vacina de BCG Pertussis confere 100% de proteção. Nesse caso, verificamos uma proteção inespecífica do BCG; portanto aumentamos a dose de desafio, e reduzimos a proteção inespecífica do BCG e ainda tivemos uma proteção com o BCG-Pertussis.

Com esses resultados foi demonstrado que em animais neonatos se consegue induzir uma proteção numa faixa de idade que a vacina de DPT não induz; estes resultados indicam que existe um potencial para reduzir aquela janela de seis meses em que as crianças não são protegidas.

Nós também tivemos que verificar a resposta imune induzida contra tuberculose. A resposta humoral se mostrou interessante no sentido de proteger contra tuberculose, a resposta celular também. Aí foi realizado um desafio. Os animais são imunizados, recebem

um tratamento com antibiótico para eliminar o BCG, depois recebem uma injeção intra-traquial de *M. tuberculosis* virulenta e depois de 75 dias é contada a carga de bactéria no pulmão.

Com isso se estabelece a proteção contra a tuberculose. Os animais não imunizados têm da ordem de 10^5 bactérias no pulmão e isso está de acordo com os dados da literatura. Animais imunizados com BCG em geral apresentam uma redução de um log na carga bacteriana e isso é considerado protetor. A BCG-Pertussis induz uma proteção comparável ao BCG, o que indica que ela pode ser usada como uma vacina neonatal sem comprometer a proteção contra a tuberculose.

Aqui é uma outra construção em BCG recombinante que acabou mostrando uma proteção melhor contra a tuberculose que o próprio BCG. Isso é um resultado extremamente interessante e que também tem um potencial de patenteamento que depois vai entrar em discussão.

Bom, a última coisa a fazer é a expressão estável do antígeno sem gene de resistência a antibiótico. Para isso foi utilizado um processo complicadíssimo, que envolve a complementação de auxotrofia. O BCG auxotrófico não cresce em meio deficiente de aminoácido, mas este pode se transformar com um plasmídeo que expressa o gene deletado da via biosintética, e ele passa a crescer normalmente. Nesse mesmo plasmídeo pode-se expressar a proteína recombinante. Dessa forma, pode-se expressar estavelmente o antígeno em BCG.

Esse processo foi realizado em uma colaboração com o grupo do Albert Einstein College of Medicine que tinha estabelecido uma técnica de obtenção de auxotrofos bem definida.

Foram construídos dois vetores de complementação para expressão ao mesmo tempo do antígeno. Então utilizamos o plasmídeo de expressão, no qual foi inserido um gene para ser expresso em Tanden que era o gene que havia sido deletado. Neste outro, nós utilizamos um vetor que eles já tinham, que já expressava o gene de complementação, inserimos o nosso cassete de expressão. Basicamente todos os sistemas funcionaram Então retiramos o gene de resistência a anti-

biótico. Teoricamente esta cepa poderia ser utilizada como vacina; no entanto, no Brasil usa-se uma cepa que não é usada em nenhum outro lugar do mundo, que é a Cepa Moreau. Aquelas construções haviam sido feitas na Cepa Pasteur. Portanto, nós tivemos que fazer tudo de novo com a Cepa Moreau e ainda produzir em condições GMP (boas práticas de manufatura). Eu não vou entrar em detalhes, porque é um esquema complicado para fazer a integração do cassette que vai deletar aquele gene, que é feito através de micobacteriófagos e isso é uma técnica proprietária do Albert Einstein College of Medicine. Tendo os micobacteriófagos, depois o BCG infectado e depois de uma série de passos a gente consegue um BCG auxotrófico sem gene de resistência a antibiótico. Nós já temos esse vetor produzido em condições GMP no laboratório.

Basicamente, as conclusões desses estudos são: é possível expressar essas toxinas no BCG, essa vacina induz proteção contra Pertussis em animais neonatais, ao contrário do DPT, e também induz proteção adequada contra tuberculose. Para ser usada como vacina humana conseguimos a expressão dos antígenos sem gene de resistência a antibiótico, complementando as cepas auxotróficas. Esse processo está para ser transferido para o setor produtivo para a produção em condições GMP e para os ensaios clínicos.

Basicamente, então, agora temos um processo definido de produção de uma vacina que tem um potencial interesse para a saúde pública. Às questões abordadas eu já adianto que não tenho respostas. Primeiro: vale a pena patentear esse processo? Patente nacional ou internacional? Quem entraria na patente? São as primeiras questões que surgem.

Bem, para que se quer uma patente?

Existe uma frase que os advogados gostam muito que eu vou ler: “O objetivo do patenteamento é a proteção do patrimônio, torna público e possibilita o retorno do investimento, fomenta a pesquisa, fortalece e amplia a capacidade tecnológica”. É uma frase super bonita, mas muito hermética que não consigo digerir direito, mas que tentei traduzir em algumas questões.

Por exemplo: se quem está fazendo a patente é uma empresa, qual é o objetivo principal? Adquirir uma vantagem competitiva. Uma empresa raramente faz uma patente para vender ou licenciar. Ela desenvolve para ela mesma um processo que a interessa; e ela pode até ter um certo retorno financeiro por licenciamento dessa tecnologia, contanto que não vá competir com a produção que irá fazer.

Já na universidade, ela não vai poder usar a patente, pois não tem atividade de produção. Ela só tem a opção de vender ou licenciar. Então quais as possíveis motivações para uma universidade fazer uma patente? É o retorno financeiro do investimento ou um benefício secundário para a sociedade que vem do fato de produtos e processos patenteados serem mais usados pela indústria por conferir uma vantagem competitiva. Então desenvolve-se um processo e a patente vai ser mais facilmente comercializável porque a indústria tem interesse em proteger a sua tecnologia e não ter competição de outras.

Agora, o Butantan é uma mescla, tem características de universidade e de empresa. Tem um setor de produção mas, na verdade, nem tudo que é desenvolvido no Butantan vai interessar para ser produzido; por outro lado, tem uma parte que pode interessar ser licenciado ou ser comercializado. Então, nesse caso, o Butantan tem interesse em produzir essa vacina BCG Pertussis que foi desenvolvida. Dentro dessa questão de vantagem competitiva temos que fazer algumas observações. Uma delas é que os produtos que os Butantan comercializa não visam lucro; nós somos uma instituição sem fins lucrativos, então qualquer retorno financeiro de uma patente, de um processo feito, vai ser pequeno. Como é uma tecnologia desenvolvida dentro da instituição, a comercialização disso vai ser um pouco diferente, se ela vai produzir ou se ela vai vender.

Na verdade, para mim, não está muito claro se realmente vale a pena patentear esse produto. Por que? Porque é um produto barato. Eu quero garantir a nossa possibilidade de produzir, então a patente é uma forma de garantir que não venha alguém, patenteie e você não possa produzir. Mas se você publicar e colocar em domí-

nio público, também vai garantir a sua possibilidade de produzir. Será que essa patente vai ser negociável? Nacionalmente não haverá muita gente interessada em produzir esta vacina. Então, vender no Brasil é uma coisa que não vai ser viável. No exterior pode ser que tenha gente interessada, mas aí será necessário fazer um investimento muito grande para patentear no exterior e depois para comercializar, se alguém quiser comprar essa tecnologia.

A minha tendência atual é de que talvez não valha a pena nesse caso, patentear, embora seja um processo novo, que talvez haja outras instituições interessadas. O retorno financeiro vai ser baixo, porque a vacina de BCG custa R\$ 0,10 a dose e quem usa são países em desenvolvimento que têm baixo poder de compra. Todas essas questões têm que ser avaliadas. E eu, nesse caso, ainda estou pensando se vale a pena. Na verdade a segunda opção de BCG recombinante talvez tenha um interesse maior para a Organização Mundial de Saúde. Ela está investindo muito em desenvolvimento de vacinas contra tuberculose e talvez tenha interesse. Mas não são questões simples de você avaliar o mercado, ver custos e se vale a pena investir em fazer uma patente para esse processo. Uma coisa que eu tenho certeza: fazer uma patente mal feita é pior do que não fazer; você investe durante anos e não protege a invenção que não é negociável por que tem furos que qualquer um pode fazer. Então tem-se que investir em fazer uma patente boa. Isso custa dinheiro que não se sabe se vai ter retorno ou não. Todas essas questões serão levantadas nos processos que vão sendo desenvolvidos no Butantan para decidir se vale a pena a instituição investir naquela patente ou não. Estas são questões que não temos tradição nem experiência em avaliar. Vamos mais ou menos pelo *feeling* e fazer essas avaliações – avaliação de mercado, avaliação de potencial – também são coisas caras. Então as decisões são muito mais difíceis nesse sentido.

Para finalizar, há uma questão que sempre é levantada: quem são os inventores de uma patente. Nesse processo que foi desenvolvido temos vários atores fora do Butantan. Tem o Albert Einstein que fez a obtenção da cepa auxotrófica e que teria um potencial de

participação nessa patente; a construção do vetor de expressão do Pasteur; o gene da Novartis; e a construção foi feita no Butantan. A comprovação da proteção da tuberculose foi feita em colaboração com a USP e com a Universidade Federal de Goiás. Todos esses autores teriam potencial de entrar nessa patente. Eu estou há anos discutindo com cada um deles para saber quem entra, quem não entra. Há cinco anos, quando eu comecei essa discussão, todo mundo achava que devia entrar na patente e que a patente seria o processo inteiro, de fora a fora. Depois de muitos anos discutindo e avaliando quem deve entrar, quem não deve e qual parte do processo devemos patentear, chegamos a algumas conclusões importantes: não vamos patentear o processo inteiro. Parte já está patenteado por eles, não entra na nossa patente, então fica uma patente derivada; o vetor de expressão do Instituto Pasteur tem um MTA, mas não tem atividade inventiva do Pasteur nesse processo de vacina. Porque os inventores são considerados os que têm contribuição intelectual significativa. Nos últimos anos, o que vimos é que essa idéia de contribuição intelectual significativa avançou e hoje, conversando com aqueles que achavam que deviam participar da patente, eles falam: – “Não, nós não tivemos contribuição intelectual; nós demos o material e vocês fizeram”. Então, o relacionamento com eles não vai ser por titularidade, mas vai ser por MTA – que é *Material Transfer Agreement* – que é uma relação muito mais frouxa, muita mais fácil; quem negocia as patentes são os titulares. Os que forneceram material, os que têm MTA vinculados, vão ter benefícios, mas não vão participar das decisões. Então o que estamos vendo é que nem todos vão entrar na patente e no final o que vamos patentear vai ser a construção de um vetor de complementação, que é a única novidade que existe nesse desenvolvimento. O resto tudo foi trabalho, deu o que fazer etc. Mas o gene já estava construído e está patenteado pela Novartis, vai ser coberto com MTA. E inclusive a comprovação da proteção contra a tuberculose que foi essencial para sabermos se ainda protege contra a doença não é atividade inventiva, é de comprovação. Esses atores não iriam entrar na pa-

tente. A tendência hoje é estabelecer contribuição intelectual: fulano contribuiu nesta parte da invenção; sicrano contribuiu naquela. Você define e são esses que entram na patente. Isso é uma filosofia que ainda não está sendo aplicada no Brasil, mas cada vez mais se vê fora, está sendo assimilada e é uma tendência que o Brasil vai acabar absorvendo. Os titulares em geral são as instituições onde os inventores estão sediados ou empresas que investiram em seu desenvolvimento. Então, neste caso, se eu fosse fazer uma patente, a patente seria apenas do Butantan. Uma coisa que inicialmente parecia um pesadelo de negociação com Novartis, com Aventis, com USP, está ficando muito mais simples. A gente até chegou a desistir de patentear esse produto porque a negociação seria inviável, hoje em dia não é isso que vai nos impedir de patentear. Hoje em dia há outras questões que eu acho que serão mais importantes.

Há uma série de perguntas que eu não sei responder. Só a última pergunta: Qual é a sistemática da instituição para lidar com processos de patenteamento?

No Butantan, hoje, eu posso dizer que não existe (...). Nós temos uma comissão montada para estabelecer as diretrizes de patenteamento da instituição. A proposta deverá ser discutida no Conselho Diretor e esperamos, dentro de pouco tempo, colocar em discussão a questão de patenteamento no Instituto. Mas, deixamos claro que isso é só a parte inicial: como decidir o que patentear ou não, quem participa, que acordos devem ser feitos etc, etc. Há uma parte que vem depois, que é: o que fazer com a patente, como negociar; isso vai ficar para uma segunda etapa.

E aqui agradeço as 500 milhões de pessoas que participaram desse projeto de várias instituições.

Muito obrigada.