

P.-42.762

PW 5874 A

37 1043

37 1843

Memoria descriptiva



para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

a nombre de DIETMAR JACHERZ

SECCION TECNICA

CLASIFICACION I. P. C.

CLASE C-12 A61

SUBCLASE K K

entidad/ de nacionalidad alemana

con domicilio en Friedbühlerstr 51, Institut für Hygiene und
Mikrobiologie der Universität Bern., Berna,
Suiza.

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA VACUNA"
(Clase Internacional C12k A61k)

Actualmente, para la inmunización activa se utilizan las denominadas vacunas muertas, que contienen gérmenes inactivados, o las denominadas vacunas vivas, que contienen gérmenes no virulentos. Además de estos se utilizan, en calidad de vacunas, toxoides (toxinas de bacterias desprovistas de toxicidad) así como subunidades de virus. Estas vacunas usuales plantean grandes exigencias en cuanto al cuidado del fabricante. En las vacunas muertas se debe vigilar cuidadosamente la inactivación, ya que una inactivación insuficiente del antígeno natural puede conducir a efectos secundarios indeseables en el individuo vacunado, pero, por otra parte, por la inactivación se puede modificar o dañar al antígeno natural hasta un cierto grado. También una atenuación insuficiente de los virus en vacunas a base de virus susceptibles de reproducción podría tener repercusiones imprevisibles. En la preparación de vacunas son necesarios, por lo tanto, costosos, largos y caros controles. A pesar de ello, se han descrito reacciones de incompatibilidad.

Estas desventajas pueden ser superadas, de acuerdo con el invento, utilizando, para la inmunización activa, no el antígeno propiamente dicho, sino una denominada "proteína reguladora". Esta proteína reguladora fué descubierta sorprendentemente en estudios sobre la síntesis de anticuerpos en células inmunológicamente idoneas. De modo muy resumido se pueden explicar los procesos que transcurren en este caso de la siguiente manera:

Si se estimulan macrófagos con un antígeno, estas células sintetizan un ácido ribonucleico (ARN), que puede ser transferido sobre células linfáticas y provoca a és-

21 Oct. 1969



tas para la síntesis de anticuerpos. El ARN contiene la información para la secuencia de aminoácidos del anticuerpo que se ha de formar, y por lo tanto será denominado en lo que sigue "ARN" informativo".

5 Los anticuerpos formados por él tienen las siguientes propiedades:

a) Son específicos en cuanto al antígeno, es decir son homólogos con el antígeno ofrecido a los macrófagos en lo que se refiere a su especificidad inmunológica.

10 b) Poseen las mismas características alotípicas que el donante de los macrófagos.

El ARN informativo es específico en cuanto a la especie, es decir puede ser transferido con éxito solo dentro de la misma especie. Una transferencia de una especie a otra no conduce a la síntesis de anticuerpos.

15 Por lo tanto, si se aísla el ARN informativo desde células de un individuo A y se suministra este ARN a células linfáticas de otro individuo B de la misma especie, estas últimas forman en primer lugar anticuerpos con las características alotípicas del individuo A (= anticuerpos extraños específicos para el individuo). Sin embargo, después de algún tiempo sintetizan anticuerpos con las características alotípicas del individuo B (= anticuerpos propios específicos para el individuo). Este cambio de la producción de anticuerpos extraños específicos para el individuo a la formación de anticuerpos propios específicos para el individuo tiene lugar mediante un proceso de cambio o desplazamiento, que es gobernado por la proteína reguladora. La proteína reguladora es una subunidad del anticuerpo formada en células linfáticas por el

17-10-69

371843



ARN informativo.

Según esto, el objeto del invento es un procedimiento para la preparación de una vacuna, el cual está caracterizado por que en un sistema libre de células se sintetizan anticuerpos y proteína reguladora mediante ARN informativo, se aísla la proteína reguladora, se esteriliza ésta y se mezcla eventualmente con un coadyuvante. El objeto del invento es además la vacuna obtenida de acuerdo con este procedimiento.

Ya se ha propuesto inmunizar macroorganismos con ARN informativo. Ensayos correspondientes se han llevado a cabo, por ejemplo, con ratones, cobayas y monos. En estos casos, se debieron desarrollar en el organismo, sin embargo, las siguientes etapas:

- 1.- Reacción de un ARN extraño específico para el individuo.
- 2.- Síntesis de anticuerpos extraños específicos para el individuo.
- 3.- Síntesis de proteína reguladora.
- 4.- Síntesis de ARN propio específico para el individuo.
- 5.- Síntesis de anticuerpos propios específicos para el individuo.

En la inmunización de acuerdo con el invento, en la cual se utiliza para la inmunización la proteína reguladora propiamente dicha, desaparecen las etapas 1 a 3 en el macroorganismo. De esta manera, es posible una inmunización muy rápida e inofensiva. Hasta ahora no son conocidos procedimientos para la preparación de vacunas que representen una proteína reguladora libre de antígenos.



5 El ARN informativo puede obtenerse por estimulación de un cultivo de células inmunológicamente idoneas, o de un sistema libre de células a base de células inmunológicamente idoneas con antígenos. Como "células inmunológicamente idoneas" se han de entender aquellas células que son capaces de reaccionar a un estímulo primario de antígeno con la formación de ARN informativo. Las células idoneas se encuentran en la linfa, en los ganglios linfáticos, en el bazo, en exudaciones, - por ejemplo en la exudación peritoneal - y especialmente entre los leucocitos de la sangre periférica. Las células pueden ser de procedencia humana o animal, según que la vacuna obtenida de acuerdo con el invento deba tener utilización en hombres o en animales. Para la preparación de una vacuna para una determinada especie se partirá, por lo tanto, convenientemente de células inmunológicamente idoneas de esta especie en cuestión.

10 Para la estimulación del material de células inmunológicamente idoneas se utilizan antígenos y toxinas a base de bacterias, virus o de sus subunidades así como veneno de serpiente. En calidad de sustancias de partida bacterianas se pueden citar por ejemplo toxinas de tétano y de difteria, y además los productos de metabolismo o de descomposición de Bordetella pertussis, Mycobacterium tuberculosis así como de Salmonellas, Shigellas, Brucellas y Estreptococcus; virus y sus subunidades son, por ejemplo, virus de influenza, hemaglutinina de influenza, virus de polio o sus envoltentes proteínicas, virus de sarampión, de rabia, de fiebre aftosa, de viruela, de peste porcina, de moquillo, de heptatitis contagiosa canis, así como de encefalitis.

371843



Si para la obtención del ARN informativo se parte de un sistema celular, se puede proceder de la siguiente manera:

5 Un cultivo de células inmunológicamente idoneas (por ejemplo leucocitos humanos) es estimulado con una dosis óptima, que ha de ser determinada previamente, del antígeno (generalmente una partícula de antígeno por cada 100 células), y es incubado a aproximadamente 37°C durante 5 a 60 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 20 minutos. Después, el cultivo de células es enfriado con rapidez hasta al menos 0°C y es lavado. A partir de las células lavadas se aísla el ARN informativo según procedimientos conocidos, por ejemplo mediante fenol, de modo que esté libre de proteínas y nucleasas.

15 Si se parte de un sistema libre de células, se procede ventajosamente de la siguiente manera:

Células lavadas inmunológicamente idoneas (por ejemplo leucocitos humanos o animales procedentes de la sangre periférica) son recogidas en una solución tamponada con una molaridad 0,01 a 0,15, preferiblemente aproximadamente 0,1, de valor de pH 7,6 a 8,6, preferiblemente de aproximadamente 7,8. El más apropiado es un tampón de tris/ácido maleico o de tris/HCl. Las células son destruídas por congelación y descongelación repetidas, y el producto homogeneizado de células es centrifugado durante 20 aproximadamente 30 minutos con una aceleración de 30.000 veces la aceleración de la gravedad, y a 0°C o por debajo de 0°C. El líquido flotante obtenido después de la centrifugación es el sistema libre de células que contiene 25 todas las sustancias solubles de las células. A continua

5 ción, se estimula con una dosis óptima de un correspondiente antígeno y se incuba durante 2 a 60 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 10 minutos, a aproximadamente 37°C. El posterior tratamiento se realiza como anteriormente.

Para la preparación de la proteína reguladora se procede de la siguiente manera.

10 Un sistema libre de células preparado como anteriormente es incubado juntamente con ARN informativo durante 10 a 60 minutos, preferiblemente durante 40 minutos, a 37°C. A continuación, toda la carga es centrifugada con una aceleración de 100.000 veces la de la gravedad durante 15 horas, a través de un gradiente de 5 a 25% de sacarosa. La expresión "gradiente" indica que la concentración de la sacarosa disminuye desde el fondo del recipiente de centrifuga continuamente hacia arriba, a saber desde 25 hasta 5%. Sobre este gradiente se coloca una capa de la solución de proteína. Las proteínas sedimentan al centrifugar, según su coeficiente de sedimentación, a diferente distancia en dirección hacia el fondo del recipiente de centrifuga. Después de la centrifugación, el recipiente es perforado por abajo y el contenido es recogido fraccionadamente. El gradiente de concentración de la sacarosa impide en este caso un mezclado de las fracciones de proteína. Las diversas fracciones son ensayadas a continuación en cuanto a su capacidad de poner en marcha la síntesis de anticuerpos. Para esto se hace uso de un sistema de ensayo, que es preparado de la siguiente manera:

30 Una suspensión de células a base de células inmunológicamente idoneas, por ejemplo leucocitos, células de

371843



21

bazo o células de exudaciones peritoneales, es congelada, el bloque de hielo es desmenuzado y descongelado. La suspensión resultante es centrifugada durante 30 a 60 minutos con una aceleración de 30.000 veces la de la gravedad, el sedimento que contiene los residuos celulares, es desechado, y el líquido flotante es centrifugado durante 3 a 4 horas con una aceleración de 100.000 veces la gravedad. El líquido flotante obtenido de este modo es ajustado a pH 5,0, separándose un precipitado que es separado por centrifugación y es disuelto en un tampón de tris de pH 7,8. En la solución, que es designada como "fracción de pH 5", están contenidas las enzimas y materiales básicos, que son consumidos para la constitución de los anticuerpos.

15 El sistema de ensayo consta de fracción de pH 5 y de ADN, que se puede obtener de acuerdo con Kirby (Isolation and fractionation of nucleic acids, en Davidson y Cohn, "Progress in nucleic research and molecular biology", volumen 3, Academy Press 1964, Nueva York, Londres).

20 Las fracciones que son capaces de excitar o activar la síntesis de anticuerpos en este sistema de ensayo, contienen la proteína reguladora. Son esterilizadas y mezcladas eventualmente con un agente coadyuvante (por ejemplo hidróxido de aluminio). El producto constituye 25 la vacuna acabada.

De acuerdo con el procedimiento del invento se pueden obtener vacunas contra todos los agentes patógenos o gérmenes de enfermedad o venenos citados en la descripción. Su administración tiene lugar por inyección. Para 30 una protección de vacuna segura son suficientes 10^{-4} μ g

371843



por kg de animal; las cantidades necesarias se encuentran por lo tanto varias potencias decimales por debajo de las necesarias para una vacunación tradicional.

Ejemplos.

5 1) Por estimulación de un sistema libre de células a base de células inmunológicamente idoneas de ratones mediante hemaglutinina de virus de influenza, se forma un ARN informativo y se le hace actuar sobre un sistema libre de células a base de células inmunológicamente

10 idoneas de ratones. La proteína reguladora formada de este modo es aislada de la manera descrita y es inyectada intraperitonealmente a ratones no tratados. A intervalos de dos días se extrae sangre de los ratones y se determina la concentración de anticuerpos. Ya 2 días después de

15 la aplicación de la proteína reguladora se pudieron encontrar anticuerpos en la sangre de los ratones. La determinación con la sangre de animales testigo dió resultados negativos.

20 2.- De manera análoga se obtiene una proteína reguladora para la síntesis de ARN informativo, que inicia la formación de anticuerpos contra hemaglutinina de sarampión en cobayas, y es inyectada intraperitonealmente a cobayas no tratados. A intervalos de 2 días se extrae sangre de los cobayas y se determina la concentración de anticuerpos. Ya 2 días después de la aplicación de la proteína reguladora se pudieron encontrar anticuerpos en la

25 sangre de los cobayas, pero por el contrario no se pudieron encontrar en la sangre de los animales testigo.

30 3.- De manera análoga se obtiene una proteína reguladora para la síntesis de ARN informativo, que inicia la

formación de anticuerpos contra hemaglutinina de influenza en monos, y es inyectada intraperitonealmente a monos no tratados. A intervalos de 2 días se extrae sangre de los monos y se determina la concentración de anticuerpos. Ya 2 días después de la aplicación de la proteína reguladora se pudieron encontrar anticuerpos en la sangre de los monos. En los animales testigo no se pudo comprobar ningún anticuerpo.

4.- La proteína reguladora obtenida según el Ejemplo 1 para la síntesis de ARN informativo, que inicia la formación de anticuerpos contra hemaglutinina de virus de influenza en ratones, es inyectada intraperitonealmente a ratones no tratados. 8 días después de la aplicación de la proteína reguladora se lleva a cabo con estos ratones un ensayo de carga. Los ratones se mostraron como inmunes después de la carga con virus de influenza virulento. Por el contrario, los animales testigo sucumbieron a la infección de carga.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en República Federal Alemana, con fecha 25 de Septiembre de 1.968, bajo el N° P 17 92 609.9, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de



17 EN

Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1.- Procedimiento para la preparación de una vacuna, caracterizado porque en un sistema libre de células, que comprende células inmunológicamente competentes, se sintetizan anticuerpos y proteína reguladora por medio de ácido ribonucleico informativamente activo, porque a partir de estas sustancias se aísla la proteína reguladora por medio de métodos físico-químicos conocidos, y porque la proteína reguladora aislada se esteriliza y, eventualmente, se combina con un coadyuvante.

2.- Procedimiento para la preparación de una vacuna.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

La presente Memoria consta de once hojas, escritas a máquina por una sola cara.

17 EN

Madrid,

P.A.

[Handwritten signature]
Por [illegible]

371843