



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

(21) **PI0800357-2 A2**



(22) Data de Depósito: 10/03/2008
(43) Data da Publicação: 27/10/2009
(RPI 2025)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/13 (2009.01)
A61P 31/12 (2009.01)

(54) Título: **MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE UMA VACINA ESTABILIZADA**

(73) Titular(es): Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

(72) Inventor(es): Andréa Cheble de Oliveira, Jerson Lima da Silva, Luciane Pinto Gaspar, Marcos da Silva Freire

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE UMA VACINA ESTABILIZADA A presente invenção se refere ao campo das vacinas, mais particularmente, à estabilização das três cepas vacinais da poliomielite, presentes na Vacina Oral contra a Poliomielite (VOP). A alta pressão hidrostática é uma tecnologia que é extremamente segura, limpa e econômica. Além disso, uma vacina comercial estabilizada pela ação da alta pressão hidrostática evita a necessidade de energia elétrica para armazenamento do material.



"MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE UMA VACINA ESTABILIZADA"

Campo da Invenção

A presente invenção se refere ao campo das vacinas, mais particularmente, à estabilização das três cepas vacinais da poliomielite, presentes na Vacina Oral contra a Poliomielite (VOP).

Fundamentos da Invenção

A poliomielite é uma infecção aguda que pode se manifestar como uma infecção não aparente, meningite asséptica ou um quadro clássico de paralisia flácida. A transmissão pode se dar de pessoa a pessoa pela via fecal-oral ou oral-oral. É causada por um vírus que pertence ao gênero Enterovírus, da família *Picornaviridae*, o qual apresenta três sorotipos: sorotipo 1, sorotipo 2 e sorotipo 3.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a VOP é considerada como a única vacina capaz de viabilizar a erradicação global da poliomielite, sendo recomendada para as nações com índices de coberturas vacinais baixos e heterogêneos.

Existem dois tipos de vacinas contra a poliomielite disponíveis no mercado: a *Sabin* (oral, contendo vírus atenuado) e a *Salk* (injetável, contendo vírus inativado). Em geral, essas vacinas contêm uma mistura dos três poliovírus, de forma a conferir imunidade contra os três sorotipos.

A VOP contendo as cepas Sabin é uma vacina instável ao calor; portanto, deve ser armazenada congelada (-20 °C) e

usada logo após o descongelamento, para assegurar a imunização efetiva contra a poliomielite.

A patente US5.618.539 descreve vacinas virais estabilizadas, particularmente contra a poliomielite, compreendendo uma solução aquosa de vírus vivo e um composto estabilizador, que possui, pelo menos, dois grupos amino ou imino, tais como aminoácidos básicos (por exemplo, lisina, arginina etc.). Essa patente menciona, ainda, que o composto estabilizador permite um aumento da estabilidade térmica dos vírus em relação aos vírus estabilizados por cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (outro agente estabilizador). Porém, mesmo com o uso de estabilizadores efetivos, tais como o cloreto de magnésio ou aminoácidos, nada impede que ocorra a perda da potência da vacina, se a mesma for descongelada durante o transporte ou o armazenamento.

Rombaut et al., (B. Rombaut, B. Verheyden, K. Andries and A. Boeyé. Thermal Inactivation of Oral Polio Vaccine: Contribution of RNA and Protein Inactivation. *Journal of Virology*. 1994;68:6454-6457), descreveram o uso de pirodavir {benzoato de etil-4-[3-[1-(6-metil-3-piridazinil)-4-piperidinil] etóxi]} para a estabilização de poliovírus. Wu et al., (R. Wu, M.M. Georgescu, F. Delpeyroux, S. Guillot, J. Balanant, K. Simpson and R. Crainic. Thermostabilization of Live Virus Vaccines by Heavy Water (D_2O). *Vaccine*. 1995;12:1058-1063), testaram a estabilização de poliovírus por meio da utilização de água pesada (D_2O). Porém, nenhum desses métodos resultou em uma metodologia passível de ser utilizada na produção de uma vacina comercial.

Os vírus pertencem a um grupo estruturalmente diverso de microrganismos, que diferem amplamente em suas sensibilidades à ação da alta pressão hidrostática. Os estudos sobre os picornavírus mostraram uma grande
5 resistência desses vírus a tratamentos com alta pressão hidrostática. O poliovírus parece ser um dos vírus mais resistentes, dentre todos os picornavírus já caracterizados.

Os estudos dos efeitos da alta pressão hidrostática
10 sobre os poliovírus estão direcionados, em sua maioria, para a inativação viral e a produção de vacina inativada (J.L. Silva, P. Luan, M. Glaser, E.W. Voss and G. Weber. Effects of Hydrostatic Pressure on a Membrane-enveloped Virus: High Immunogenicity of the Pressure-Inactivated
15 Virus. Journal of Virology. 1992;66:2111-2117); (T. Nakagami, T. Shigehisa, T. Ohmori, S. Taji, A. Hase. T. Kimura and K. Yamanishi. Inactivation of Herpes Viruses by High Hydrostatic Pressure. Journal of Virological Methods. 1992;38:255-261); (E. Jurkiewicz, M. Villas-Boas, J.L.
20 Silva, G. Weber, G. Hunsmann and R.M. Clegg. Inactivation of Simian Immunodeficiency Virus by Hydrostatic Pressure. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1995;92:6935-6937); (S.M. Tian, J.F. Qian, G.Q. Shao and K.C. Ruan. High Immunogenicity of the Pressure-inactivated
25 Virus. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 1999;31:334-336); (P. Masson, C. Tonello and C. Balny. High-Pressure Biotechnology in Medicine and Pharmaceutical Science. Journal of Biomedical and Biotech. 2001;1:85-88); (T.R.P. Freitas, L.P. Gaspar, L.A. Caldas, J.L. Silva and M.A.

Rebello. Inactivation of Classical Swine Fever Virus: Association of Hydrostatic Pressure and Ultraviolet Irradiation. *Journal of Virological Methods*. 2003;108,205-211); (J.L. Silva, D. Foguel, M. Suarez, A.M.O. Gomes and
5 A.C. Oliveira. High-pressure Applications in Medicine and Pharmacology. *J. Phys. (Condensed Matter)*. 2004;16:S929-S944); e (D. Ishimaru, D. Sá-Carvalho and J.L. Silva. Pressure-inactivated FMDV: a Potential Vaccine. *Vaccine*. 2004;22:2334-2339).

10 Os estudos conduzidos para os picornavírus mostraram diferentes perfis de inativação por pressão hidrostática. Mais especificamente, oito picornavírus foram avaliados em relação aos efeitos da alta pressão, a saber: vírus da febre aftosa do termo em inglês "Foot and Mouth Disease
15 Vírus" (FMDV); vírus da hepatite A (HAV); rinovírus sorotipo 14; poliovírus sorotipo 1 (PV-1); vírus coxsackie B5 (CBV5); vírus coxsackie A9 (CAV9); parechovirus humano tipo 1 (HPeV-1) e vírus Aichi (AiV) (A.C. Oliveira, D. Ishimaru, R.B. Gonçalves, T.J. Smith, P. Mason, D. Sá-
20 Carvalho and J.L. Silva. Low Temperature and Pressure Stability of Picornaviruses: Implications for Virus Uncoating. *Biophysical Journal*. 1999;76:1270-1279); (N. Wilkinson, A.S. Kurdziel, S. Langton, E. Needs and N. Cook. Resistance of Poliovirus to Inactivation by High
25 Hydrostatic Pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2001;2:95-98); (D.H. Kingsley, D.G. Hoover, E. Papafragkou and G.P. Richards. Inactivation of Hepatitis A Virus and a Calicivirus by High Hydrostatic Pressure. *Journal of Food Protection*. 2002;65:1605-9); (D.H.

Kingsley, H. Chen and D.G. Hoover. Inactivation of Selected Picornaviruses by High Hydrostatic Pressure. Virus Research. 2004;102(2):221-224).

A relação dos vírus mais resistentes à ação da alta
5 pressão hidrostática, de acordo com os estudos atuais, é
apresentada na seguinte ordem: FMDV (reduções de 6,0 log
após 120 minutos a 240 MPa), HAV (reduções de 5,2 log após
5 minutos a 400 MPa, inativação após 5 horas a 460 MPa),
CAV9 (reduções de 3,4 log após 5 minutos a 400 MPa), HPeV-1
10 (reduções de 1,3 log após 5 minutos a 400 MPa), CBV5, AiV e
PV-1, sendo, substancialmente, resistentes aos tratamentos
por pressão de \geq 600 MPa (D.H. Kingsley, H. Chen and D.G.
Hoover. Inactivation of Selected Picornaviruses by High
Hydrostatic Pressure. Virus Research. 2004;102(2):221-224).
15 A comparação desses vírus com o rinovírus não é possível,
uma vez que o rinovírus foi avaliado em condições
diferenciadas, condições estas, contendo um agente
desnaturante denominado uréia (240 MPa, 1 M uréia, -15°C).
Todos os estudos reforçam a afirmação de que o poliovírus
20 parece ser um dos vírus mais resistentes à ação da alta
pressão hidrostática.

Os tratamentos para manter a estabilidade térmica dos
vírus, especialmente dos poliovírus, continuam sendo
realizados através do uso de compostos químicos e
25 biológicos, como, por exemplo, cloreto de magnésio e
arginina.

Desta forma, ainda existe a necessidade do
desenvolvimento de uma vacina com estabilidade e
imunogenicidade apropriadas, compreendendo poliovírus

atenuado vivo, e que seja, também, desprovida de toxicidade.

Sumário da Invenção

Os objetivos da presente invenção são: proporcionar
5 uma forma de aquisição de estabilidade térmica para a VOP,
contendo as cepas Sabin, para imunização eficaz contra essa
infecção, e proporcionar a utilização de uma metodologia
que seja extremamente segura, limpa e econômica
(caracterizada pelo uso de pressão hidrostática para
10 obtenção da estabilidade térmica das três cepas vacinais
contidas na vacina Sabin).

Breve Descrição das Figuras

As Figuras 1A, 1B e 1C mostram, respectivamente, uma
comparação dos sorotipos 1, 2 e 3 de poliovírus atenuados
15 cultivados em células Vero. Os símbolos representam valores
médios de três experimentos independentes. Os títulos de
infecciosidade foram determinados por TCID₅₀, do termo em
inglês "Tissue Culture Infectious Dose", ou 50 % de dose
infectante em cultura de tecido, em células Vero.

20 As Figuras 2A, 2B e 2C mostram, respectivamente, os
efeitos da alta temperatura sobre a capacidade de infecção
dos sorotipos 1, 2 e 3 de poliovírus atenuados. Os círculos
representam vírus estabilizados com MgCl₂ (91 mg/mL) e de
L-arginina (10mg/mL); os triângulos, vírus sem
25 estabilizadores. Todos os símbolos representam valores
médios de três experimentos independentes. Os títulos
provenientes do ensaio de infecciosidade foram determinados
por TCID₅₀ em células Vero.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos descritos a seguir ilustram modalidades preferidas da invenção e não devem ser considerados como limitativos da mesma.

5 **Exemplo 1** - Obtenção das Células e dos Vírus

As células Hep2C e Vero (células de macaco verde africano) (CCL 81) foram obtidas da "American Type Collection" (ATCC). Ambas foram mantidas em meio 199 suplementado com sais de Earle (Gibco), com soro fetal
10 bovino (FBS) a 5 %, com penicilina (100 U/mL), com estreptomicina (100 µg/mL) e tamponado com bicarbonato de sódio. Os vírus atenuados: poliovírus sorotipo 1 (LSC, 2ab); poliovírus sorotipo 2 (P712 CH ab) e poliovírus sorotipo 3 (Leon 12 a 1b), usados na presente invenção, são
15 oriundos da vacina da Glaxo SmithKline (GSK), contendo a seguinte identificação: poliovírus sorotipo 1-SB 1003A; poliovírus sorotipo 2-SB 238B; e poliovírus sorotipo 3-SB 359A.

Exemplo 2 - Obtenção do Título Viral

20 Neste trabalho, foi utilizado um ensaio de placa de 96 poços padronizado para obtenção dos títulos de infecciosidade dos referidos vírus. O método consiste em suspender células Hep2C tripsinizadas em placa de 96 poços. Subseqüentemente, 100 µL de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-9})
25 do vírus são adicionados no poço apropriado. As placas são incubadas a 34 °C, durante 7 dias, em um incubador de CO₂ a 5 %. O título do vírus (TCID₅₀/mL) é calculado utilizando o método descrito por Reed and Muench (L.J. Reed and H.A. Muench. A Simple Method of Estimating Fifty Percent End

Points. American Journal Hygiene. 1938; 493-497), o qual permite uma análise das características biológicas dos vírus obtidos em cultura de células e submetidos a diferentes condições de temperatura e tempo de pressurização.

Exemplo 3 - Cultivo Viral

Os três sorotipos de poliovírus foram cultivados em células Vero. As monocamadas de células confluentes foram inoculadas, em diferentes multiplicidades de infecção, do termo em inglês "multiplicity of infection" (moi), em meio de crescimento 199. Em seguida, deixou-se os vírus serem adsorvidos durante 1 hora a 37 °C e as monocamadas foram alimentadas com 100 mL de meio de manutenção. Para a obtenção dos vírus que foram utilizados no estudo com pressão hidrostática, ou seja, os sorotipos de poliovírus (1, 2 e 3), os mesmos foram cultivados em células Vero, em uma multiplicidade de infecção de 0,01, para os poliovírus sorotipo 1 e sorotipo 2, e 0,001, para o poliovírus sorotipo 3. Cada ensaio foi realizado três vezes, para garantir a reprodutibilidade dos resultados e o desvio padrão foi calculado para cada condição analisada, como descrito no estado da arte para outros vírus (T. Chonmaitree, C. Ford, C. Sanders and H.L. Luica. Comparison of Cells Cultures for Rapid Isolation of Enteroviruses. Journal of Clinical Microbiology. 1988;26:(12),2576-2580).

Exemplo 4 - Análise do Cultivo Viral em Condições Específicas

Na presente invenção, tendo em vista a deficiência do estado da arte em relação ao conhecimento sobre a diferença

da replicação celular entre os três sorotipos de poliovírus, foi realizada uma cinética detalhada para comparar a propagação dos poliovírus em células Vero e definir uma condição para o estudo em questão. Para tanto, foram usados diferentes valores de MOI de infecção para cada um dos poliovírus atenuados avaliados no presente trabalho. Os valores de MOI utilizados foram: 100; 10; 1; 0,1; 0,01 e 0,001. Os resultados mostram que o título máximo de vírus obtido a partir da propagação de cada um dos três vírus atenuados em células Vero, independente do MOI utilizado, foi muito similar. No entanto, conforme mostrado nas Figuras 1A, 1B e 1C, os resultados também mostram que a curva de replicação do poliovírus sorotipo 3 apresentou uma ampla dispersão em baixos valores de MOI , demonstrando uma vagarosa cinética de propagação.

Exemplo 5 - Análise da Termoestabilidade Viral

As três cepas de poliovírus foram incubadas, na faixa de 4 a 52°C, durante 65 horas. Os dados, que estão ilustrados na Figura 2, comparam vírus na presença e na ausência de $MgCl_2$ e L-arginina. Na ausência, os poliovírus sorotipo 2 e sorotipo 3 perderam o título infeccioso a 37°C, e o poliovírus sorotipo 1, a 42°C. Por outro lado, na presença dos referidos estabilizadores, os vírus apresentaram leve redução do título viral e perda total do mesmo somente a 52°C. Esse comportamento já era esperado, em função do conhecimento atual sobre a termoestabilidade desses três vírus: é sabido que o $MgCl_2$ aumenta a rigidez da conformação de capsídeo do poliovírus e diminui a extensão da penetração de água no capsídeo dos mesmos.

Exemplo 6 - Aplicação de Alta Pressão Hidrostática

Foi utilizado um reator de alta pressão hidrostática, da ISS (Champaign, IL). Esse equipamento foi mantido em diferentes temperaturas (-10, 4, 25 e 37°C), de acordo com o ensaio proposto, com o auxílio de banho Maria (Eyella Thermopet NTT-211). Os vírus atenuados da poliomielite (com e sem estabilizadores) foram submetidos a uma pressão hidrostática de 310 MPa durante diferentes intervalos de tempos (8, 17 e 65 horas).

Exemplo 7 - Análise da Termoestabilidade Viral em Condições Específicas

A avaliação dos efeitos da temperatura sobre os sorotipos 1, 2 e 3 de poliovírus foi conduzida usando banho Maria com termostato elétrico (Eyella Thermopet NTT-211). A temperatura foi monitorada na faixa de 4 a 52°C. Os títulos dos vírus foram calculados usando o método Reed & Muench, como citado anteriormente.

- Alta Pressão e Variação de Temperatura:

Para analisar os efeitos da pressão sobre a capacidade de infecção e estabilização dos poliovírus, as amostras de vírus sorotipos 1, 2 e 3 foram submetidas à pressão hidrostática de 310 MPa durante diferentes intervalos de tempos (8, 17 e 65 horas) e em diferentes temperaturas (-10, 4, 25, 37°C).

A pressão hidrostática não foi capaz de induzir uma redução detectável na infecciosidade dos três poliovírus, mesmo após 65 horas a 37°C ou -10°C. A Tabela 1 mostra esses resultados.

Tabela 1 - Efeito da alta pressão hidrostática (310 MPa) nas três cepas atenuadas de poliovírus.

Sorotipo do vírus	Temperatura °C	Tempo de pressurização (h)	Título do vírus antes da pressurização a 310 MPa (TCID ₅₀ /mL) (x±dp)	Título do vírus depois da pressurização a 310 MPa (TCID ₅₀ /mL) (x±dp)	Teste t de Student
Poliovírus sorotipo 1	37	8	7,51± 0,07	7,45± 0,12	0,84
		65	8,12± 0,25	8,11± 0,32	0,94
	-10	8	8,10± 0,03	8,25± 0,07	0,20
		65	8,02± 0,11	8,30± 0,28	0,26
Poliovírus sorotipo 2	37	8	7,64± 0,03	7,64± 0,04	1
		65	8,13± 0,21	7,89± 0,03	0,49
	-10	8	8,17± 0,35	8,14± 0,23	0,94
		65	8,20± 0,14	8,37± 0,37	0,50
Poliovírus sorotipo 3	37	8	7,91± 0,17	7,85± 0,04	0,84
		65	8,26± 0,23	8,06± 0,31	0,28
	-10	8	8,72± 0,12	8,51± 0,12	0,43
		65	8,25± 0,35	8,08± 0,03	0,42

Os dados da Tabela 1 demonstram que os poliovírus são, realmente, muito resistentes ao tratamento à alta pressão hidrostática.

Resultados similares também foram observados quando os três sorotipos de poliovírus (1, 2 e 3) foram incubados a 310 MPa durante 17 horas a 4°C ou 65 horas a 25°C, na presença e ausência de MgCl₂ e L-arginina. Esses resultados demonstram que a presença de MgCl₂, que é o principal estabilizador utilizado na vacina comercial contra a poliomielite, não acarreta nenhum efeito adicional da pressão na estabilidade das partículas em diferentes

condições de tempo de pressurização e temperatura, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação dos efeitos da alta pressão hidrostática nas três cepas atenuadas de poliovírus, na presença e na ausência de estabilizadores.

2A

Vírus com MgCl ₂ e L-arginina	310 MPa, 17 horas, 4 °C			310 MPa, 65 horas, 25 °C		
	Controle TCID ₅₀ /mL x± dp	Pressurizado TCID ₅₀ /mL x± dp	Teste t de Student	Controle TCID ₅₀ /mL x± dp	Pressurizado TCID ₅₀ /mL x± dp	Teste t de Student
Poliovírus sorotipo 1	8,07±0,18	7,85± 0,05	0,35	8,10±0,12	8,00± 0,13	0,90
Poliovírus sorotipo 2	7,93±0,11	7,88± 0,11	0,46	8,13±0,21	7,80± 0,04	0,34
Poliovírus sorotipo 3	8,31±0,32	8,14± 0,05	0,50	8,26±0,23	8,20± 0,20	0,18

2B

Vírus sem MgCl ₂ e L-arginina obtido a partir da propagação em células Vero	310 MPa, 17 horas, 4 °C			310 MPa, 65 horas, 25 °C		
	Controle TCID ₅₀ /mL x± dp	Pressurizado TCID ₅₀ /mL x± dp	Teste t de Student	Controle TCID ₅₀ /mL x± dp	Pressurizado TCID ₅₀ /mL x± dp	Teste t de Student
Poliovírus sorotipo 1	7,95±0,11	8,05± 0,41	0,70	8,30±0,28	7,99±0,09	0,13
Poliovírus sorotipo 2	7,98±0,17	7,82± 0,22	0,65	7,89±0,12	7,89±0,18	0,80
Poliovírus sorotipo 3	7,07±0,12	7,12± 0,36	0,92	7,14±0,05	7,24±0,26	0,70

Exemplo 8 - Termoestabilização sob Pressão

Após, a confirmação da resistência dos poliovírus ao tratamento com alta pressão hidrostática e da ausência dos efeitos de $MgCl_2$ e L-arginina, foi investigada a estabilidade dos vírus a uma pressão de 310 MPa, por 65 horas, a 37°C, na presença e na ausência de estabilizadores. Os resultados mostraram que as partículas pressurizadas foram capazes de resistir a 37°C durante 65 horas, na ausência de $MgCl_2$ e L-arginina, conforme apresentado na Tabela 3.

Por outro lado, os vírus não pressurizados e na ausência de estabilizadores tiveram sua infecciosidade diminuída ou completamente eliminada, como ocorreu com os poliovírus sorotipos 1, 2 e 3, respectivamente. A perda de infecciosidade do poliovírus na ausência de $MgCl_2$ e L-arginina era esperada.

Tabela 3 - Efeito da pressão hidrostática no poliovírus a 37°C.

3A

Vírus com $MgCl_2$ e L-arginina	Controle (antes da pressurização e da incubação a 37°C) TCID ₅₀ /mL x± dp	Pressurizado 310 MPa, 65 horas, 37 °C TCID ₅₀ /mL x± dp	Teste t de Student	Vírus incubado 65 horas, 37 °C (não pressurizado) TCID ₅₀ /mL x± dp
Poliovírus sorotipo 1	8,10±0,12	8,27± 0,05	0,35	6,77±0,18
Poliovírus sorotipo 2	8,00±0,11	7,87± 0,11	0,46	6,88±0,11
Poliovírus sorotipo 3	8,30±0,22	7,80± 0,05	0,50	6,79±0,32

3B

Vírus com MgCl₂ e L-arginina obtido em células Vero	Controle (antes da pressurização e da incubação a 37 °C) TCID₅₀/mL x± dp	Pressurizado 310 MPa, 65 horas, 37 °C TCID₅₀/mL x± dp	Teste t de Student	Vírus incubado 65 horas, 37 °C (não pressurizado) TCID₅₀/mL x± dp
Poliovírus sorotipo 1	8,30±0,28	7,52± 0,41	0,70	4,42 ±0,11
Poliovírus sorotipo 2	7,89±0,12	7,84± 0,22	0,65	-
Poliovírus sorotipo 3	7,14±0,05	6,92± 0,36	0,92	-

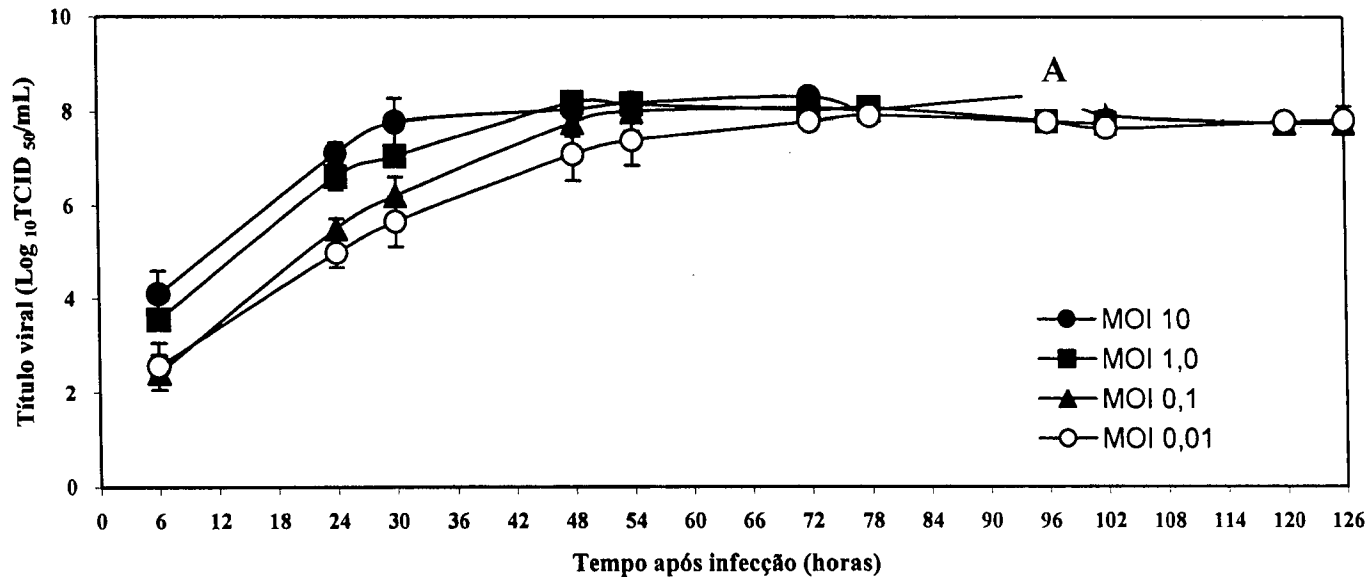
Os resultados demonstram que a estabilidade em relação à pressurização de cada uma das três cepas de poliovírus é similar em todas as condições testadas, incluindo pressurização a 310 MPa por 8 e 65 horas e incubação a 37°C ou -10°C (Tabela 1).

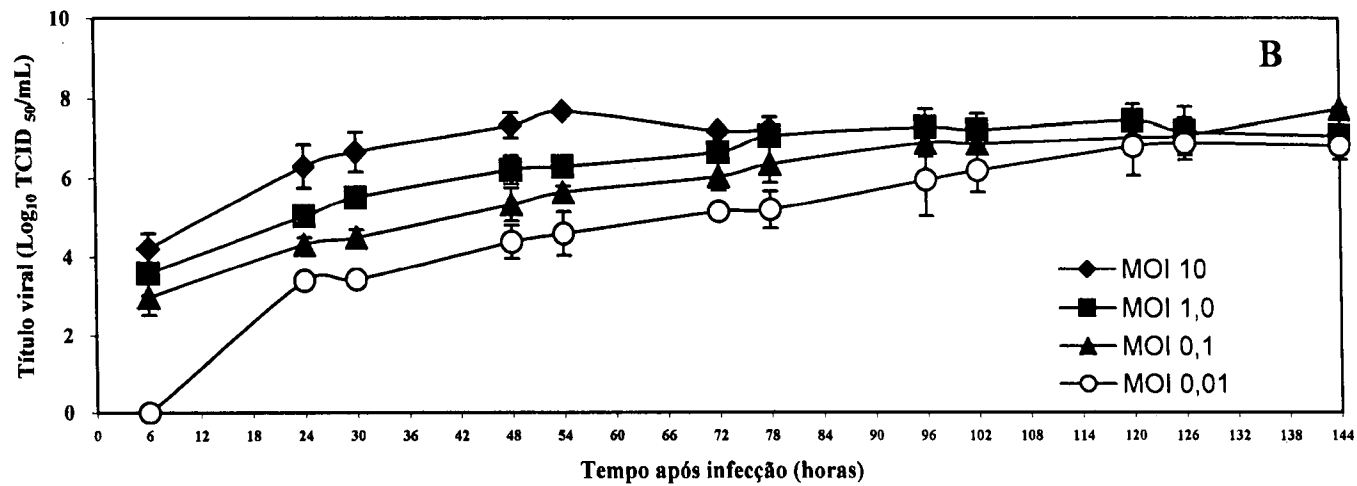
Por outro lado, a investigação da estabilidade do vírus a 310 MPa, durante 65 horas, a 37°C, mostrou que as partículas pressurizadas resistiram, à temperatura de 37°C durante 65 horas na ausência e na presença de estabilizadores (MgCl₂ e L-arginina) (Tabela 2). Essa estabilidade ocorreu com as três cepas de poliovírus, como observado pelos títulos dos vírus em cultura de células avaliados por TCID₅₀.

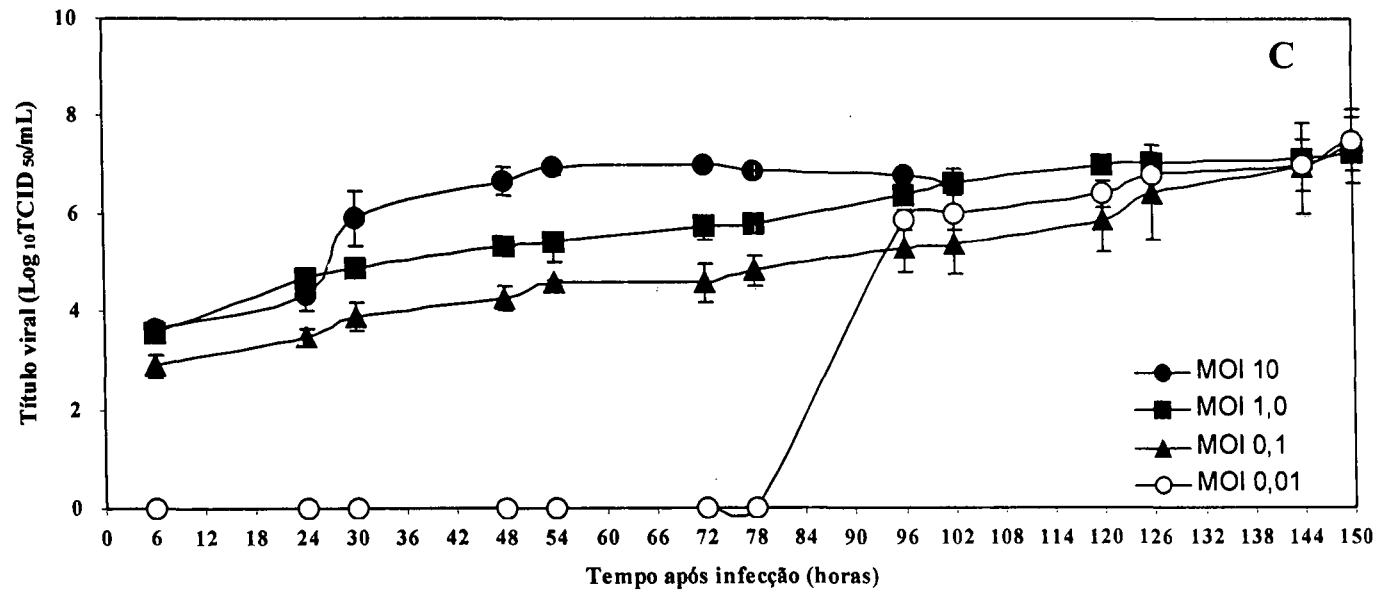
A alta pressão hidrostática é uma tecnologia que é extremamente segura, limpa e econômica. Além disso, uma vacina comercial estabilizada pela ação da alta pressão hidrostática evitaria a necessidade de energia elétrica para armazenamento do material.

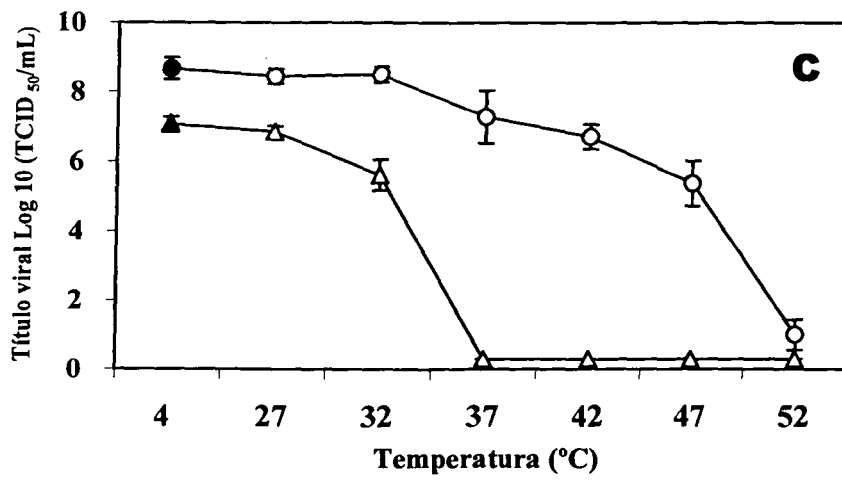
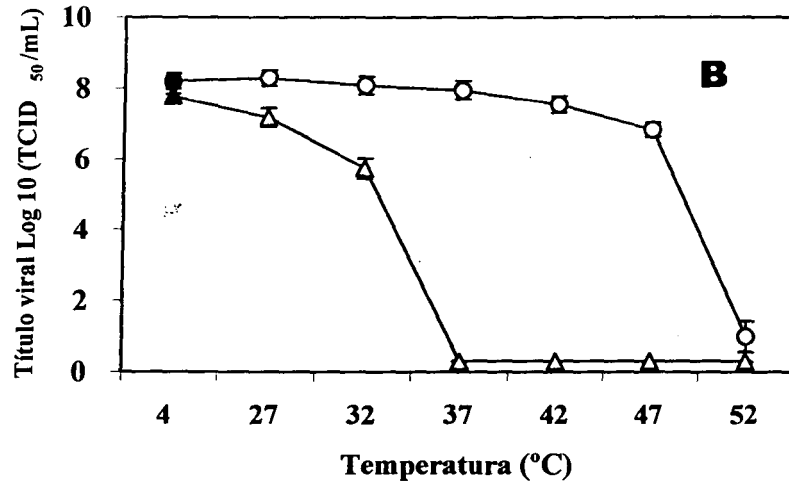
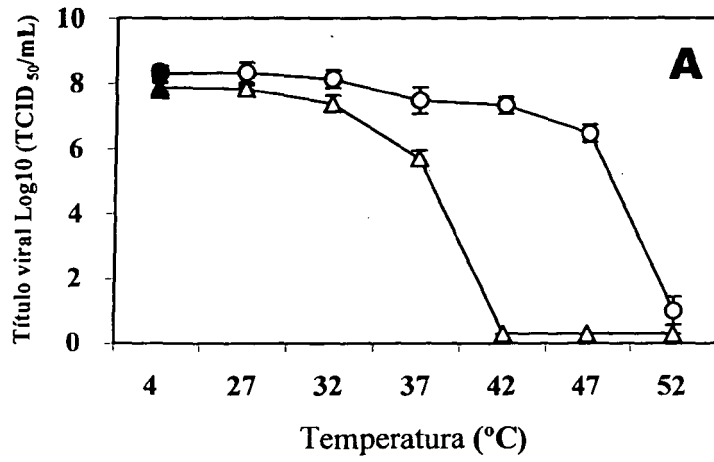
REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma composição de vacina estabilizada em estado líquido, caracterizado por compreender as etapas de:
- 5 (a) proporcionar uma solução fisiologicamente aceitável;
- (b) proporcionar a termoestabilidade das três cepas vacinais de poliovírus;
- (c) aplicar alta pressão hidrostática ao poliovírus.
- 10 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por conter os três sorotipos 1, 2 e 3 de poliovírus.
3. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a pressão hidrostática aplicada ser de
- 15 cerca de 310 MPa.
4. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por os poliovírus serem submetidos a uma pressão hidrostática de 310 MPa durante intervalos de tempos 8, 17 e 65 horas.
- 20 5. Composição de vacina estabilizada caracterizado por a dita composição ser obtida de acordo com o método descrito na reivindicação 1.









RESUMO**MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE UMA VACINA ESTABILIZADA**

A presente invenção se refere ao campo das vacinas, mais particularmente, à estabilização das três cepas vacinais da poliomielite, presentes na Vacina Oral contra a Poliomielite (VOP). A alta pressão hidrostática é uma tecnologia que é extremamente segura, limpa e econômica. Além disso, uma vacina comercial estabilizada pela ação da alta pressão hidrostática evita a necessidade de energia elétrica para armazenamento do material.