

400957

30



SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE _____
CLASE _____

P.- 50.405
U.S. Serial
No 126.933

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

A nombre de COLGATE-PAIMOLIVE COMPANY

entidad norteamericana

Int. Cl.²: C12K//A61K

con domicilio en 300 Park Avenue, Nueva York, Nueva York,
Estados Unidos de América.

por: "UN METODO DE FABRICACION DE UNA VACUNA PARA INMUNIZACION CONTRA LA CARIES DENTAL"

(Clase Internacional A61k, C12d)

400957



Esta invención se refiere a la prevención de la caries dental y a composiciones útiles para ello. Más particularmente, se refiere a la provisión de una vacuna útil para la inmunización contra la caries dental, a métodos para producir la vacuna y a métodos de inmunización. Específicamente, se refiere a la formación de una vacuna partiendo del microorganismo Streptococcus SS2 que produce caries y a su empleo en la inmunización de caries.

10 Se ha indicado durante la última década, de un modo u otro, que la formación de lesiones de caries en los dientes es el resultado de una reacción entre hidratos de carbono, en especial sacarosa, y bacterias específicas, sobre la superficie del diente. Se han descubierto una diversidad de organismos específicos que son los agentes etiológicos de esta enfermedad infecciosa, entre los cuales son notables los Streptococci. Se han aislado diversos Streptococci de la cavidad oral y se ha descubierto que ocasionan caries dental en animales de experimentación.

20 En el curso de la experimentación en este campo, se han efectuado varios intentos para proporcionar una técnica inmunológica contra la formación de caries dental pero todavía no se ha encontrado un método adecuado. Por ejemplo, M. Wagner describió en una tesis doctoral

400957



(Ph.D.) en 1966, de la Universidad de Purdue, la inmunización de ratas exentas de gérmenes contra la caries dental utilizando una vacuna preparada a partir de una capa de Streptococcus faecalis. En 1960 W.H. Bowen describió en J. Br. Dent. Res., Vol. 126, páginas 159-160, el empleo de un organismo que produce caries y que origina dextrán, en forma de células totales viables para inmunizar monos contra la caries dental. El organismo empleado fué una capa de Streptococcus mutans una de dos bacterias consideradas extensamente como los agentes causantes de la formación de la caries dental. El otro organismo es una capa de Streptococcus caracterizada como Cepa de Streptococcus SS2 aislada por Gibbons y Banghart y descrita en Archives of Oral Biology, 1967, Volumen 12, páginas 11-24. Este organismo se encuentra ampliamente disponible en muchos laboratorios en todos los Estados Unidos, en especial en el Forsyth Dental Center, Boston, Massachusetts, y se aísla fácilmente de la cavidad oral, en especial de la caries dental, utilizando técnicas convencionales.

El Streptococcus mutans y la Cepa de Streptococcus SS2 son organismos inequívocamente diferentes uno de otro. Una de estas diferencias se manifiesta en el comportamiento fisiológico del organismo en presencia de sacarosa. Cada uno de ellos, el Streptococcus mutans y la Cepa de Streptococcus SS2, producen un polisacárido extra-

400957



celular pegajoso, semejante a goma, cuando se cultivan en presencia de sacarosa. Sin embargo, los polisacáridos producidos no son el mismo para cada organismo, a pesar de que se piensa en general que dichos organismos están verdaderamente implicados en la formación de la placa que comienza la formación de lesiones de caries. El Streptococcus mutans elabora predominantemente un polisacárido de dextrán mientras que la Cepa de Streptococcus SS2 elabora predominantemente un polisacárido de leván.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que el polisacárido de leván producido por la Cepa de Streptococcus SS2 tiene propiedades poderosas de inmunización contra la formación de la caries dental. La presente invención, por ello, está relacionada con el uso de un microorganismo que produce leván para preparar una vacuna y para procedimientos de inmunización. Se aprecia que la introducción de la sustancia leván en el huésped ocasiona la formación de anticuerpos contra el organismo etiológico Streptococcus y da como resultado una disminución de la incidencia de lesiones de caries respecto a las producidas cuando no se utiliza el procedimiento de inmunización. El mecanismo preciso mediante el que los anticuerpos inactivan el organismo no es totalmente conocido. Sin embargo, se aprecia una mejora significativa en el control de la producción de caries cuando se sigue el



concepto de la invención, independientemente del mecanismo particular que se considere implicado.

Según la presente invención se cultiva una cepa de Streptococcus que produce leván, preferiblemente la Cepa de Streptococcus SS2, para permitir la formación de polisacárido de leván extracelular. Esto se consigue cultivando el organismo en condiciones anaerobias en un medio nutritivo que contiene sacarosa, durante un período de tiempo suficiente para permitir la acumulación extracelular del polisacárido de leván, como se describe más adelante.

Como medio para cultivar el microorganismo, se emplea un medio que contiene sacarosa como fuente de carbono. Otras fuentes de carbono se mantienen, preferentemente, en un mínimo. La cantidad de sacarosa presente está comprendida adecuadamente entre 2 y 16 y de preferencia entre 5 y 8% en peso basado en el medio total. El medio contiene, además, una fuente adecuada de nitrógeno. Por ejemplo, puede estar presente una fuente de nitrógeno natural tal como peptona, extracto de carne, extracto de levadura, caldo de soja o semejante. También pueden utilizarse fuentes de nitrógeno inorgánico tales como sulfato amónico, cloruro amónico, nitrato amónico y semejantes. Además, pueden encontrarse presentes en cantidades adecuadas sales inorgánicas tales como fosfatos, sales de

400957

30



magnesio tales como sulfato magnésico; iones de metales
tales como hierro, sodio, potasio, manganeso, zinc, cal-
cio y semejantes y aniones tales como cloruros y nitratos.
Se emplea según sea necesario, cualquier otra sustancia
5 nutritiva necesaria para el crecimiento de los Streptoco-
cci.

El cultivo se lleva a cabo en condiciones
anaerobias utilizando métodos convencionales. La tempera-
tura de cultivo es de 35 a 38°C, preferiblemente 37°C y
10 el pH de cultivo es de 6,8 a 7,4, preferiblemente de 7,0
a 7,2. El tiempo de cultivo es, habitualmente, de 12 a 72
horas y preferiblemente de 24 a 48 horas durante cuyo tiem-
po se forma una cantidad suficiente de polisacárido de le-
ván extra celular en el medio de cultivo.

15 Al preparar la vacuna de la presente inven-
ción, el polisacárido de leván puede suministrarse en for-
ma del propio líquido de cultivo, preferiblemente después
de separar las células, o pueden utilizarse las propias cé-
lulas muertas. Sin embargo, se prefiere aislar y recuperar
20 la sustancia de leván en forma relativamente pura para uti-
lizarla como principio activo en la vacuna. Por ejemplo,
el polisacárido de leván puede recuperarse del medio de
cultivo mediante cualquiera de las maneras conocidas en
la técnica. Un método particularmente adecuado implica pre-
25 cipitar el leván de las aguas madres del medio de cultivo

400957



desprovistas de células, añadiendo a las mismas un alcohol tal como el etanol. Es adecuado, habitualmente, de 1,5 a 2 volúmenes de etanol. En este punto es deseable, aun cuando no es necesario, separar la fracción del polisacárido de peso molecular bajo. Esto puede conseguirse mediante diálisis o cualquier otro método conveniente. A este respecto, el leván tiene normalmente un peso molecular comprendido entre 16 y 23 millones estando comprendido de 0,25% a 0,5% aproximadamente en el intervalo de peso molecular inferior de 2000 a 5000. Esta fracción es la que se separa deseablemente por diálisis.

Después de esto, el polisacárido se trata preferiblemente para eliminar las proteínas residuales. También esto puede conseguirse mediante cualquier método conveniente conocido en la técnica pero se ha encontrado que es especialmente adecuado utilizar el método de Sevag y otros, Journal of Biological Chemistry, Vol. 124, páginas 425-435, 1938.

Este método lleva consigo el empleo de cloroformo y butanol o un alcohol tal como isopropanol, hexanol o semejante para disolver las proteínas. El leván así purificado puede volver a precipitarse entonces por ejemplo con más etanol, lavarse y secarse. Después está listo y disponible para emplear en la preparación de la vacuna de la presente invención.

400957



El leván preparado según la realización preferida de esta invención, es decir donde el producto de peso molecular inferior se separa del producto de peso molecular superior, y se desproteíniza el producto de peso molecular mayor, es eminentemente útil como sustancia de vacunación. Aun cuando esta sustancia no ha sido caracterizada en lo que respecta a la fórmula estructural, ha sido caracterizada en cuanto a su absorción infrarroja y composición química general. Los picos característicos se encuentran en 920 cm^{-1} , 875 cm^{-1} y 805 cm^{-1} .

Cuando el leván se hidroliza mediante ácidos, el hidrolizado muestra sólo fructosa como monómero mediante análisis cromatográfico. Además, el leván de la invención tiene las siguientes características físicas.

15	Viscosidad intrínseca	
	a 25°C	- 0,15 a 0,16
	Rotación $\frac{[\alpha]_D^{20}}$	- 43° a 54°
	Hexosa total	- 98,4%
	Nitrógeno protéico	- Menos de 0,5 %.

20 Las vacunas de la presente invención son soluciones o emulsiones líquidas, preferiblemente acuosas, que contienen de 0,1 a 1 y preferiblemente de 0,4 a 0,6 gramos de leván por litro de líquido, siendo las cantidades de leván relativas a la forma purificada. El
25 vehículo líquido es preferiblemente solución salina es-

400957



téril modificada de la manera más conveniente por coadyu-
vantes tales como el coadyuvante de Freund o semejante,
obteniéndose en este último caso emulsiones. El coadyu-
vante de Freund cuando se emplea lo es en la proporción
5 de uno a uno, adecuadamente. Como sales isotónicas pueden
emplearse las sales normales utilizadas para preparar so-
luciones salinas, tales como los cloruros de sodio y po-
tasio.

Como se ha indicado anteriormente, en lu-
10 gar del leván, purificado o sin purificar, pueden emplear
se células muertas de la Cepa de Streptococcus SS2. Son
especialmente adecuadas las células muertas con formali-
na, es decir, células formalinizadas. El coadyuvante de
Freund se emplea también convenientemente, con indepen-
15 dencia de la fuente particular del leván. Cuando se uti-
lizan células muertas, deben emplearse suficientes célu-
las como las que pueden dar una cantidad de leván com-
prendida dentro de los intervalos anteriores indicados.
Típicamente, esto corresponderá a $0,5 \times 10^7$ a 4×10^7 y pre-
20 feriblemente a 1×10^7 a 2×10^7 células por mililitro de so-
lución. Pueden emplearse cantidades más bajas cuando se
administran dosis de refuerzo después de la primera ino-
culación. Similarmente, si se emplea leván sin purifi-
car, la cantidad de tal sustancia utilizada debe ser su-
25 ficiente para proporcionar una cantidad eficaz de la sus-

400957



tancia sobre base pura, según se ha indicado anteriormente en los intervalos mostrados.

Las vacunas de la invención pueden administrarse mediante cualquier técnica empleada habitualmente, tal como por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa y semejante. Se emplean adecuadamente dosis que ascienden a 1 - 20 microgramos y preferiblemente a 5 -10 microgramos de leván por kilogramo de peso. Pueden administrarse dosis de refuerzo de vez en cuando, según sea necesario.

Se proporcionan los ejemplos siguientes para ilustrar realizaciones preferidas de la presente invención.

Ejemplo 1

	Nº	Dieta que produce caries.	Depresión de la flora con antibióticos	Inoculación de Streptococcus	Inmunización por células de Strep. formalinizadas.
20	Grupo I	10 Mitchell	No	No	No
	Grupo II	10 Mitchell	Si	Si	No
	Grupo III	10 Mitchell	Si	Si	Si

Treinta hamsters dorados recién destetados y encamados, procedentes de las colonias del National Ins-

400957



titute of Health; se distribuyeron en tres grupos equi-
librados. En todos los casos los animales recibieron la
dieta que produce caries de Mitchell y agua desionizada.
El grupo I, el grupo testigo, recibió sólo la dieta de
5 Mitchell.

La flora gram positiva normal de los hams-
ters en los Grupos II y III se hace disminuir en el des-
tete incorporando 100 unidades de penicilina por gramo
de dieta de Mitchell, durante un periodo de cuatro días
10 consecutivos. El quinto día se dejó de administrar el an-
tibiótico y los animales de los Grupos II y III fueron
inoculados, en la zona del abazón, con 0,1 mililitros de
un cultivo de 18 horas de un mutante resistente a la
estreptomina de la Cepa de Streptococcus SS2 que forma
15 leván. Se utilizó una cepa resistente a la estreptomici-
na sólo por razones experimentales, es decir, para permi-
tir la verificación subsiguiente del procedimiento de
inoculación por recogida de los organismos en ágar de
estreptomina y Mitus Salivarius.

20 La Cepa de Streptococcus SS2 utilizada en
esta Memoria, se obtuvo del Dr. R.J. Gibbons del Forsyth
Dental Center, Boston, Massachusetts. Está depositada
en la American Type Culture Collection, Maryland, y lle-
va el N° de registro de la ATCC, 27006. El organismo se
25 mantuvo en medio de Soja y Trypticasa sin glucosa (BBL)

400957



5 suplementado con 0,5% de sacarosa a 37°C a un pH de 7,2. La sacarosa se esterilizó en autoclave por separado y se añadió asépticamente al medio. El organismo se cultivó en condiciones anaerobias en un recipiente anaerobio BBL en una atmósfera de 90% de hidrógeno y 10% de dióxido de carbono a 37°C.

10 El mismo día de la inoculación, los animales del Grupo III fueron inmunizados mediante una inyección intraperitoneal con 0,5 mililitros de una vacuna que contenía células muertas con formalina en coadyuvante de Freund completo, en la proporción uno a uno. Esta inyección era equivalente a la administración de 1×10^7 organismos. La vacuna para la inmunización se preparó de la siguiente manera : Se dejaron crecer los organismos en 15 condiciones anaerobias durante 18 horas en medio de Soja y Tripticasa que contenía 0,5 por ciento de sacarosa y 100 µg por mililitro de estreptomycin. La suspensión de células lavada con solución salina se sometió a la acción de ultrasonidos al objeto de romper las cadenas. Esta 20 acción de ultrasonidos que se llevó a cabo antes de matar las células, fue efectuada mediante un aparato de ultrasonidos de Raytheon a 0,65 amps. durante 5 minutos. La suspensión se ajustó con solución salina para que diera una densidad óptica de 0,22 a 610 milimicras con un 25 colorímetro Bausch y Lomb. Las células se suspendieron



400957

después en formalina al 0,6% durante la noche para matarlas eficazmente.

Se administraron cuatro inyecciones adicionales con intervalos de dos semanas aproximadamente, con concentraciones decrecientes de los organismos formalinizados (desde 1×10^6 hasta 2×10^4) en los coadyuvantes. Después de un periodo de 12 semanas, los animales fueron sacrificados y se recogieron muestras de saliva y de suero de cada grupo para la titulación de anticuerpos. Los anticuerpos del suero y de la saliva se compararon frente a un extracto salino de Cepa de Streptococcus SS2 y leván obtenido de ésta, y se puso de manifiesto que se había obtenido en el suero y en la saliva una respuesta de anticuerpos adecuada, en el grupo de animales inmunizados.

Las cabezas de los animales fueron descarnadas después mediante el conocido método de Russell y se valoró la caries dental mediante una modificación del método de Keyes. Se utilizaron el segundo y tercer molares maxilares en el procedimiento de valoración de la caries. Un animal del Grupo I, el grupo testigo, y dos animales del Grupo II murieron durante el transcurso del estudio por razones que no tenían relación con los procedimientos experimentales. Los resultados de la caries dental se presentan seguidamente :

25

25-3-72

400957

30



	<u>Valores promedio de caries</u>	<u>% de cambio</u>
Grupo I	26,89	
Grupo II	37,66	-40,05%
Grupo III	12,18	-67,66%

5

De los resultados anteriores puede apreciarse que el procedimiento de la invención es eminentemente eficaz para hacer disminuir la incidencia de caries dental. Los animales del Grupo II, inoculados con el microorganismo que produce caries, muestran un aumento de más del 40% en la incidencia de caries sobre los del grupo testigo (Grupo I) que no recibieron microorganismos productores de caries. Ambos grupos, así como el Grupo III, se mantuvieron en dietas que producen caries.

10

15

El grupo inmunizado, tratado (Grupo III) muestra, por otra parte, una reducción de más del 67% en la incidencia de la caries dental sobre el Grupo II, demostrando así que el procedimiento de inmunización había sido sumamente eficaz. Desde el punto de vista estadístico, los resultados anteriores son significativos al nivel de confianza de 99%.

20

Ejemplo 2

Preparación de leván

25

Se cultivó en condiciones anaerobias Cepa

400957



de Streptococcus SS2 en medio de Soja y Tripticasa sin glucosa (Baltimore Biological Laboratories-BBL) suplementado con 8 por ciento de sacarosa, durante 48 horas en una atmósfera de 90% de hidrógeno y 10% de dióxido de carbono y temperatura de 37°C y un pH de 7,2. Los organismos se centrifugaron después a 10.000 rpm en una centrífuga Sorvall refrigerada, durante 10 minutos con una cabeza SS-34. El polisacárido de leván se precipitó de la capa sobrenadante mediante dos volúmenes y medio de etanol de 95%. La goma precipitada se redisolvió en agua y se desproteinizó después repetidamente por adición de 0,25 volúmenes de cloroformo y 0,1 volúmenes de alcohol amílico a la solución de polisacárido. La mezcla se agitó durante 15 minutos. La capa acuosa que contenía el polisacárido de leván se dializó frente a agua destilada durante 24 horas al objeto de separar las fracciones de bajo peso molecular.

El polisacárido de leván procedente de la capa acuosa se volvió a precipitar por adición de etanol y se convirtió en una suspensión de polvo fino. El leván, ahora purificado, se recogió en un embudo de Büchner sobre un papel de filtro lavado a los ácidos (Whatman 52), se lavó con etanol absoluto, acetona y éter de petróleo, y se hizo pasar inmediatamente a un desecador.

25

25-3-72

400957



Ejemplo 3

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 1, con la excepción de que los animales del Grupo III, en lugar de ser vacunados con células formalinizadas de la Capa de Streptococcus SS2 se inmunizaron con 0,5 mililitros de una solución que contenía 500 microgramos de leván por mililitro de solución salina en coadyuvante de Freund en la proporción uno a uno. El leván utilizado se obtiene según el procedimiento indicado en el Ejemplo 2 anterior. Después de la primera inoculación de la vacuna de leván, se administraron cuatro inyecciones adicionales a intervalos de dos semanas a partir de la primera inyección, utilizando 0,5 mililitros de la solución de leván utilizada en la primera inoculación. La extensión de la caries dental producida en este grupo, comparada con la de los dos grupos citados en el Ejemplo 1, fué valorada y comparada entonces, según el procedimiento indicado en el Ejemplo 1. Como resultado de la inmunización, los valores de caries dental para el Grupo III son los siguientes :

	<u>Valores promedios de caries</u>	<u>% de cambio</u>
Grupo III	11,2	- 70%

De lo que antecede puede verse que los animales del Grupo III inmunizados con leván puro muestran

400957

una disminución de 70% en la incidencia de caries sobre los animales del Grupo II indicados en el Ejemplo 1. Esto demuestra una vacuna de inmunización muy eficaz, por supuesto. Los resultados anteriores son significativos al nivel de confianza del 99% desde el punto de vista estadístico.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 22 de Marzo de 1.971, bajo el Nº 126.933, 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 esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

- 1.- Un método de fabricación de una vacuna



400957

30 MAR 1972



para inmunización contra la caries dental que comprende añadir un polisacárido de leván que procede de un cultivo anaerobio de una cepa que produce leván del género Streptococcus, a un vehículo líquido.

5

2.- Un método de fabricación de una vacuna según la reivindicación 1, en el que dicho vehículo es un vehículo salino acuoso.

10

3.- Un método de fabricación de una vacuna según la reivindicación 1, en el que la cepa de Streptococcus corresponde a la Cepa de Streptococcus SS2.

15

4.- Un método de fabricación de una vacuna según la reivindicación 3, en el que el leván se suministra en forma de células muertas de la Cepa de Streptococcus SS2.

20

5.- Un método de fabricación de una vacuna según la reivindicación 3, en el que el leván tiene un peso molecular comprendido entre 16 y 23 millones.

6.- Un método de fabricación de una vacuna según la reivindicación 5, en el que el leván está presente en solución en cantidad de 0,1 a 1 gramo por litro de solución.

25

7.- Un método de fabricación de una vacuna según la reivindicación 5, en el que el leván está presente en solución en cantidad de 0,4 a 0,6 gramos por litro de solución.



30 MAR 1972

400957

8.- Un método de fabricación de una vacuna según la reivindicación 3, en el que el leván tiene picos característicos de absorción en el infrarrojo a 920 cm^{-1} , 875 cm^{-1} y 805 cm^{-1} , una viscosidad intrínseca a 25°C comprendida entre 0,15 y 0,16 y una rotación $[\alpha]_D^{20}$ de 43° a 54° .

9.- Un método de fabricación de una vacuna según la reivindicación 3, en el que el leván se produce cultivando de forma anaerobia la Cepa de Streptococcus SS2 en presencia de sacarosa a una temperatura de 35 a 38°C y un pH de 6,8 a 7,4.

10.- Un método para inmunizar un huesped contra la formación de caries dental, que comprende administrar a un huesped susceptible a la caries dental, una cantidad eficaz de un polisacárido de leván procedente del cultivo anaerobio de la Cepa de Streptococcus SS2 bajo condiciones que producen leván.

11.- Un método según la reivindicación 10, en el que la cantidad de leván administrada corresponde a 1 - 20 microgramos de leván por kilogramo de peso del huesped.

12.- Un método de fabricación de una vacuna para inmunización contra la caries dental.

25

25-3-72

- 19 -



400957

30



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

Esta Memoria consta de veinte hojas escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid, 30 MAR 1972

P.A.

10

Alberto de Ezaguzo
For Poder

15

20

25

RMM
25-3-72

- 20 -

