(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional

(43) Data de Publicação Internacional
20 de Abril de 2017 (20.04.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2017/063064 A1

(51) Classificação Internacional de Patentes :
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
A61K 35/16 (2015.01) *A61P 39/02* (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2016/050255

(22) Data do Depósito Internacional :
10 de Outubro de 2016 (10.10.2016)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
BR102015026308-2
16 de Outubro de 2015 (16.10.2015) BR

(71) Requerentes : **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO** [BR/BR]; Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, 01049-010 Sao Paulo (BR). **FUNDACAO BUTANTAN** [BR/BR]; Av. Vital Brasil, 1500, Butanta, 05503-900 Sao Paulo (BR). **INSTITUTO VITAL BRAZIL S/A** [BR/BR]; Rua Maestro José Botelho, 64, Vital Brazil, 24230-410 Niteroi (BR).

(72) Inventores : **FERREIRA JUNIOR, Rui Seabra**; Rua José Barbosa de Barros, 1780, Fazenda Experimental Lageado, 18600-290 Botucatu (BR). **BARRAVIERA, Benedito**; Rua José Barbosa de Barros, 1780, Fazenda Experimental Lageado, 18600-290 Botucatu (BR). **ORSI, Ricardo De Oliveira**; Rua José Barbosa de Barros, 1780, Fazenda Experimental Lageado, 18600-290 Botucatu (BR). **CUNHA, Luis Eduardo Ribeiro Da**; Rua Maestro José Botelho, 64, Vital Brazil, 24230-410 Niteroi (BR). **PIMENTA, Daniel**; Av. Vital Brasil, 1500, Butanta, 05503-900 Sao Paulo (BR).

(74) Mandatários : **SPIANDORELLO, Fabíola de Moraes** et al.; Rua Dr. Bento Teobaldo Ferraz, 271, Bloco II, Barra Funda, 01049-010 São Paulo (BR).

(81) Estados Designados *(sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

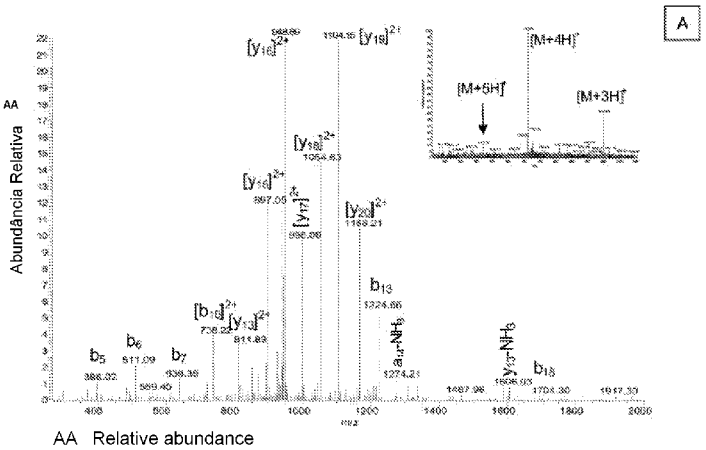
(84) Estados Designados *(sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes)* : ARIPO (BW,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : METHOD FOR PRODUCCING EQUINE SERUM AGAINST BEE VENOM, EQUINE SERUM AGAINST BEE VENOM AND USES THEREOF

(54) Título : PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SORO EQUINO ANTIAPÍLICO, SORO EQUINO ANTIAPÍLICO E SEUS USOS

Figura 2



(57) Abstract : The present invention relates to a method for producing an equine serum against the venom of *Apis mellifera* africanised bees, produced from the blood of hyperimmunised horses, and using as the antigen the main toxic fractions of the venom from *Apis mellifera* (melittin and phospholipase A2). The entire process is described, including venom extraction, purification of the fractions of interest, antigen preparation, horse hyperimmunisation, production of hyperimmune plasma, preparation of the concentrate containing specific antibodies and of the finished product, after purification by sterilising filtration and clarification, as well as the bottling, final formulation, preclinical studies, posology, uses and indications.

(57) Resumo :

(Continua na página seguinte)

WO 2017/063064 A1

GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*

— *antes da expiração do prazo para modificar as reivindicações e a republicar na eventualidade de receção de tais modificações (Regra 48.2(h))*

A presente invenção refere-se ao processo de obtenção de um soro equino antiapílico contra o veneno de abelhas africanizadas Apis mellifera, produzido a partir do sangue de equinos hiperimunizados utilizando-se como antígeno as principais frações tóxicas do veneno de Apis mellifera (Melitina e Fosfolipase A2). Descreve todo o processo de extração do veneno, purificação das frações de interesse, preparação do antígeno, hiperimunização dos cavalos, produção do plasma hiperimune, preparação do concentrado de anticorpos específicos e do produto acabado, após a sua purificação por filtração esterelizante e clarificação, envase, formulação final, estudos pré-clínicos, posologia, e seus usos e indicações.

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SORO EQUINO ANTIAPÍLICO, SORO EQUINO ANTIAPÍLICO E SEUS USOS

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção se insere no campo de aplicação da Química, Farmácia, Medicina, Medicina Veterinária, e, mais especificamente, na área de imunologia e preparações para finalidades médicas, e descreve o processo de obtenção de um soro equino, o qual compreende um soro antiveneno contra picadas de abelhas africanizadas *Apis mellifera*, denominado Soro Antiapílico e seus usos.

[2] O soro antiapílico ora descrito compreende fragmentos Fab_2 de imunoglobulinas G extraídas a partir do sangue de cavalos hiperimunizados com as frações tóxicas Melitina e Fosfolipase A_2 purificadas e isoladas do veneno de abelhas africanizadas *Apis mellifera*.

[3] O soro antiapílico descrito é utilizado para o tratamento específico contra os acidentes/envenenamento tóxicos causados por múltiplas picadas de abelhas africanizadas *Apis mellifera*, já que não existe qualquer outro tratamento específico disponível no mercado farmacêutico mundial.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[4] As primeiras colônias de abelhas foram introduzidas no Brasil a partir de 1840 oriundas da Espanha, Portugal, Alemanha e Itália. As primeiras subespécies criadas foram: *Apis melífera mellifera* (abelhas pretas ou alemãs), *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera ligustica* (abelhas italianas). Naquela época, a apicultura era uma atividade não profissionalizada e o objetivo principal dos produtores era atender às necessidades

básicas de consumo.

[5] Em 1950, a apicultura brasileira sofreu grandes perdas em decorrência do surgimento de diversas pragas e doenças. Estima-se que 80% das colônias tenham sido dizimadas, gerando queda drástica na produção. Com o objetivo de aumentar a resistência, em 1956 o professor Warwick Estevam Kerr, com apoio do Ministério da Agricultura, dirigiu-se à África para selecionar colônias de abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* que fossem mais produtivas e mais resistentes. As rainhas foram trazidas para o apiário experimental do município de Rio Claro, no Estado de São Paulo, para serem criadas, testadas e comparadas com as abelhas italianas e pretas. Entretanto, um incidente contribuiu para que 26 colônias de abelhas africanas enxameassem 45 dias após a introdução e se distribuíssem pelo país afora.

[6] As abelhas africanas encontraram no Brasil condições de clima e vegetação excelentes para se propagarem e cruzarem com as europeias já existentes. Assim, a liberação dessas abelhas muito produtivas, porém muito defensivas, possibilitou a criação de um novo híbrido, denominadas abelhas africanizadas. Historicamente, iniciava-se assim a africanização do plantel apícola das Américas.

[7] A defensividade na competição por alimento, a grande capacidade de enxameação e a facilidade de adaptação a diversos climas e ambientes, possibilitaram a expansão da abelha africanizada por todo o Brasil e diversos países do continente americano, incluindo hoje os Estados Unidos.

[8] O intenso comportamento defensivo gerou dificuldades e acidentes graves e fatais. Os problemas ocasionados pelo ataque maciço das abelhas seguido de mortes de seres humanos e animais passaram a fazer parte do dia a dia do brasileiro. As "abelhas assassinas" (*killer bees*) como ficaram conhecidas, geraram e passaram a ser tratadas como pragas. Diversos países do continente americano tentaram, inutilmente, construir barreiras que impedissem o avanço delas.

[9] Em que pese os problemas gerados, as abelhas africanizadas forçaram a implantação de novos paradigmas e a modernização da apicultura brasileira. O investimento em pesquisas, criação e adaptação de tecnologias e capacitação de pessoal auxiliaram na melhoria e na profissionalização da atividade. O Brasil atualmente é um dos maiores exportadores de mel, cera e própolis do mundo. A maior resistência das abelhas africanizadas às pragas e doenças permitiu que a atividade fosse conduzida sem aplicação de defensivos, facilitando assim a produção orgânica. Embora a africanização ainda encontre alguma resistência por parte dos apicultores, não há como negar os benefícios que o incidente ocorrido há mais de 50 anos trouxe para a apicultura brasileira, com avanços nas técnicas de manejo, segurança e produtividade.

O veneno das abelhas africanizadas

[10] O aparelho de ferrão presente nos Hymenoptera originou-se de uma transformação do aparelho ovipositor. Nas abelhas Apis existem três glândulas associadas ao aparelho de ferroar, a saber: ácida, básica e a de Koshewnikow. Tanto a glândula ácida, quanto a básica

contribuem para a produção do veneno. A glândula de Koshewnikow encontra-se presente tanto nas abelhas operárias, quanto na rainha. No primeiro caso funciona como produtora de ferormônios de alarme. Na rainha tem a função de produzir atraentes sexuais para os zangões.

[11] É sabido da literatura que o nível máximo de produção de veneno por uma operária ocorre entre o 10° e 16° dia da vida adulta. As abelhas operárias *Apis mellifera ligustica*, com 10 dias de idade, produzem em torno de 0,079 mg de veneno seco, enquanto as operárias africanizadas no mesmo período produzem 0,120 mg de veneno seco, ou seja, quase duas vezes mais.

[12] Os venenos das abelhas Apis são misturas complexas de aminas biogênicas, proteínas, enzimas e peptídeos. Apresentam atividades farmacológicas e alergênicas produzindo dor localizada, edema e eritema causados principalmente por aumento da permeabilidade vascular. Os fatores alergênicos são constituídos principalmente de enzimas tais como fosfolipases, hialuronidases, lipases e fosfatases. Entre os peptídeos ativos de superfície de pouca importância alergênica, mas de ação farmacológica importante temos a melitina que constitui cerca de 50 a 60% do peso total do veneno bruto. Apresenta a propriedade de diminuir a tensão superficial da água em nível de membrana plasmática, agindo como detergente natural. Isto lhe confere uma ação destrutiva de membranas biológicas. A melitina age de maneira sinérgica com a fosfolipase A_2 atuando assim como fator de difusão do veneno. Esta última constitui cerca 11 a 12% do peso total do veneno - melitina e fosfolipase A_2 são os principais

constituintes farmacológicos do veneno de Apis, causando hemólise e rabdomiólise intensas. Além disso, encontramos apamina (3%), hialuronidase (1-2%), peptídeos (1%), água e sais minerais. Deve ser salientado que a dose letal média do veneno de Apis é estimada em 19 picadas por quilograma de peso, ou seja, cerca de 500 picadas para um ser humano adulto.

Epidemiologia dos acidentes por abelhas Apis

[13] Nas últimas décadas, a expansão das abelhas africanizadas no Brasil e em toda a América fez com que as autoridades de saúde pública incluíssem este acidente como objeto de vigilância sanitária. Além dos processos alérgicos, que variam desde leves a graves, as múltiplas picadas estão associadas em geral a quadros de envenenamentos graves. O crescente número de casos clínicos e consequentemente de óbitos desperta para a necessidade de se dispor de um tratamento eficaz. A ausência de um soro específico disponível para a rede pública de saúde torna o problema ainda mais complexo.

[14] No Brasil, as serpentes, escorpiões e aranhas são os principais agentes causadores de envenenamentos. Recentemente, os acidentes causados por abelhas africanizadas têm merecido maior atenção devido à gravidade e à elevada letalidade. Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde do Brasil, os acidentes por abelhas representam cerca de 7% do número total de acidentes causados por animais peçonhentos, com mais de 10 mil acidentes e 40 mortes no ano de 2013, segundo o próprio Ministério.

[15] Salienta-se que os números oficialmente

apresentados estejam subestimados em decorrência da não obrigatoriedade de notificação. Assim, estima-se que ocorram em torno de 15 mil ataques de abelhas por ano no Brasil causando cerca de 140 mortes. Isto elevaria para 10,71% o número de acidentes causados apenas por abelhas Apis. Concluindo: por onde as abelhas africanizadas dispersam e se instalam definitivamente como é o caso do Brasil e de outros países das Américas do Sul, Central e do Norte, tornam-se um problema de Saúde Pública; outro detalhe importante é que apesar deste acidente não ser de notificação obrigatória a sua prevalência aumentou sobremaneira nos últimos anos.

Etiopatogenia

[16] Os pacientes ao adentrarem o hospital apresentam dor generalizada, prurido intenso e agitação, podendo posteriormente evoluir para o estado de torpor, acompanhado de insuficiências respiratória e renal graves. Aqueles que evoluem para o óbito apresentam ao exame anatomopatológico necrose tubular aguda com presença de cilindros heme e/ou mioglobina no interior dos túbulos renais. Os músculos esqueléticos apresentam intensa proteólise, com liberação de mioglobina e creatinoquinase (CK) para o sangue. O coração pode ser acometido e neste caso observa-se lesão subendocárdica com presença de infarto. O fígado pode apresentar sinais de degeneração hidrópica decorrente do grave envenenamento.

[17] Os exames laboratoriais alteram-se após algumas horas do acidente. O hemograma pode apresentar leucocitose com neutrofilia e desvio à esquerda escalonado; ao exame de urina tipo I observa-se presença de

proteinúria, glicosúria e pigmento heme. Os níveis séricos de ureia e creatinina podem se elevar em decorrência da lesão renal; os níveis de creatinoquinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) costumam estar elevados traduzindo intensa rabdomiólise. Os níveis de alanina aminotransferase (ALT) podem se elevar durante a evolução demonstrando comprometimento hepático. Por fim, as proteínas de fase aguda positiva e negativa se alteram revelando uma reação de fase aguda grave.

Manifestações clínicas

[18] Os acidentes com abelhas africanizadas apresentam manifestações clínicas distintas, dependendo da sensibilidade do indivíduo ao veneno e do número de picadas.

[19] O acidente mais frequente é aquele no qual o indivíduo não sensibilizado ao veneno é acometido por poucas picadas. Nestes casos, o quadro clínico se limita à reação inflamatória local, apresentando pápulas eritematosas, dor e calor local. Na maioria das vezes esta situação é resolvida sem a participação médica.

[20] Outra forma de apresentação clínica é aquela na qual o indivíduo previamente sensibilizado a um ou mais componentes do veneno, manifesta reação de hipersensibilidade imediata do tipo I de Gell e Coombs. É ocorrência grave, podendo ser desencadeada por apenas uma picada exigindo neste caso a intervenção médica imediata. O quadro clínico se manifesta por edema de glote e broncoespasmo acompanhado de choque anafilático.

[21] A terceira forma de apresentação é a causada por múltiplas picadas. Esta, em geral ocorre, quando o

doente é atacado por um enxame. Neste caso há inoculação de grande quantidade de veneno, devido às múltiplas picadas, em geral centenas ou milhares. Em decorrência manifestam-se sinais e sintomas devido à ação das diversas frações do veneno sendo este tipo de acidente não raro.

Tratamento atual

[22] Como até o presente momento não se dispõe de um soro antiveneno específico contra a picada de abelhas africanizadas disponível no mercado farmacêutico mundial, ou mesmo para utilização na rede de assistência aos acidentes por animais peçonhentos do Brasil, todos os pacientes são tratados sintomaticamente com a associação de drogas anti-histamínicas, corticosteroides e analgésicos potentes. Salienta-se que, este tratamento combate alguns dos sintomas causados pelo envenenamento apenas, pois não possui especificidade contra o veneno inoculado no paciente. Além disso, tanto os pacientes que evoluem com choque anafilático, quanto os acometidos por múltiplas picadas devem ser tratados de maneira emergencial e em hospital de retaguarda equipado com unidade de terapia intensiva.

[23] O tratamento de poucas picadas em indivíduo não sensibilizado deve ser feito à base de anti-histamínicos sistêmicos e corticosteroides tópicos. Este tratamento deve ser mantido entre três e cinco dias, de acordo com a evolução clínica, além do que os corticosteroides podem ser empregados só ou associados ao mentol a 0,5%.

[24] O tratamento de indivíduo sensibilizado, que desenvolve reação anafilática ou anafilactóide, e que

evolui com broncoespasmo, edema de glote e choque anafilático deve ser monitorado e tratado em unidade de emergência, sendo neste caso a adrenalina a droga de escolha.

[25] O tratamento de indivíduo não sensibilizado e acometido por múltiplas picadas deve ser tratado em unidade de emergência, com drogas anti-histamínicas, corticosteroides e analgésicos potentes, além de monitoramento e transferência para unidade de terapia intensiva. Além disso, todos os ferrões devem ser retirados e, a seguir, induzida a diurese osmótica para se prevenir uma possível insuficiência renal aguda.

[26] Por fim, deve ser salientado que os acidentes causados por múltiplas picadas de abelhas, em especial quando o doente é acometido por milhares delas, o que levará a um envenenamento tóxico, sempre é uma emergência médica e o tratamento imediato, adequado e específico, no caso da utilização do soro antiapílico, pode evitar que muitos evoluam para a morte. É sabido que o tratamento com soro antiveneno específico contra qualquer veneno de animal peçonhento é único e eficaz.

Desenvolvimento de soro antiapílico

[27] A administração de soros e imunoglobulinas caracteriza a imunização passiva, por meio da qual o organismo humano recebe anticorpos produzidos de maneira heteróloga. Os soros heterólogos são assim denominados porque os anticorpos são obtidos a partir do plasma de um doador (principalmente equídeos) de espécie diferente do receptor (ser humano). Os animais soro produtores, constituídos por cavalos no Brasil, são previamente

estimulados com antígenos constituídos por pequenas quantidades de venenos animais, com posterior extração do sangue, o qual contém os anticorpos de interesse presentes no plasma.

[28] A imunização dos equinos é executada com a aplicação de doses crescentes de antígenos de interesse adicionados aos adjuvantes. Ao atingirem títulos elevados de anticorpos, os animais são sangrados e o sangue é recolhido em recipientes contendo anticoagulantes, separando-se desta maneira o plasma das hemácias, que são devolvidas ao animal. O plasma é submetido à purificação e concentração por métodos específicos.

[29] O método de purificação mais utilizado na produção industrial é o da digestão enzimática, por intermédio da pepsina para a digestão parcial das imunoglobulinas e obtenção de fragmentos (Fab_2) dos anticorpos. A seguir, procede-se a purificação da fração gama por meio da precipitação com sulfato de amônio.

[30] O fragmento (Fab_2) dos anticorpos quando puro mantém a propriedade de neutralização das toxinas de interesse.

ESTADO DA TÉCNICA

[31] Documentos disponíveis no estado da técnica descrevem diferentes soros hiperimunes contra picadas de abelhas.

[32] No documento WO 1992019280 A1, faz-se referência a um "Antiveno immunosera", ou "imunosoro antiveneno" e os autores descrevem de forma geral a metodologia de produção de antivenenos, que pode ser aplicável a qualquer veneno, inclusive o de abelhas.

[33] Quando se trata da produção de antivenenos animais, a especificidade é o fator limitante, já que os anticorpos produzidos pelos animais soroprodutores são específicos ao antígeno utilizado, portanto, uma formulação geral é insuficiente para a produção de um antiveneno específico.

[34] No documento PI 0804652-2, faz-se referência a "Soro equino antiveneno de abelhas, método de reconhecimento e processo de obtenção do mesmo". Este processo refere-se a diferentes protocolos de produção do soro, como produção do antígeno, processo de hiperimunização, purificação do plasma e todas as etapas de preparação do produto acabado e por fim a sua posologia. Desta maneira, entende-se que se trata de um outro produto, mesmo tendo a mesma aplicação, já que além de etapas diferentes na produção, a existência de etapas inéditas faz-se presente.

[35] Nenhum dos documentos citados propõe um soro antiapílico tal como o descrito na presente invenção. Ainda, o soro antiapílico descrito apresenta a possibilidade de aplicação em todo o Continente Americano, pois as abelhas africanizadas por ele distribuídas são o mesmo híbrido, causando acidentes semelhantes.

Objetivos e vantagens da invenção

[36] A presente invenção tem por objetivo o desenvolvimento de um soro antiapílico utilizando-se como antígeno de imunização dois principais componentes tóxicos extraídos e purificados a partir do veneno total de abelhas africanizadas *Apis mellifera*. São eles: Melitina e Fosfolipase A2 (PLA2). Deve ser salientado que o soro

antiveneno é o único tratamento específico e eficaz para os acidentes causados por animais peçonhentos. Além disso, não existe atualmente nenhum antiveneno disponível no mercado farmacêutico mundial para o tratamento dos acidentes causados por abelhas africanizadas.

[37] A partir do momento que são utilizados apenas as duas frações tóxicas do veneno de abelhas africanizadas para compor o antígeno de imunização dos cavalos, os anticorpos produzidos por estes reconhecem e neutralizam com eficácia estas frações, e por consequência reduzem os efeitos tóxicos do veneno total. Assim, o risco de óbito dos pacientes é minimizado, pois os outros componentes do veneno, os quais causam alergia podem, portanto, serem neutralizados com uma medicação de suporte. Além disso, a remoção de componentes alergênicos do antígeno de imunização possibilita a injeção de uma maior quantidade de antígeno nos cavalos para a produção do soro, melhorando assim o processo produtivo, além de diminuir os efeitos tóxicos, como extrema dor e risco anafilático, para os animais produtores de soro.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[38] Esta invenção descreve o processo de obtenção de um soro equino antiapílico, que compreende um novo soro antiveneno contra picadas de abelhas africanizadas, o qual possui ação específica e exclusiva contra os componentes tóxicos do veneno destas abelhas.

[39] A neutralização dos componentes tóxicos do veneno de abelhas africanizadas, melitina e fosfolipase A2, por um antiveneno específico pode salvar a vida de pessoas acometidas por múltiplas picadas.

[40] A invenção ensina o método de purificação e isolamento das proteínas do veneno para a formação do antígeno de imunização, a sua proporção de formulação, o processo de hiperimunização dos cavalos, a coleta de sangue, a purificação e o isolamento das imunoglobulinas G, a formulação do soro antiveneno e seus usos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[41] A Figura 1 mostra o perfil cromatográfico em HPLC de fase reversa e coluna C18 indicando a purificação da PLA2 (1) e da melitina (2).

[42] A Figura 2 mostra perfis de espectrometria de massas e deconvoluídos da Melitina (A) e da Fosfolipase A2 (B)

[43] A Figura 3 mostra a representação tridimensional, calculada por SWISS-MODEL, da estrutura espacial da Melitina-S.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[44] Esta invenção descreve o processo de obtenção de um soro equino antiapílico que compreende as etapas de:

1) Extração de veneno;

2) Purificação das frações de interesse;

3) Preparação do antígeno;

4) Processo de hiperimunização;

5) Processamento e purificação do Plasma;

6) Filtração esterilizante e diálise do concentrado de imunoglobulinas;

7) Diluição experimental;

8) Formulação do soro hiperimune.

[45] Um novo soro antiveneno contra picadas de

abelhas africanizadas, o qual possui ação específica e exclusiva contra os componentes tóxicos do veneno destas abelhas, a saber: melitina e fosfolipase A2 é produzido conforme processo descrito a seguir.

[46] A hiperimunização dos cavalos com o antígeno purificado contendo apenas as frações tóxicas do veneno, não causam qualquer dano físico ou mesmo dor a estes animais durante todo o processo. Isto é devido, pois, os componentes alergênicos e aqueles que causam dor, presentes no veneno total, são retirados durante o processo de produção e purificação do antígeno de hiperimunização.

1) Extração de veneno

[47] A extração do veneno de abelhas africanizadas *Apis melífera mellifera*, se faz através da extração do veneno de abelhas provenientes de um apiário controlado com rastreabilidade das colmeias, por meio de estimulação elétrica em placas de vidro. Este processo confere a padronização de lotes de veneno, como mostra a Tabela 1.

[48] Utilizar colmeias padronizadas quanto ao número de quadros de cria e alimento. Fornecer alimentação artificial energética (ex.: xarope de açúcar na proporção de uma parte de açúcar para uma parte de água filtrada), tanto para o desenvolvimento quanto para a manutenção dos enxames.

[49] Extrair o veneno por meio de coletores elétricos padronizados, sempre a partir das 9 horas da manhã, durante um período de 60 minutos, uma vez por semana. Experimentos prévios demonstraram que este tempo e período são os mais indicados para a coleta promovendo

maior rendimento de veneno seco. O coletor deve ser colocado no alvado da colmeia para a extração de veneno e coleta em placa de vidro. Esta última deve ser retirada dos coletores, armazenada em temperatura ambiente e ao abrigo da luz para evaporação dos componentes voláteis. A seguir, com auxílio de uma lâmina de bisturi, raspar o veneno sólido a partir da placa de vidro, pesar, acondicionar em microtubos e manter em freezer a -20 °C até o seu encaminhamento definitivo ao laboratório para a purificação.

Tabela 1: Áreas percentuais dos picos cromatográficos do veneno de abelhas africanizadas *Apis mellifera mellifera* analisados mensalmente.

Pico	Porcentagem da área cromatográfica mensalmente durante um ano (2008)												Media □ DP
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	
PLA2	8.4	8.6	13.2	11.9	17.0	8.9	13.1	12.5	14.6	18.5	10.3	9.1	12.2 ± 3.2
Melitina	23.6	32.9	54.4	43.0	54.2	53.1	40.0	41.8	40.1	55.2	38.0	41.3	43.1 ± 9.3

2) Purificação das frações de interesse

[50] Após a extração, o veneno é raspado das placas de vidro, diluído em solução salina 0,9%, centrifugado, filtrado em 0,22 μm para esterilização, e posteriormente, liofilização do veneno total. Este processo confere a pureza e esterilidade ao veneno.

[51] A preparação do antígeno de hiperimunização dos cavalos se dá a partir da purificação do veneno total por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (HPLC-RP) para a purificação das frações proteicas de interesse, a saber: Melitina e PLA2.

[52] Para o isolamento e purificação das frações

de interesse por HPLC-RP, deve-se solubilizar o veneno bruto purificado e liofilizado de *Apis mellifera* em 25% (v/v) de acetonitrila a 0,1% (v/v) e de ácido trifluoroacético na concentração de 1 mg/ml sendo posteriormente submetido ao fracionamento cromatográfico conforme proposta a seguir.

[53] Carregar uma alíquota de 100 µL em coluna C18 ACE (ACE 5 µm, C18, 300 A, 250 x 10 mm), tendo como fase móvel os seguintes sistemas binários: solventes, TFA a 0,1% em água (solvente A), 0,1% de TFA 90% de acetonitrila (solvente B); gradiente, com um gradiente de 10-80% do solvente B durante 60 minutos; realizar a eluição em um fluxo constante de 1 ml / min de fluxo; comprimento de onda. A obtenção do material se dá a partir de sua detecção por um espectrofotômetro nas absorbâncias (UV) de 214, 254 e 280 nm, como mostrado na Figura 1.

[54] Após o isolamento e a purificação da melitina e fosofolipase A2 por HPLC-RP, é realizada uma análise da pureza por sequenciamento peptídico de Edman, o qual revela as seguintes sequências N-terminais das amostras, mostrando uma identidade de 100% quando comparadas com aquelas depositadas no UniProt Protein, sendo: GIGAVLKVLTTGLPALISWI (Melitin of Apis mellifera, ref P01501) e IIYPGTLWCGHGNKSSGPNE (PLA_2 of Apis mellifera, ref P00630).

[55] A confirmação da pureza e da massa molecular da melitina e da PLA2 se dá também por espectrometria de massas de ESI com uma fonte de nanospray, e ligado ao sistema de nanoHPLC, sendo que as amostras são diluídas em acetonitrila 50% (v/v) contendo 0,2% de ácido fórmico e

introduzidas no espectrômetro a uma taxa de fluxo de 1 mL min^{-1}. A tensão de pulverização mantida a 1,8 kV, a voltagem capilar a 46 V, a temperatura do capilar a 180 °C e o tubo de lente de deslocamento mantida a -5 V. Os espectros de MS são obtidos no intervalo de 50-2000 m/z com tempo de varredura de 7 segundos. Instrumento de controle, aquisição de dados e processamento de dados é realizado com o Xcalibur Suite (Figura 2).

3) Preparação do antígeno

[56] Após as etapas de isolamento, de validação estrutural e da análise de pureza das moléculas, as amostras são liberadas para a preparação do antígeno.

[57] A formulação do antígeno de hiperimunização dos cavalos é realizada a partir da mistura de cinco a seis partes (5 a 6) de melitina, adicionados de uma a uma e meia partes (1 a 1,5) de Fosfolipase A2.

4) Processo de hiperimunização

[58] O processo de hiperimunização de cavalos utilizando-se o antígeno purificado de abelhas africanizadas *Apis mellifera mellifera*, o qual contém as frações tóxicas do veneno.

[59] Imunizar cinco cavalos adultos machos, pesando cerca de 350 Kg, com idades compreendidas entre 4 e 8 anos de acordo com os seguintes protocolos e ações:

a) Utilizar animais que nunca tenham recebido inoculações de antígenos;

b) Realizar uma imunização de base e posteriormente duas reimunizações;

c) Aplicar na imunização de base oito inoculações em diferentes dias. Nas três primeiras inoculações utilizar 2

mg do veneno processado (antígeno), nas demais utilizar 4 mg do veneno (antígeno). No 7° dia após a última inoculação iniciar a sangria dos animais num total de quatro;

d) Após um período de um mês de descanso, imunizar novamente os animais com o protocolo de reimunização. Neste aplicar quatro inoculações, sendo 6 mg do veneno processado (antígeno) na primeira e nas demais 2 mg. No 7° após a última inoculação iniciar a sangria dos animais num total de quatro;

e) Um mês após de descanso realizar novamente o protocolo de reimunização com mais uma sangria;

f) Após a verificação dos títulos dos anticorpos, a coleta e o processamento final do plasma necessitam das seguintes etapas: sangria, separação do plasma, reinfusão das hemácias, armazenamento e transporte.

[60] Uma vez considerados aptos para a sangria estabelecer um cronograma para cada animal. No dia agendado lavá-los, encabrestá-los e conduzi-los a sala de sangria onde devem ser contidos nos troncos. Proceder a tricotomia no ponto de venopunção, em geral na goteira jugular.

[61] Coletar o sangue em uma bolsa estéril composta de cinco elementos, a saber: a bolsa principal; bolsa para recolhimento do plasma; bolsa para amostra; mangueiras de drenagem e a agulha de punção. O volume de sangue a ser obtido varia de acordo com o porte e o peso de cada animal.

[62] Após coleta do sangue, manter as bolsas em câmara fria (+2° a +8 °C), fora do ambiente de sangria. Após 24 horas de repouso separar o plasma das hemácias, e reinfundir essas últimas em cada animal respectivamente.

[63] Estocar o plasma em câmara fria (+2° a +8 °C) para posterior envio ao local de interesse (em caminhão frigorífico mantido entre +2° e +8 °C), para seu devido processamento.

[64] A reinfusão das hemácias consiste em hidratar a papa de hemácias, com 2 litros de solução salina 0,85%, e devolver ao equino doador. Os objetivos desta atividade são os de diminuir as perdas orgânicas causadas pelas repetidas sangrias.

5) Processamento e purificação do plasma

[65] Realizar o armazenamento do plasma em ambiente específico, ou seja, em câmara fria (+2° a +8 °C). A falta de condições ideais concorre para a desnaturação do plasma assim como para sua eventual contaminação. Essas áreas devem operar com ar filtrado e propiciar temperatura constante entre +2° e +8 °C.

[66] O produto final obtido, ou seja, o plasma hiperimune, deve ser transportado ao local de processamento em condições adequadas de temperatura (+2° e +8 °C) e de acordo com as normas exigidas pela Vigilância Sanitária. Realizar o transporte em caminhão frigorífico devidamente qualificado na temperatura especificada.

[67] Os processos de purificação do plasma acontecem por digestão péptica, 1ª precipitação e termocoagulação, e devem seguir o protocolo:

a) Adicionar a um reator N°1 225 L de água para injetáveis; 1,125 L de solução de fenol a 90% (3,0 mL/Litro de solução); e 150 L de plasma;

b) Ligar o agitador do reator por 10 minutos para que a solução seja homogeneizada;

c) Ajustar o pH da solução para a faixa de 4,0 a 4,6 com solução de ácido clorídrico 3,5 N;

d) Sob agitação, adicionar pepsina na concentração de 1,25 g/L de solução;

e) Ajustar o pH da solução para a faixa de 3,1 a 3,3 com solução de ácido clorídrico 3,5 N e agitar por 10 minutos;

f) Aquecer a solução até 37 °C através de injeção de água quente na camisa do reator, permanecendo a seguir em repouso por 30 minutos;

g) Deixar resfriar à temperatura ambiente;

h) Ajustar o pH da solução para a faixa de 4,1 a 4,3 com solução de hidróxido de sódio a 2,5 N;

i) Adicionar sob agitação pirofosfato de sódio decahidratado (3,352 g/L de solução) e toluol (1 mL/L de solução);

j) Medir o volume total da solução no reator;

k) Adicionar sulfato de amônia (12%) sob agitação;

l) Aquecer o reator a 55 °C mantendo por 1 hora;

m) Resfriar a temperatura a 37 °C;

6) Filtração esterilizante e diálise do concentrado de imunoglobulinas

[68] Nesta etapa, faz-se a clivagem da imunoglobulina, separando a fração (Fab_2) da fração Fc. Esta, por ser termocoagulável, é precipitada, enquanto a fração (Fab_2), que é termorresistente continua solúvel no meio aquoso. Além disso, são precipitadas também outras proteínas termosensíveis bem como os componentes lipídicos.

[69] Para a filtração da 1ª precipitação, deve-se pressurizar o reator de produção com ar comprimido estéril, mantendo a agitação, para que o produto passe para os elementos filtrantes (lonas) dispostos na estante sob fluxo laminar classe A; recolher o filtrado em frascos de vidro, estéreis e apirógenos, retornando-o para o reator N° 2 de produção; e dispensar a massa retida nas lonas, resultante do processo de filtração.

[70] Este processo de filtração é realizado em funis de aço inoxidável, apoiados em uma estante também de aço inoxidável. A filtração é feita através de lonas estéreis (elemento filtrante) dedicadas por produto. Este procedimento tem como objetivo retirar todos os componentes que foram precipitados na etapa anterior, separando-se da parte líquida o componente (Fab_2).

[71] Para a realização da 2ª. Precipitação, todo processo é realizado sob agitação e deve-se seguir o protocolo descrito:

a) Manter sob agitação o filtrado recolhido no reator № 2;

b) Ajustar o pH do filtrado contido no reator 2 para 6,5 a 7,0 com hidróxido de sódio 2,5 N;

c) Desligar a agitação do reator deixando-se a solução acomodar e medir o volume da solução contida no reator № 2;

d) Adicionar sulfato de amônia em uma proporção de 19% do volume contido no reator № 2;

[72] O processo de filtração tem por objetivo precipitar o componente (Fab_2) presente na solução, ou seja, é realizada a filtração da 2ª. precipitação como

descrito:

e) Pressurizar o reator № 2 com ar comprimido estéril, mantendo a agitação, para que o produto seja transferido para os funis com elementos filtrantes (lonas) dispostos na estante sob fluxo laminar;

f) Desprezar o líquido filtrado e recolher a massa obtida após o processo de filtração.

[73] Este processo de filtração é realizado em funis de aço inoxidável, apoiados em uma estante também de aço inoxidável, que possuam em seu interior lonas estéreis dedicadas por produto. Esta etapa tem como objetivo isolar o componente (Fab_2), precipitado, presente na solução.

[74] Para a realização da Diálise, deve-se diluir a massa obtida no processo de filtração da segunda etapa de precipitação em 100 litros de água para injetável, em reator específico de 125 litros dedicado.

[75] Proceder a diálise e concentração do produto utilizando um sistema de filtração tangencial tipo ultrafiltro que possui como elemento filtrante cartuchos de 30.000 Da.

[76] Monitorar o processo com ácido tricloroacético para verificar se está havendo perda de proteína no processo e cloreto de bário (verificar se há a presença de sulfato de amônia através da formação do precipitado branco de sulfato de bário). A diálise só foi finalizada após não ser mais detectada, na água de rejeito do ultrafiltro, a presença de sulfato de amônia.

[77] Concentrar o volume filtrado restante no tanque para aproximadamente 30 L, através da eliminação de água durante a diálise.

[78] Isotonizar o filtrado contido no tanque com cloreto de sódio (0,8%). Adicionar solução de fenol a 90% (na concentração de 0,3% v/v), que tem ação conservante.

[79] Transferir o filtrado para garrafões de vidro, estéreis e apirógenos, devidamente identificados, e a seguir encaminhar para a câmara frigorífica da produção, onde aguardarão a etapa de clarificação.

[80] Este processo consiste na retirada do sulfato de amônia presente no produto através do sistema de ultrafiltração, ou seja, separação por membrana permeável, com redução de volume do produto filtrado. Toda esta etapa ocorre sob fluxo laminar classe A.

[81] Após a diálise, é realizada a Clarificação, que deve ser realizada sob fluxo laminar grau A, seguindo o protocolo:

a) Acoplar um funil de porcelana ao Kitasato;

b) Transferir a suspensão autoclavada de papa de celulose contida em um Becker para o funil de porcelana;

c) Conectar o kitasato à bomba de vácuo;

d) Recolher o filtrado do kitasato e transferir para um garrafão de vidro tipo pirex, previamente esterilizado e despirogenizado;

e) Encaminhar o produto devidamente identificado para a câmara frigorífica da produção.

[82] Nesta etapa, o produto resultante da diálise é filtrado em um sistema que tem como elemento filtrante uma suspensão formada por papa de celulose. Esta papa é composta por papel de celulose embebido em água para injetáveis autoclavados. A função deste procedimento é clarificar o produto, ou seja, retirar qualquer componente

não dissolvido no meio.

[83] Portanto, para a filtração esterilizante do concentrado de imunoglobulinas, segue-se o protocolo:

a) Montar o sistema de filtração formado por carcaças de aço inoxidável sanitárias contendo elementos filtrantes de 10'', nas porosidades de 0,45 µ e 0,22 µ;

b) Conectar, por meio de mangueira estéril, esse sistema de filtração a um tanque de aço inox de 20 L estéril;

c) Transferir a solução do frasco de imunoglobulina para o tanque de 20 L;

d) Pressurizar o tanque com nitrogênio filtrado estéril para que a solução atravesse o sistema de filtração;

e) Recolher o filtrado em um garrafão de vidro tipo pirex, previamente esterilizado e despirogenizado;

f) Encaminhar o produto (filtrado estéril de concentrado de imunoglobulinas) devidamente identificado para a câmara frigorífica da produção, enquanto aguardava análise do controle de qualidade.

[84] Nesta etapa o produto é esterilizado por processo de filtração esterilizante, com o intuito de preservá-lo de possíveis impurezas micriobiológicas.

7) Diluição experimental

[85] Essa etapa é realizada simulando-se a diluição final do produto, em pequena escala (um volume de até 100 mL), para verificar se todos os parâmetros físico-químicos e biológicos do produto diluído estão dentro dos parâmetros antes da diluição final. É uma etapa de ajuste do produto. Sob fluxo laminar grau A, proceder a diluição

experimental num volume aproximado de 100 mL do produto, simulando os teores normais do produto final.

[86] Enviar as diluições para realização dos testes de controle de qualidade.

[87] Encaminhar o produto (filtrado estéril de concentrado de imunoglobulinas) devidamente identificado para a câmara frigorífica de produto em processo.

[88] O preparo de solução salina se dá sob fluxo laminar grau A, devendo-se recolher 16L de água para injetáveis em um garrafão de vidro tipo pyrex estéril e apirógeno; Adicionar a quantidade de cloreto de sódio previamente pesada para contemplar a concentração da solução salina desejada; Autoclavar a solução salina.

[89] Sob fluxo laminar retirar uma amostra de 100 mL para encaminhar ao controle de qualidade; Adicionar solução de fenol a 90% (na concentração de 0,3% v/v), que tem ação conservante.

[90] A solução salina tem como finalidade diluir o produto, preservando a isotonização do mesmo.

8) Formulação do soro hiperimune

[91] A formulação do soro hiperimune (antiveneno) segue o protocolo:

a) Sob fluxo laminar abrir o reator de 125 L e adicionar o concentrado de imunoglobulinas e de solução salina;

b) Sob agitação, homogeneizar a solução e medir o pH da mesma;

c) Ajustar o pH para a faixa 6,3 a 6,7 com solução de carbonato de sódio, adicionada por meio de uma seringa descartável que tem em sua extremidade um filtro 0,22 µm;

d) Retirar 100 mL de amostra para teste de biocarga;

e) Transferir a solução do frasco de imunoglobulina para o tanque de 20 L estéril;

f) Conectar o tanque de 20 L ao sistema de filtração formado pelas carcaças de aço inoxidável sanitárias contendo elementos filtrantes de 10'', nas porosidades de 0,45 µ e 0,22 µ;

g) Pressurizar o tanque com nitrogênio filtrado estéril para que a solução atravesse o sistema de filtração;

h) Recolher o filtrado em um garrafão de vidro tipo pirex, previamente esterilizado e despirogenizado. Rotular os garrafões identificando-os;

i) Transferir os garrafões para o passtrough que dá acesso à sala de envase e realizar a assepsia da superfície externa dos mesmos com solução de álcool 70%.

[92] Nesta etapa ocorre a diluição do produto final com a filtração esterilizante do mesmo.

Envase

[93] O envase do soro hiperimune (antiveneno) segue o protocolo:

a) Conectar o garrafão à máquina de envase;

b) Retirar as magazines da estufa, abastecendo a esteira da máquina;

c) Ligar a máquina de envase;

d) Retirar o ar residual das mangueiras com o controlador manual;

e) Iniciar o processo de envase;

f) Retirar amostras para o controle em processo colocando-as no *passtrough* do controle;

g) Abastecer a esteira à medida que ela for esvaziando;

h) Recolher as ampolas envasadas em magazines vazias;

i) Caso seja necessário envasar mais de um garrafão, fazer a troca do garrafão vazio pelo cheio conectando-o na máquina e procedendo ao envase, repetindo as etapas acima;

j) Ao final do envase as ampolas são colocadas no passtrough de saída de produto acabado e posteriormente encaminhadas à câmara frigorífica de produto acabado.

Revisão e acondicionamento

[94] A revisão e o acondicionamento do soro hiperimune (antiveneno) segue o protocolo:

a) Retirar as ampolas da câmara frigorífica de produto acabado e encaminhá-las ao setor de revisão e acondicionamento;

b) Se houver alguma quebra de ampolas cheias as mesmas devem ser lavadas externamente na sala de lavagem de produto acabado, sendo colocadas posteriormente na sala de acondicionamento para secagem à temperatura ambiente. Se não, devem ser encaminhadas ao setor de revisão;

c) Inspecionar visualmente as ampolas quanto à presença de partículas estranhas, tais como fiapos, defeitos de fechamento e volume, partículas, vidro, contra fundo claro e escuro;

d) Encaminhar novamente as ampolas após a inspeção à câmara frigorífica de produto acabado ou seguir para a sala de gravação;

e) Programar a impressora videojet na sala de gravação, colocando-se o número do lote, a data de fabricação e a data de validade do produto em curso.

f) Proceder à gravação das ampolas, cartuchos e cintas.

g) Acondicionar as ampolas nas suas respectivas embalagens secundárias, lacrando-as e identificando-as;

h) Colocar a embalagem secundária na caixa de embarque, fechar e colar a cinta;

i) Conduzir o produto acondicionado ao almoxarifado de produto acabado, estocar na câmara fria de expedição, para posterior distribuição.

[95] A rotulagem das ampolas e a preparação das embalagens seguiram rigorosamente o "Guia para rotulagem de produto investigacional".

Propriedades físicas, químicas e ensaios pré-clínicos

[96] Os ensaios pré-clínicos, aplicáveis aos antivenenos, são realizados para verificar a sua potência, segurança, estado microbiológico e liberados para uso em seres humanos pelo setor de Controle de Qualidade do Instituto Vital Brasil. As análises são realizadas rotineiramente nos soros heterólogos líquidos produzidos pelo Instituto Vital Brasil são as seguintes: biológicas, microbiológicas e físico-químicas.

[97] As análises biológicas são: teste de potência e pirogênio in vivo, realizadas nas fases plasma, concentrado, diluição experimental e produto ampolado; e toxicidade específica realizada no produto ampolado.

[98] As análises microbiológicas são: teste de esterilidade: antes do envase - inoculação direta e após o envase - filtração por membrana; pirogênio in vitro (endotoxina bacteriana - teste realizado na solução salina utilizada para a diluição do soro antiapílico); e biocarga

(fase concentrado - antes da filtração esterilizante).

[99] As análises físico-químicas são: aspecto e pH (fases plasma, concentrado, diluição experimental e produto ampolado); proteínas: qualitativo ou do refratômetro (fases plasma, concentrado e diluição experimental) e quantitativo; cloreto de sódio e fenol (fases concentrado, diluição experimental e produto ampolado); e sólidos totais, sulfato de amônio, nitrogênio total – proteico e não proteico e volume médio (produto ampolado).

Cálculo da dose terapêutica e posologia do soro antiapílico

[100] Por fim, a dose terapêutica ideal para o novo soro antiapílico foi calculada levando-se em consideração a literatura mundial disponível e as seguintes premissas, de acordo com o "WHO Guideline for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins": 1-quantidade de veneno inoculada; 2-potência de neutralização do antiveneno; e 3-dose do antiveneno proposta.

[101] Dessa forma, para o cálculo da dose, os autores se basearam no fato de que uma abelha inocula durante uma picada aproximadamente 0,1 mg de veneno. Cada mililitro do soro antiapílico padronizado neutraliza 1,25 mg do veneno. Portanto, 10 ml do soro deverá neutralizar o veneno de 100 abelhas. Assim, está sendo proposta a seguinte posologia de administração do antiveneno:

- Até 5 picadas – não está indicada a aplicação do tratamento específico, a não ser por indicação médica;

- Entre 5 e 200 picadas – 2 ampolas de soro antiapílico;
- Entre 201 e 600 picadas – 6 ampolas de soro antiapílico;
- Entre 601 e acima de 1.000 picadas – 10 ampolas de soro antiapílico.

Formulação e apresentação do soro antiapílico

[102] O soro antiapílico obtido por este processo compreende a formulação descrita na Tabela 2.

Tabela 2: Formulação do soro antiapílico

Composição	Quantidade por ampola 10 mL
Fração $F(ab')_2$ de imunoglobulinas que neutralizam, no mínimo, 1,25 mg das frações tóxicas do veneno de *Apis mellifera* avaliada pelo teste de soroneutralização em camundongos	12,5 a 15 mg
Fenol	35 mg
Cloreto de sódio	80 mg
Água para injetável q.s.p.	10 mL

[103] O soro antiapílico é apresentado em ampolas contendo 10 ml da fração $F(ab')_2$ de imunoglobulinas específicas e purificadas, obtidas a partir de plasma de equinos hiperimunizados com uma mistura das frações tóxicas do veneno de *Apis mellifera*, fenol como conservante e cloreto de sódio como isotonizante.

[104] Trata-se de imunoglogulinas específicas aquelas produzidas apenas contra as frações tóxicas do veneno de abelhas africanizadas Apis mellifera, ou seja,

melitina e PLA2.

[105] O soro equino antiapílico descrito é utilizado para o tratamento específico contra os acidentes/envenenamentos tóxicos causados por múltiplas picadas de abelhas africanizadas *Apis mellifera*.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de um soro equino antiapílico **CARACTERIZADO POR** compreender as etapas de:

1) Extração de veneno;

2) Purificação das frações de interesse;

3) Preparação do antígeno;

4) Processo de hiperimunização;

5) Processamento e purificação do Plasma;

6) Filtração esterilizante e diálise do concentrado de imunoglobulinas;

7) Diluição experimental;

8) Formulação do soro hiperimune.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO POR** a etapa 1) compreender: a extração do veneno de abelhas africanizadas *Apis mellifera mellifera* por meio de estimulação elétrica em placas de vidro.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO POR** a etapa 2) compreender: a purificação do veneno total por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (HPLC-RP) para a purificação das frações proteicas de interesse, Melitina e fosofolipase A2.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO POR** a etapa 3) compreender: a formulação do antígeno de hiperimunização dos cavalos a partir da mistura de cinco a seis partes (5 a 6) de melitina, adicionados de uma a uma e meia partes (1 a 1,5) de Fosfolipase A2.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO POR** a etapa 4) compreender: imunização de cinco cavalos adultos machos com idades compreendidas entre 4 e 8 anos consistindo em:

a) Utilizar animais que nunca tenham recebido inoculações de antígenos;

b) Realizar uma imunização de base e posteriormente duas reimunizações;

c) Aplicar na imunização de base oito inoculações em diferentes dias; nas três primeiras inoculações utilizar 2 mg do veneno processado (antígeno), nas demais utilizar 4 mg do veneno (antígeno); no 7° dia após a última inoculação iniciar a sangria dos animais num total de quatro;

d) Após um período de um mês de descanso, imunizar novamente os animais com o protocolo de reimunização; neste aplicar quatro inoculações, sendo 6 mg do veneno processado (antígeno) na primeira e nas demais 2 mg; no 7° após a última inoculação iniciar a sangria dos animais num total de quatro;

e) Um mês após de descanso realizar novamente o protocolo de reimunização com mais uma sangria;

f) Após a verificação dos títulos dos anticorpos, a coleta e o processamento final do plasma necessitam das seguintes etapas: sangria, separação do plasma, reinfusão das hemácias, armazenamento em câmara fria de +2° a +8°C e transporte.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO POR** a etapa 5) compreender: a purificação do plasma por digestão péptica, 1ª precipitação e termocoagulação consistindo em:

a) Adicionar a um reator N°1 225 L de água para injetáveis; 1,125 L de solução de fenol a 90% (3,0 mL/Litro de solução); e 150 L de plasma;

b) Ligar o agitador do reator por 10 minutos

para que a solução seja homogeneizada;

c) Ajustar o pH da solução para a faixa de 4,0 a 4,6 com solução de ácido clorídrico 3,5 N;

d) Sob agitação, adicionar pepsina na concentração de 1,25 g/L de solução;

e) Ajustar o pH da solução para a faixa de 3,1 a 3,3 com solução de ácido clorídrico 3,5 N e agitar por 10 minutos;

f) Aquecer a solução até 37 °C através de injeção de água quente na camisa do reator, permanecendo a seguir em repouso por 30 minutos;

g) Deixar resfriar a temperatura ambiente;

h) Ajustar o pH da solução para a faixa de 4,1 a 4,3 com solução de hidróxido de sódio a 2,5 N;

i) Adicionar sob agitação pirofosfato de sódio decahidratado (3,352 g/L de solução) e toluol (1 mL/L de solução);

j) Medir o volume total da solução no reator;

k) Adicionar sulfato de amônia (12%) sob agitação;

l) Aquecer o reator a 55 °C mantendo por 1 hora;

m) Resfriar a temperatura a 37 °C.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO POR** a etapa 6) compreender: a filtração da 1ª precipitação em reator de produção pressurizado com ar comprimido estéril, mantendo a agitação, para que o produto passe para os elementos filtrantes (lonas) dispostos na estante sob fluxo laminar classe A; recolhimento do filtrado em frascos de vidro, estéreis e apirógenos,

retornando-o para o reator N° 2 de produção; e dispensa da massa retida nas lonas, resultante do processo de filtração.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO POR** a realização da 2ª. Precipitação compreender:

a) Manter sob agitação o filtrado recolhido no reator № 2;

b) Ajustar o pH do filtrado contido no reator 2 para 6,5 a 7,0 com hidróxido de sódio 2,5 N;

c) Desligar a agitação do reator deixando-se a solução acomodar e medir o volume da solução contida no reator № 2;

d) Adicionar sulfato de amônia em uma proporção de 19% do volume contido no reator № 2;

E, o processo de filtração da 2ª. precipitação compreender:

e) Pressurizar o reator № 2 com ar comprimido estéril, mantendo a agitação, para que o produto seja transferido para os funis com elementos filtrantes (lonas) dispostos na estante sob fluxo laminar;

f) Desprezar o líquido filtrado e recolher a massa obtida após o processo de filtração.

9. Processo, de acordo com as reivindicações 7 e 8, **CARACTERIZADO POR** a realização da diálise compreender: a diluição da massa obtida no processo de filtração da segunda etapa de precipitação em 100 litros de água para injetável, em reator específico de 125 litros dedicado; concentração do produto utilizando um sistema de filtração tangencial tipo ultrafiltro que possui como elemento

filtrante cartuchos de 30.000 Da; monitoramento do processo com ácido tricloroacético para verificar se está havendo perda de proteína no processo e cloreto de bário; concentração do volume filtrado restante no tanque para 30L, através da eliminação de água durante a diálise; isotonização do filtrado contido no tanque com cloreto de sódio (0,8%) e adição de solução de fenol a 90%,na concentração de 0,3% v/v e transferência do filtrado para garrafões de vidro, estéreis e apirógenos, devidamente identificados, e a seguir encaminhamento para a câmara frigorífica da produção, onde aguardarão a etapa de clarificação.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO POR** a etapa 7) compreender a simulação da diluição final do produto, em pequena escala num volume de até 100 mL, para verificar se todos os parâmetros físico-químicos e biológicos do produto diluído estão dentro dos parâmetros antes da diluição final.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO POR** a etapa 8) compreender: a formulação do soro antiveneno consistindo em:

a) Sob fluxo laminar abrir o reator de 125L e adicionar o concentrado de imunoglobulinas e de solução salina;

b) Sob agitação, homogeneizar a solução e medir o pH da mesma;

c) Ajustar o pH para a faixa 6,3 a 6,7 com solução de carbonato de sódio, adicionada por meio de uma seringa descartável que tem em sua extremidade um filtro 0,22 µm;

d) Retirar 100 mL de amostra para teste de biocarga;

e) Transferir a solução do frasco de imunoglobulina para o tanque de 20 L estéril;

f) Conectar o tanque de 20 L ao sistema de filtração formado pelas carcaças de aço inoxidável sanitárias contendo elementos filtrantes de 10'', nas porosidades de 0,45 µ e 0,22 µ;

g) Pressurizar o tanque com nitrogênio filtrado estéril para que a solução atravesse o sistema de filtração;

h) Recolher o filtrado em um garrafão de vidro tipo pirex, previamente esterilizado e despirogenizado. Rotular os garrafões identificando-os;

i) Transferir os garrafões para o *passtrough* que dá acesso à sala de envase e realizar a assepsia da superfície externa dos mesmos com solução de álcool 70%.

12. Soro equino antiapílico **CARACTERIZADO POR** ser produzido conforme processo descrito nas reivindicações 1 a 11.

13. Soro, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO POR** compreender: ampolas de 12,5 a 15 mg de fração $F(ab')_2$ de imunoglobulinas, 35 mg de fenol, 80 mg de cloreto de sódio e quantidade suficiente de água para injetável para completar o volume de 10 ml.

14. Uso do soro equino antiapílico, conforme descrito nas reivindicações 12 e 13, **CARACTERIZADO POR** ser para o tratamento específico contra os acidentes/envenenamentos tóxicos causados por múltiplas picadas de abelhas africanizadas *Apis mellifera*.

Figura 1

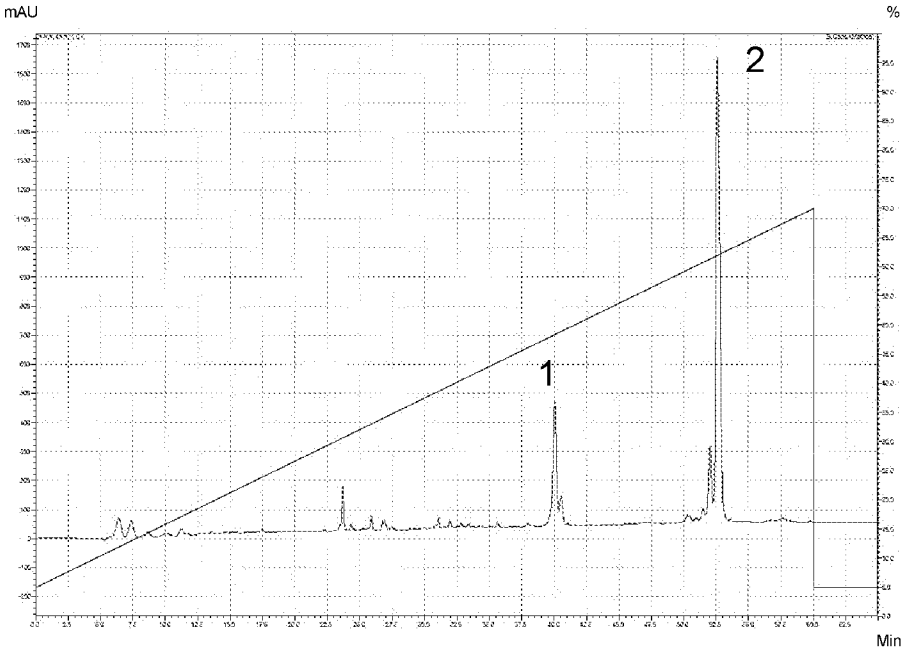


Figura 2

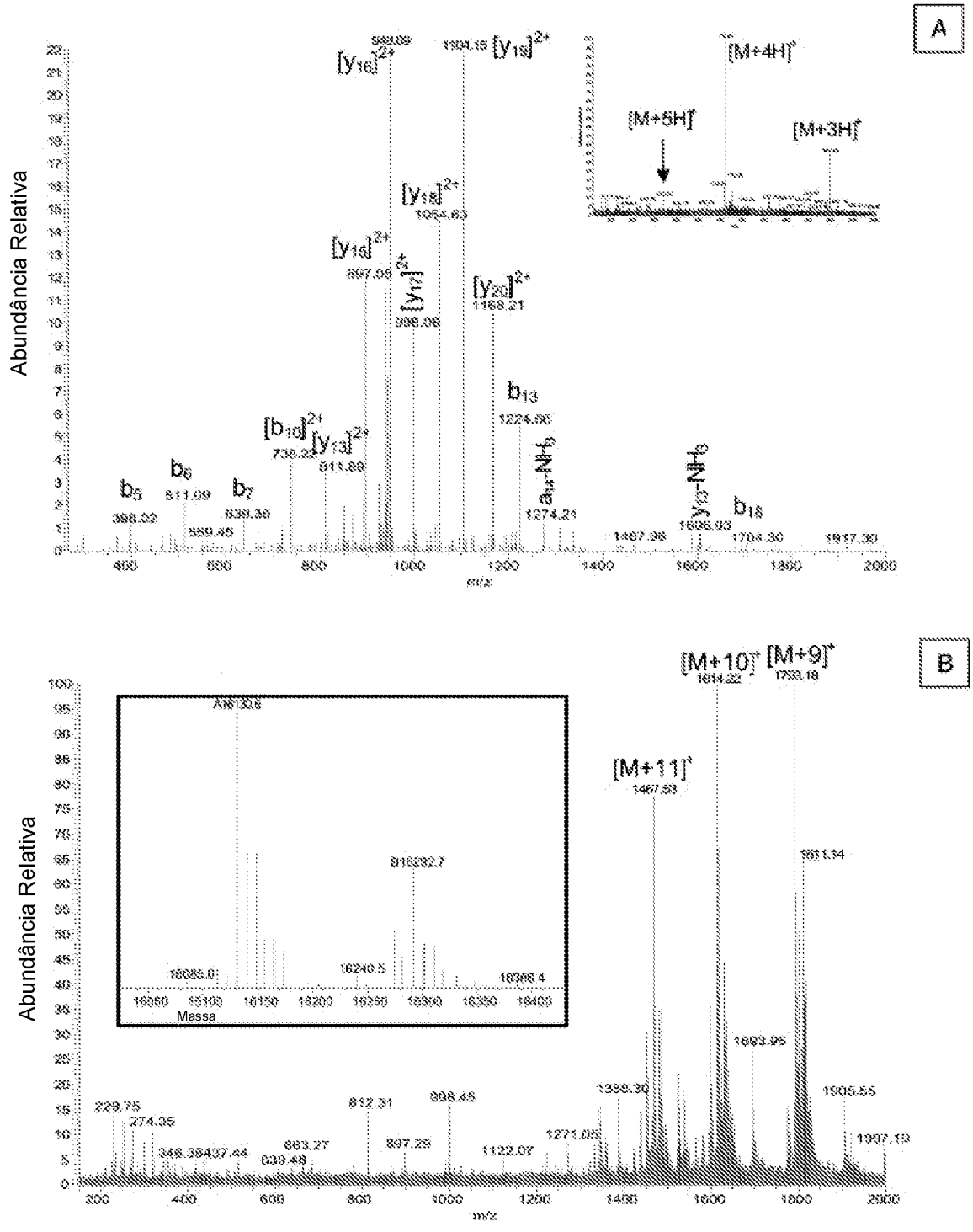
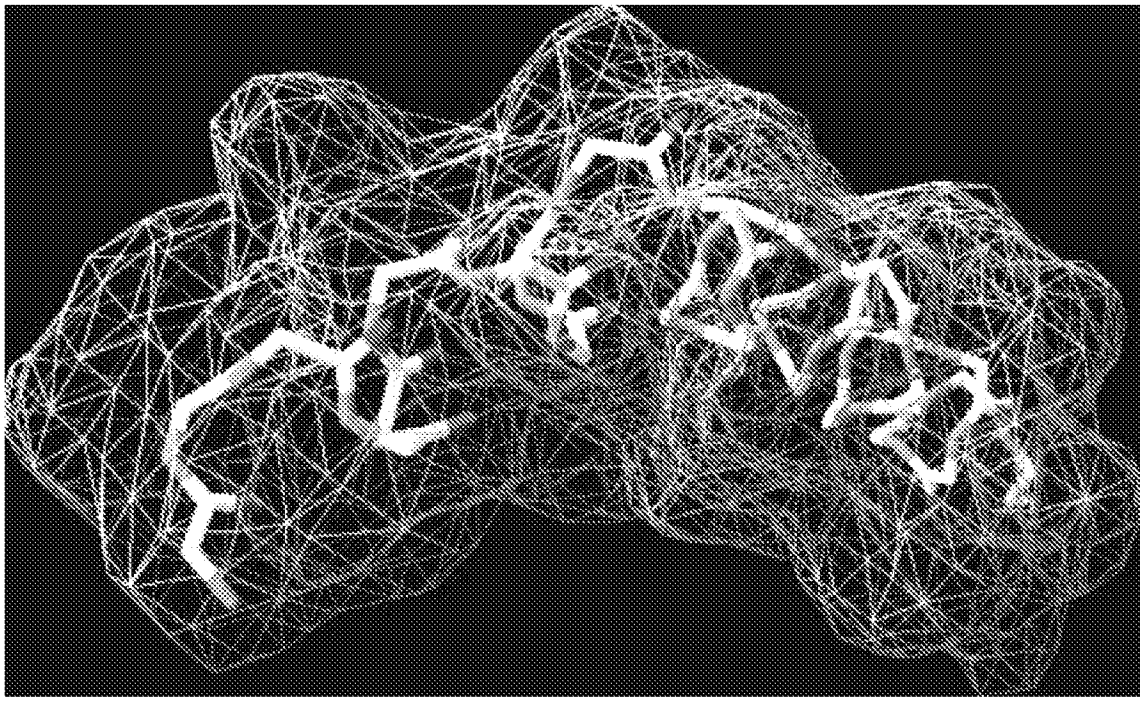

A
Abundância Relativa
[y16]2+
[y18]2+
[M+4H]+
[M+5H]+
[M+3H]+
[y14]2+
[y15]2+
[y17]2+
[y20]2+
b13
[b16]2+
[y13]2+
b5
b6
b7
a14-NH3
y10-NH3
b18
m/z
B
Abundância Relativa
[M+10]+
[M+9]+
[M+11]+
Massa
m/z

Figura 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BR2016/050255

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K39/395 (2006.01), A61K 35/16 (2015.01), C07K16/18 (2006.01), A61P 39/02 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K39

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Google, Base de patentes do INPI-BR (SINPI)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, NPL, MEDLINE, XPTK, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE (continua em folha suplementar)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	SANTOS, K. S. et al. Production of the First Effective Hyperimmune Equine Serum Antivenom against Africanized Bees. PLoS ONE. 2013. Vol. 8, N. 11 : e79971. doi: 10.1371/joumal.pone.0079971http://dx.doi.org/10.1371/joumal.pone.0079971. Abstract, section, "Method", last paragraph from page 4.	1 a 3, 5 a 11 4, 12, 13
Y A	BR PI0804652 A2 (FUNDAÇÃO INST BUTANTAN [BR]) 02 march 2010 (2010-03-02) Cited on description. Abstract, line 27 from page 4 to line 4 from page 6, pages 7	1 a 3, 5 a 11 4, 12, 13
Y A	SCHUMACHER, M. J. et al. Neutralization of bee venom lethality by immune serum antibodies. Am J Trop Med Hyg. 1996. Vol. 55, No. 2, páginas: 197-201. PMID: 8780460. Abstract, section "Methods", Tables 1 , 3 and 4.	1 a 3, 5 a 11 4, 12, 13

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01/02/2017	07/02/2017

Name and mailing address of the ISA/
INPI
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua Sao Bento nº 1, 17º andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ
Facsimile No.

Authorized officer
Flávia Riso Rocha
Telephone No. **+55 21 3037-3493/3742**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BR2016/050255

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JONES, R. G. et al. A novel Fab-based antivenom for the treatment of mass bee attacks. Am J Trop Med Hyg. 1999. Vol. 61, No. 3, pages: 361-366. PMID: 10497971. Abstract, section, "Materials and Methods".	1 a 3, 5 a 11 4, 12, 13
A	FERREIRA JUNIOR, R. S. et al. Africanized honey bee (Apis mellifera) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. Toxicon (Oxford). 2010. Vol. 56, pages: 355-362. Abstract, Figures 2 e 3, section "Discussion".	1 a 13
A	FERREIRA JUNIOR, R. S. et al. New Nanostructured Silica Adjuvant (SBA-15) Employed to Produce Antivenom in Young Sheep Using Crotalus durissus terrificus and Apis mellifera Venoms Detoxified by Cobalt-60. Journal of Toxicology and Environmental Health. 2010. Part A, Vol. 73, paginas: 926-933. doi: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287391003745069. Abstract.	1 a 13
P,A	PESSENDA, G. et al. Human scFv antibodies (Afribumabs) against Africanized bee venom: Advances in melittin recognition. Toxicon. January 2016. Vol. 112, pages: 59-67. doi: http://dx.doi.Org/10.1016/j.toxicon.2016.01.062. Abstract.	1 a 13
A	FUNAYAMA, J. C. et al. Production of human antibody fragments binding to melittin and phospholipase A2 in Africanised bee venom: minimising venom toxicity. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2012. Vol. 110. No. 3, pages: 290-297. doi: 10.1111/j.l742-7843.2011.00821.x. Abstract, section, "Materials and Methods".	1 a 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BR2016/050255

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Methods of treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as methods of diagnosis, according to Rule 39.1 (iv) of the PCT.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

BR PI0804652 A2	2010-03-02	Nenhum	

TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXPEPEB, TXPES, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPWOEA.

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº
PCT/BR2016/050255

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

A61K39/395 (2006.01), A61K 35/16 (2015.01), C07K16/18 (2006.01), A61P 39/02 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

A61K39

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Google, Base de patentes do INPI-BR (SINPI)

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPODOC, NPL, MEDLINE, XPTK, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE (continua em folha suplementar)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
Y A	SANTOS, K. S. *et al.* Production of the First Effective Hyperimmune Equine Serum Antivenom against Africanized Bees. PLoS ONE. 2013. Vol. 8, N. 11: e79971. doi:10.1371/journal.pone.0079971http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079971. Resumo, seção "Método", último parágrafo da página 4.	1 a 3, 5 a 11 4, 12, 13
Y A	BR PI0804652 A2 (FUNDACAO INST BUTANTAN [BR]) 02 março 2010 (2010-03-02) Citado na descrição. Resumo, linha 27 da página 4 à linha 4 da página 6, páginas 7 a 20.	1 a 3, 5 a 11 4, 12, 13
Y A	SCHUMACHER, M. J. *et al.* Neutralization of bee venom lethality by immune serum antibodies. Am J Trop Med Hyg. 1996. Vol. 55, No. 2, páginas: 197-201. PMID: 8780460. Resumo, seção "Métodos", Tabelas 1, 3 e 4.	1 a 3, 5 a 11 4, 12, 13

☒ Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C ☒ Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado comum outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional	Data do envio do relatório de pesquisa internacional:
01/02/2017	07/02/2017

Nome e endereço postal da ISA/**BR**	Funcionário autorizado
INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Rua Sao Bento nº 1, 17º andar cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ	**Flávia Riso Rocha**
Nº de fax: +55 21 3037-3663	Nº de telefone: +55 21 3037-3493/3742

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
Y A	JONES, R. G. *et al.* A novel Fab-based antivenom for the treatment of mass bee attacks. Am J Trop Med Hyg. 1999. Vol. 61, No. 3, páginas: 361-366. PMID: 10497971. Resumo, seção "Materiais e Métodos".	1 a 3, 5 a 11 4, 12, 13
A	FERREIRA JÚNIOR, R. S. *et al.* Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. Toxicon (Oxford). 2010. Vol. 56, páginas: 355-362. Resumo, Figuras 2 e 3, seção "Discussão".	1 a 13
A	FERREIRA JÚNIOR, R. S. *et al.* New Nanostructured Silica Adjuvant (SBA-15) Employed to Produce Antivenom in Young Sheep Using *Crotalus durissus terrificus* and *Apis mellifera* Venoms Detoxified by Cobalt-60. Journal of Toxicology and Environmental Health. 2010. Part A, Vol. 73, páginas: 926-933. doi: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287391003745069. Resumo.	1 a 13
P,A	PESSENDA, G. *et al.* Human scFv antibodies (Afribumabs) against Africanized bee venom: Advances in melittin recognition. Toxicon. Janeiro de 2016. Vol. 112, páginas: 59–67. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.01.062. Resumo.	1 a 13
A	FUNAYAMA, J. C. *et al.* Production of human antibody fragments binding to melittin and phospholipase A2 in Africanised bee venom: minimising venom toxicity. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2012. Vol. 110. No. 3, páginas: 290-297. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00821.x. Resumo, seção "Materiais e Métodos"	1 a 13

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº
PCT/BR2016/050255

Quadro II **Observações quando certas reivindicações não puderam ser objeto de pesquisa (Continuação do ponto 2 da primeira página)**

Este relatório de pesquisa internacional não foi formulado em relação a certas reivindicações, sob Artigo 17.2).a), pelas seguintes razões:

1. ☒ Reivindicações: **14**

porque estas se referem a matéria na qual esta Autoridade não está obrigada a realizar a pesquisa, a saber:

Métodos de tratamento do corpo humano ou animal pela cirurgia ou terapia, assim como métodos de diagnóstico, conforme a Regra 39.1(iv) do PCT.

2. ☐ Reivindicações:

porque estas se referem a partes do pedido internacional que não estão de acordo com os requisitos estabelecidos, de tal forma que não foi possível realizar uma pesquisa significativa, especificamente:

3. ☐ Reivindicações:

porque estas são reivindicações dependentes e não estão redigidas de acordo com a segunda e terceira frase da Regra 6.4.a).

Quadro III **Observações por falta de unidade de invenção (Continuação do ponto 3 da primeira página)**

Esta Autoridade de pesquisa internacional encontrou múltiplas invenções neste depósito internacional, a saber:

1. ☐ como todas as taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa cobre todas as reivindicações pesquisáveis.
2. ☐ como a pesquisa em todas as reivindicações pesquisáveis pode ser feita sem esforço que justifique pagamento adicional, esta Autoridade não solicitou o pagamento de taxas adicionais.
3. ☐ como somente algumas das taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa internacional cobre somente aquelas reivindicações cujas taxas foram pagas, especificamente as reivindicações:
4. ☐ as taxas de pesquisas adicionais requeridas não foram pagas dentro do prazo pelo depositante. Consequentemente, este relatório de pesquisa internacional se limita à invenção mencionada primeiramente nas reivindicações, na qual é coberta pelas reivindicações:

Observações da reclamação

☐ as taxas adicionais para pesquisas foram acompanhadas pela reclamação do depositante e, se for o caso, pelo pagamento da taxa de reclamação.

☐ as taxas adicionais para pesquisa foram acompanhadas pela reclamação do depositante mas a taxa de reclamação não foi paga dentro do prazo especificado pela solicitação.

☐ o pagamento de pesquisas adicionais não acompanha nenhuma reclamação.

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
Informação relativa a membros da família da patentes

Depósito internacional Nº
PCT/BR2016/050255

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
BR PI0804652 A2	2010-03-02	Nenhum	
---	---	---	---

Quadro Suplementar

No caso **do espaço em qualquer quadro precedente não for suficiente**.
Continuação de: base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional.

TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXPEPEB, TXPES, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPWOEA.