

323024



P A T E N T E D E I N V E N C I Ó N
=====

a favor de

MERCK & CO., INC. - de nacionalidad norteamericana - con domicilio en RAHWAY, New Jersey (EE.UU.), 126 East Lincoln Avenue,

por :

"Un procedimiento para purificar antígeno protector B. pertussis y para preparar una vacuna a partir del mismo".

-----:OO:-----

M e m o r i a d e s c r i p t i v a .

La presente invención se relaciona con un nuevo método para purificar antígeno protector B. pertussis y al uso de este antígeno en la preparación de vacunas monovalentes ó polivalentes que están desprovistas de cualquier cantidad sustancial de material celu-

323024

4



lar de B. pertussis.

Se define la tos ferina como una enfermedad infecciosa aguda altamente contagiable causada por B. pertussis que, en los niños de menos de 4 años de edad, es peligrosa y probablemente ocupa el primer lugar como causa de mortalidad infantil. La inmunización contra esta enfermedad ha sido lograda en el pasado mediante la inyección de vacuna de células muertas ó antígeno extractado. Sin embargo, la frecuente presencia de reacciones secundarias tales como fiebre, irritabilidad, inflamación y nerosis, y la rara pero descorazonadora información de casos de encefalitis, ha constituido un poderoso estímulo para realizar investigaciones conducentes a lograr una mejor vacuna.

Una de las finalidades de la presente invención es proveer un antígeno de B. pertussis de forma sustancialmente mejorada, que es capaz de proveer una inmunidad duradera contra la tos ferina y que no produce los efectos secundarios indeseables de las vacunas comunmente conocidas.

Otra finalidad de la presente invención es proveer una vacuna que está libre de sustancias celulares protoplasmáticas, algunas de las cuales son tóxicas y pueden ser responsables de las reacciones secundarias que se observan durante la administración de vacunas comercialmente disponibles.

De acuerdo con estas y otras finalidades, se ha comprobado que se puede preparar una vacuna útil, para la inmunización contra la tos ferina, mediante un procedimiento que comprende el desgarramiento mecánico de células de B. pertussis y la separación de pared celular bacteriana que contiene el antígeno protector. Se ha establecido que el antígeno protector es una parte integral de la pared celular (que se denomina a veces membrana celular ó envoltura celular); el protoplasma de la célula, que contiene el cuerpo principal del material nitrogenado, posee poca ó ninguna actividad protectora.



En cambio, el protoplasma contiene una elevada concentración de proteína tóxica que puede causar la muerte en animales de laboratorio y efectos secundarios indeseables cuando está presente en vacunas a las cuales se administra clínicamente.

5 Por consiguiente, una de las particularidades de la presente invención reside en desgarrar las células intactas de *B. pertussis* y aislar las paredes celulares mediante centrifugación ó por otros medios mecánicos. Se lava entonces las paredes celulares aisladas, librándolas sustancialmente de material celular, y se las trata con
10 acetona, ó un alcohol monohídrico de bajo peso molecular que tiene una estructura molecular de cadena ya sea recta ó ramificada, y que contiene de preferencia 2 a 4 átomos de carbono, tales como alcohol etílico, propílico ó butílico, ó cualquiera de los aldehídos ó cetonas de bajo peso molecular que son miscibles con agua, tales como
15 metil etil cetona, acetaldehído y lo similar. A la suspensión de pared celular se agrega 1 a 5 volúmenes de la cetona, aldehído ó alcohol elegidos, y se mantiene la mezcla a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, con ventaja aproximadamente entre -20°C y la temperatura ambiente, durante un periodo de hasta aproximada-
20 mente 24 hr. El periodo durante el cual se mantiene la mezcla depende de la temperatura; a temperaturas más altas es suficiente un periodo más breve para hacer seguro el material de pared celular para el uso como vacuna, mientras que a temperaturas más bajas se requiere más tiempo. Por ejemplo, a -20°C se obtienen resultados máximos
25 (es decir, seguridad y rendimiento) en aproximadamente 18 a 24 hr, mientras que cerca de la temperatura ambiente resulta suficiente menos de 1 hr para hacer al material de pared celular sustancialmente seguro para el uso, aunque se sacrifica rendimientos de antígeno protector activo.

30 Se puede hacer crecer células de *B. pertussis*, usadas en el



procedimiento de la presente invención, en cualquiera de los medios apropiados conocidos, tal como medio de agar y carbón vegetal, medios líquidos, ó en un medio de cultivo Cohen-Weeler despues del periodo de crecimiento, se cosecha las células mediante centrifugación y se las puede usar como el cosechado en el procedimiento de la presente invención, ó se puede congelar la pasta celular y almacenarla a -30 °C, hasta que se la necesita. Si así fuera conveniente, se puede liofilizar las células cosechadas y almacenarlas entonces hasta que se las necesite, ó se puede matar las células con timerosal ó mediante otros métodos que se sabe que no destruyen el antígeno protector de B. pertussis.

Se resuspende las células en agua destilada fría (2 a 5 °C) y se la somete a descompresión explosiva en un fraccionador de células Ribí (Ivan Sorvall, Inc., Norwalk, Conn.) a 2110 kg/cm² y una temperatura de 20 °C ó menos. Aunque se obtiene buenos resultados empleando una presión de 2110 kg/cm², se ha comprobado que se obtiene resultados satisfactorios cuando se emplea presiones comprendidas aproximadamente entre 1050 y 3500 kg/cm². Se puede usar tambien otros medios para desgarrar células y aislar las paredes celulares, por ejemplo oscilación sónica, molienda mecánica, etc., aunque la experiencia indica que el aparato Ribí produce los máximos rendimientos de material de pared limpio. Antes del uso, se esteriliza ventajosamente el aparato Ribí exponiendo la totalidad de sus tuberías a óxido de etileno a través de un periodo de 24 hr e inundando luego con gas nitrógeno estéril. Se esteriliza la unidad de presión durante 1 hr, de preferencia poniendo todas sus partes en contacto con β -propiolactona (0,5 %) e inundando luego con agua destilada estéril. Un filtro polifásico para la retención de bacterias, u otro filtro apropiado, conecta la cámara de descompresión con un tanque de nitrógeno.

Se alimenta la suspensión de células de B. pertussis a la



cámara de compresión del fraccionador, en la cual se las somete a una presión de 1050 a 3500 kg/cm², de fuerza a las células hacia la cámara de descompresión en la cual se desgarran explosivamente. Se mantiene la cámara de descompresión a 20 °C ó menos mediante gas ní-
5 trógeno previamente enfriado, al cual se hace pasar a través del fil-
tro polifásico y hacia la cámara. Se recoge el efluente, proveniente de la cámara de descompresión y que contiene las paredes celulares y protoplasma, en un recipiente estéril sumergido en un baño de hielo.

Se centrifuga el efluente que contiene el material celular
10 desgarrado, se descarta el fluido sobrenadante y se puede lavar el material de pared celular restante mediante agua destilada fría para eliminar los constituyentes protoplasmáticos solubles altamente tó-
xicos. Se suspende en agua destilada las paredes celulares ya sea la-
vadas ó no, de manera de obtener una concentración comprendida apro-
15 ximadamente entre 100 B/ml a 2000 B/ml, aunque para fines prácticos se usa por lo general una concentración de 500 B/ml. Se mezcla enton-
ces lentamente el concentrado de pared celular con 1 a 5 volúmenes de acetona ó un alcohol de bajo peso molecular ó cualquier aldehído ó cetona de bajo peso molecular que es miscible con agua, y se alma-
20 cena de preferencia a -20 °C durante 18 a 24 hr. Aunque se ha utilizado con éxito temperaturas más altas, las temperaturas más bajas dan por resultado mayores rendimientos de antígeno protector activo. Se sedimenta entonces las paredes celulares, así tratadas, mediante centrifugación y se las puede lavar con agua destilada fría. Se re-
25 suspende el sedimento con agua destilada fría hasta una equivalencia de 500 B/ml y se homogeneiza. Se puede llevar a cabo la homogeneiza-
ción mediante el paso a través de un oscilador sónico, tal como el Raytheon de 10 kg/s, ó mediante diversos mezcladores ó molinos.

Se protege entonces la suspensión, de paredes celulares
30 así tratadas, con una cantidad eficaz de protector tal como timero-

323024

4 FEB



sal, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de γ -pico-
linio u otro protector aceptable conocido, y se diluye hasta cual-
quier potencia deseada.

5 Se puede usar las paredes celulares destoxificadas, que
contienen el antígeno protector obtenido mediante el nuevo método
de la presente invención, para preparar una vacuna acuosa ó se pue-
de adsorber inicialmente el material de pared celular, que contiene
antígeno, sobre coadyuvante tales como hidróxido ó fosfato de alu-
minio ó se puede precipitar con alumbre y formarlo entonces en una
10 vacuna. Puesto que el antígeno protector es compatible con otros
antígenos y/ó toxoides, se le puede combinar con ellos en la manera
convencional de manera de proveer una vacuna polivalente en forma
de dosis unitaria.

15 La presente invención tiene una cantidad de ventajas ne-
tas. El producto está libre de todo constituyente protoplasmático,
uno de los cuales, es decir la toxina lábil al calor, que es extre-
madamente tóxica para los animales de laboratorio y puede ser res-
ponsable de algunas de las reacciones secundarias en los seres hu-
manos. El producto está libre de medio nutritivo y sustancias quí-
micas extrañas. El producto es compatible con otros materiales an-
20 tígenos corrientemente combinados con antígeno de células de pertussis
intactas. El procedimiento es simple y se le puede llevar a cabo,
siendo reproducible, proporcionando altos rendimientos de material
activo.

25 Se describe el procedimiento en detalle en los siguientes
ejemplos. Se comprenderá que se puede introducir modificaciones en
las diversas técnicas empleadas para poner en práctica el procedi-
miento de la presente invención; la contribución importante es la
separación y destoxificación de las paredes celulares que contienen
30 el antígeno protector de B. pertussis, que han sido aisladas con

- 7 - 323024 4 FEB



respecto a protoplasma, como así también con respecto a otras sustancias extrañas.

EJEMPLO I

5 Se cosecha las células, provenientes de un cultivo de 48 hr de *B. pertussis*, crecido sobre un medio de cultivo Cohen-Wheeler, ajustando el medio a pH = 7,0 mediante ácido clorhídrico concentrado, y centrifugando en una centrífuga Sharples. Se resuspende en agua destilada la pasta de células así obtenida, se la hace pasar a través de un tamiz de nilón de 200 mallas para separar las partículas gruesas, y se ajusta el filtrado hasta una concentración de 500 B/ml. La concentración de las células estará de preferencia comprendida en la gama de 100 a 1000 B/ml para la finalidad de la presente invención.

15 Se alimenta el concentrado de células (1600 ml) a un fraccionador de células Ribbi y se le somete a una presión de 2100 kg/cm². Se expulsa las células, bajo presión, hacia la cámara de descompresión, se las mantiene a 20 °C ó menos mediante gas nitrógeno enfriado, y se desgarran explosivamente en esta última. Se drena el material celular desde la cámara de descompresión hacia un recipiente
20 estéril sumergido en un baño de hielo, obteniéndose 1600 ml. de efluente.

 Se centrifuga el efluente en una cabeza de rotor con tazón para tandas, a razón de 16.000 r.p.m. durante 3 hr. Se puede usar otros equipos centrífugos, por ejemplo la centrífuga Sharples. Se
25 decanta el sobrenadante desde la cabeza de rotor y se puede volver a llenar la cabeza y hacerla girar una ó más veces, si así fuera conveniente, sin retirar el residuo. El sobrenadante, al cual se retira y se descarta, contiene la fracción protoplasmática altamente tóxica del concentrado celular.

30 Se retira el residuo ó sedimento que queda en la cabeza de

323024



rotor, de preferencia agregando perlas de acero a la cabeza de rotor y agitando suavemente la cabeza disponiéndola sobre un mecanismo rotante. Se puede usar tambien otros métodos conocidos para desprender el residuo de la cabeza de rotor.

5 Se desprende por lavado el residuo de la cabeza de rotor mediante agua destilada fría (2 a 5 °C) (aproximadamente 1600 ml); con agitación constante se agrega 3 volúmenes de acetona, (a la cual se mantiene fría mediante un baño de hielo seco y acetona), y se almacena la mezcla a -20 °C durante 18 hr. Se puede ajustar tambien la
10 concentración de pared celular y acetona a una concentración de pertussis equivalente a 100 a 2000 B/ml y se puede usar acetona ó un alcohol monohídrico de 2 a 4 átomos de carbono ó cualquier aldehído ó cetona de bajo peso molecular miscible con agua, entre 1 a 5 volúmenes. Se centrifuga entonces el material a razón de 2000 r.p.m.
15 durante 30 min y se descarta el sobrenadante. Se lava dos veces el sedimento con agua destilada fría (un volumen igual al sobrenadante descartado) mediante centrifugación y se resuspende en agua destilada estéril fría hasta una equivalencia de 500 B/ml. Se homogeneiza entonces el sedimento, así lavado, mediante su paso a través
20 de un oscilador sónico Raytheon (10 kg/s) durante 5 min. Se resuspende el sedimento, así lavado, en solución salina estéril regulada a pH = 7,2 hasta un volumen de 1600 ml. Se le puede almacenar indefinidamente como tal entre 2 y 5 °C. Se puede diluir esta preparación de acuerdo con las normas prescritas por N.I.H. y se la
25 usa para preparar vacunas coadyuvantes ó multivalentes acuosas.

EJEMPLO II

Vacuna Coadyuvante

Mientras se agita la suspensión de material de pared celular del Ejemplo I se agrega lentamente alumbre potásico estéril al
30

323024



10 % (178 ml), y se almacena la mezcla entre 2 a 5 °C durante 18 hrs.
 Se puede decantar el fluido claro, que se encuentra encima del sedimento flocculado, y/ó se puede centrifugar el sedimento a razón de 1000 a 2000 r.p.m. en frío, y descartar el sobrenadante. Se lava dos veces el sedimento por centrifugación con volúmenes de agua destilada fría e igual a 2 a 5 veces el volumen del sedimento, y se resuspende el sedimento, así lavado, en solución salina estéril regulada a pH = 7,2 hasta un volumen de 3100 ml hasta una equivalencia de 258 B/ml. Se ajusta el concentrado de vacuna hasta un equivalente de 32 B/ml ó menos, mediante la adición de solución salina estéril, pH = 7,2, ó regulador glicina 0,3M. Como protector se agrega timerosal en una cantidad suficiente para producir una concentración de 1:10.000 cuando está diluido. Esta vacuna permanece estable cuando se la almacena entre 2 y 5 °C.

15 La preparación de pared celular flocculada en alumbre, cuando se la diluye hasta una equivalencia de 32 B/ml, contiene 15,7 unidades protectoras (U.P.) por dosis humana total (1,5 ml) en comparación con el testigo N° 6 del N.I.H. que tiene 12 unidades protectoras por dosis humana total, y se la puede emplear para preparar vacunas coadyuvantes ó multivalentes.

20 Se determina la potencia de la preparación de pared celular y del testigo del N.I.H., administrando diluciones seriadas del extracto y del testigo a grupos separados de ratones y excitando entonces a los animales intracranealmente con 0,03 ml de una dilución de B. pertusis virulento conocido que contiene 10⁵ organismos/ml. A 25 continuación se dan los resultados de análisis de potencia.

<u>Análisis</u> (1)	<u>U.P./D.H.T.</u> (2)
1	9,0
2	11,0
3	12,75



4	14,4
5	20,25
6	<u>27,0</u>

Media : 15,7

- 5 (1) Equivalente de vacuna de 32 B/ml
- (2) Dosis Humana Total = 1,5 ml.

Se comprueba que la vacuna coadyuvante del Ejemplo II es no tóxica de acuerdo con las normas de N.I.H., que requieren que, por inyección intraperitoneal de la mitad de una sola dosis humana en los ratones, no haya pérdida de peso en 3 días, una ganancia neta de 3 g en 7 días, y no más de 5 % de mortalidad en los animales usados en el estudio. Por inyección intraperitoneal de 0,25 ml del extracto de antígeno protector del Ejemplo II en 10 ratones, se observa una ganancia término medio del peso de 2,4 g al término de 3 días, y una ganancia término medio 4,7 g al término de 7 días, sin muertes al término del periodo de ensayo.

La vacuna del ejemplo II pasa también el ensayo de seguridad en animales, en el sentido de que no se producen muertes ni síntomas cuando se inyecta una sola dosis humana en cada uno de dos ratones de 20 g, y cuando se inyecta 3 veces una sola dosis humana en cada uno de dos cobayos de 350 g.

Los ensayos convencionales de esterilidad establecen que la vacuna está libre de moho y bacterias.

El análisis electroforético y de Ouchterlony establecen que la vacuna del Ejemplo II está desprovista de la mayor parte de antígenos distintos del antígeno protector que se encuentra en la célula entera intacta. La vacuna final contiene uno/tres ó menos del nitrógeno total que se encuentra en vacunas convencionales de este tipo.



EJEMPLO III

Vacuna Acuosa

Mediante solución salina regulada a pH = 7,2 que contiene timerosal 1:10.000, se ajusta el concentrado de antígeno protector del Ejemplo I hasta una concentración final de 32 B/ml ó menos. Esta vacuna permanece estable cuando se la almacena entre 2 y 5 °C.

EJEMPLO IV

Vacunas Multivalentes

Se puede agregar toxoides, por ejemplo toxoides de la difteria y del tétano, a cualquiera de las vacunas acuosas ó coadyuvantes mencionadas más arriba de manera de obtener una vacuna multivalente en la cual los toxoides están presentes en las concentraciones normalmente recomendadas.

La presente invención contempla la separación de antígeno protector con respecto a B. pertussis bajo la forma de paredes celulares, empleando modificaciones de los procedimientos ilustrados en el Ejemplo I que han sido descritos más arriba. Se puede ajustar el concentrado de antígeno protector, así obtenido, hasta cualquier concentración deseada y formar con el mismo una vacuna monovalente ó polivalente mediante cualquiera de los métodos convencionalmente empleados para preparar vacunas, particularmente las que contienen antígeno B. pertussis. No se proveen ejemplos adicionales para ilustrar la manera de trabajar dentro de las gamas preferidas mencionadas más arriba, puesto que resultará evidente para los entendidos en ciencias biológicas la manera en que se puede preparar las diversas modificaciones específicamente contempladas aquí.

N O T A

Se reivindica como objeto de la presente patente :



1. - Un procedimiento para purificar antígeno protector B. pertussis, mediante el cual se hace inocuo un material de pared celular de B. pertussis, que contiene antígeno protector, utilizable como vacuna, que comprende agregar 1 a 5 volúmenes de una sustancia elegida de la clase que comprende acetonas de bajo peso molecular, aldehídos de bajo peso molecular y alcoholes monohídricos de bajo peso molecular, a una suspensión acuosa de dicho material de pared celular, y mantener dicha mezcla a una temperatura inferior a la temperatura ambiente durante un período de hasta aproximadamente 24 hr.
2. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que se mantiene la mezcla a -20°C durante un período comprendido aproximadamente entre 18 y 24 hr.
3. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que se emplean 1 a 5 volúmenes de una cetona de bajo peso molecular.
4. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en que se emplean 1 a 5 volúmenes de una cetona de bajo peso molecular.
5. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que se emplean 1 a 5 volúmenes de acetona.
6. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en que se emplean 1 a 5 volúmenes de acetona.
7. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que se emplea una suspensión acuosa de material de pared celular que tiene una concentración de B. pertussis equivalente entre 100 y 2000 B/ml.
8. - Un procedimiento para purificar antígeno protector B. pertussis, mediante el cual se hace inocuo un material de pared celular de B. pertussis, que contiene antígeno protector, utilizable como vacuna, que comprende agregar 3 volúmenes de acetona a una suspensión acuosa de dicho material de pared celular, y mantener dicha mezcla aproximadamente a -20°C durante un período de aproximadamente 18 a 24 hr.



9. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en que se emplea una suspensión acuosa de material de pared celular, que tiene una concentración de B. pertussis equivalente entre 100 y 2000 B/ml.
- 5 10. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en que se emplea una suspensión acuosa de material de pared celular, que tiene una concentración de B. pertussis equivalente aproximadamente a 500 B/ml.
- 10 11. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en que se obtiene el material de pared celular de B. pertussis, que contiene antígeno protector, desgarrando mecánicamente células de B. pertussis, y separando el material de pared celular con respecto al material protoplasmático.
- 15 12. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en que se obtiene el material de pared celular de B. pertussis, que contiene antígeno protector, separando dicho material de pared celular con respecto a todo otro material celular, mediante extrusión de las células intactas de B. pertussis, bajo una presión de 1050 a 3500 kg/cm², hacia una cámara enfriada de descompresión, y cosechando 20 luego mecánicamente el material de pared celular.
- 25 13. - Un procedimiento para preparar una vacuna que, por administración parenteral, es capaz de producir anticuerpos protectores contra B. pertussis, que comprende coprecipitar el antígeno B. pertussis que contiene material de pared celular, preparado mediante el procedimiento de la reivindicación 8, con un coadyuvante elegido de la clase que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y alumbre, resuspender el adsorbato de coadyuvante en solución salina fisiológica a una concentración de por lo menos 8 unidades protectoras de antígeno B. pertussis por mililitro, y agregar 30 timerosal hasta una concentración final de por lo menos aproxi-

323024



madamente 1:10.000.

5 14. - Un procedimiento para preparar una vacuna que, por
administración parenteral, es capaz de producir anticuerpos prote-
tores contra B. pertussis, que comprende coprecipitar el antígeno B.
pertussis que contiene material de pared celular preparado mediante
el procedimiento de la reivindicación 10, con un coadyuvante elegido
de la clase que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato de alumi-
nio y alumbre, resuspendiendo el adsorbato de coadyuvante en solución
10 salina fisiológica hasta una concentración de por lo menos 8 unidades
protectoras de antígeno B. pertussis por mililitro, y agregar timero-
sa hasta una concentración final de por lo menos aproximadamente
1:10.000.

15 15. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13,
en que se agrega a la vacuna por lo menos un miembro elegido entre un
toxide bacteriano y un antígeno compatible.

16. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14,
en que se agrega a la vacuna por lo menos un miembro elegido entre un
toxide bacteriano y un antígeno compatible.

20 17. - Un procedimiento para purificar antígeno protector
B. pertussis y para preparar una vacuna a partir del mismo.

Esta memoria consta de catorce páginas, escritas por una so-
la cara.

BARCELONA, 4 de febrero, 1966.

P. A.