

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
 Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

10 ES 11 21 22	NUMERO <b>474611</b> 10 AI
	FECHA DE PRESENTACION <b>27 OCT. 1978</b>

**PATENTE DE INVENCION**

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO 846.466 846.488	32 FECHA 28 de octubre de 1.977 22 de diciembre de 1.977	33 PAIS Norteamérica.- Norteamérica.-
--	--	---

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL <i>C12K/A6AK</i>	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION  
 PROCEDIMIENTO PARA AISLAR Y PURIFICAR FOSFATO DE POLIRIBOSIL RIBITOL  
 INMUNOLOGICAMENTE ACTIVO.-

71 SOLICITANTE (S)  
 AMERICAN CYANAMID COMPANY.-

DOMICILIO DEL SOLICITANTE  
 Wayne, State of New Jersey, EE.UU. de A.-

72 INVENTOR (ES)  
 JOSEPH S.-G. KUO.-

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE  
 Don JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO POMBO.-

La presente invención se relaciona con vacunas para la inmunización contra infecciones de Haemophilus influenzae tipo b tal como meningitis. Más específicamente, la presente invención se relaciona con: (1) un método para la aislación del polisacárido antigéno fosfato de poliribosil ribitol (FPR) a partir de cultivos de Haemophilus influenzae tipo b; y, (2) un procedimiento para la preparación de una vacuna combinada que contiene antígenos de FPR y B. pertussis. El FPR de la presente invención también deben ser efectivos cuando se utiliza en combinación con otras cepas no patógenas de bacterias, tales como E. coli, B. subtilis, S. aureus, B. punilus y L. plantarum, para descargar una respuesta de anticuerpo en animales de sangre caliente.

El fosfato de poliribitol purificado (FPR) a partir de Haemophilus influenzae tipo b está siendo investigado como un inmunógeno protector. Sin embargo, no se ha logrado una respuesta antigéna activa en animales jóvenes e infantes. El método del arte anterior para la purificación empleaba etanol y Cetavlon (bromuro de hexadeciltrimetil amonio). Los contaminantes, endotoxinas, y sustancias pirógenas eran eliminadas mediante el uso de fenol frío o cloroformo y t-butanol que puede resultar en la pérdida de la naturaleza antigéna de este polisacárido.

Ahora se ha establecido un nuevo procedimiento para la aislación y purificación de FPR inmunológicamente activo a partir de Haemophilus influenzae tipo b.

El procedimiento ha ser descripto tiene ventajas particulares sobre los procedimientos del arte anterior y que todos los contaminantes (ácidos nucleicos, proteínas y endotoxinas) son eliminados hasta el nivel mínimo mediante un tratamiento

con hidroxilapatita. El FPR preparado mediante el procedimiento aquí descrito proporciona un polisacárido de superior peso molecular que aquellos registrados anteriormente.

5. Más importante, el FPR preparado mediante este nuevo procedimiento es altamente inmunógeno en animales de sangre caliente en contraposición con el FPR producido mediante procedimientos del arte anterior.

10. Un procedimiento para la eliminación de contaminantes (proteínas, ácidos nucleicos y endotoxinas) en el polisacárido FPR se realiza tratando el polisacárido parcialmente purificado con un absorbente que contiene fosfato que no absorbe el polisacárido bajo condiciones designadas.

15. El segundo objeto de la presente invención es proveer un proveer un procedimiento para la preparación de una vacuna combinada de FPR y pertussis que es altamente inmunógena en animales jóvenes.

(I) Aislación y purificación de fosfato de polirribosil ribitol, el polisacárido capsular de Haemophilus influenzae tipo b.

20. Organismos, Medio de Desarrollo y Cultivo

25. Se utilizaron dos cepas de Haemophilus influenzae tipo b. La cepa Rab se obtiene del Hospital de Bebés Grace Leidy, Universidad de Columbia, Ciudad de New York, New York. La cepa CK se aisló de un paciente del Hospital Waterbury Waterbury, Conn.

30. Los organismos se hicieron pasar a través de ratón y varias veces para asegurar su virulencia. Los organismos se aislaron durante la autopsia a partir del tejido del cerebro de los ratones, se subcultivaron en ya sea un medio de Infusión de Cerebro Corazón a 3,7% (ICC) (Difco Lab., Detroit Mich.) o en un agar de ICC al 5% suplementado con 0,01% de dinucleótido de

nicotinamida adenina (DNA) (P-L Biochemicals, Milwaukee, Wis.) y 1% (v/v) de sangre de caballo desfibrinada (Animal Blood Center, Syracuse, N. Y.) y luego se distribuyeron en porciones de 1 ml en ampollas, se liofilizó y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

5. El medio basal utilizado para el desarrollo de los organismos es (ICC) al 3,7%. El medio basal es suplementado con 10 mg de DNA y 20 mg de hemina (Eastman Kodak, Rochester, N. Y.) por litro. Se agrega un por ciento (v/v) de sangre de caballo desfibrinada por 50 ml de cultivo de siembra. Los suplementos se preparan en forma fresca y se filtran a través
10. de una unidad de filtro Nalgene de  $0,45\mu$  (Nalge Sybron Corp., Rochester, N. Y.) antes de usar. Para el desarrollo del organismo en un fermentador de 14 litros, el medio se suplementa adicionalmente con 0,5% de glucosa.
15. Para preparar un frasco de organismos de siembra, un ml del cultivo de carga congelado se descongela y se transfiere a 50 ml del medio de ICC enriquecido suplementado con sangre de caballo desfibrinada y DNA. El cultivo se desarrolló durante 8 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en un agitador giro-rotatorio a
20. 150 rpm. Los organismos se agregan como un inóculo al 1% a porciones de 500 ml del caldo de ICC enriquecido en frascos de 2 litros que luego se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación moderada en un agitador giro-rotatorio durante 8 horas (para aislación de FPR) a 14 horas (como cultivos de siembra).
25. La fermentación de cada carga en un fermentador de 14 litros se inicia transfiriendo asépticamente 700 ml del cultivo de siembra a 7 litros del caldo de ICC enriquecido suplementado con hemina en lugar de sangre de caballo desfibrinada. El cultivo se mantiene continuamente a  $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . El
30. tanque se agita a un régimen de 150 rpm y se mantiene un flujo

- de aire de 0,25 litros de aire por litro de masa por minuto. Durante el desarrollo se agrega si es necesario 0,001% de un antiespumante de silicona (FD-82, Hodag Chemical Corp.). Los cultivos se desarrollan hasta el último logaritmo de crecimiento (8 a  $10 \times 10^9$  células viables/ml), generalmente aproximadamente 8 horas y luego el desarrollo se termina agregando formaldehído 0,4% y dejando reposar durante la noche a 4°C.

5. Aislación de Fosfato de Polirribosil Ribitol (FPR)

10. Caldo de cultivo preparado como se describió anteriormente se centrifuga a 27,000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante libre de células se recoge y se trata como sigue:

Etapa 1, Precipitación con Etanol

15. El sobrenadante de cultivo se agrega acetato de sodio (concentración final de 4%). La solución se regula a pH 6,0-6,2 y se agrega lentamente con vigorosa agitación a 4°C 44 litros de etanol 3A. La mezcla se regula a pH 6,8 con ácido acético glacial y luego se deja reposar durante 12 horas a 3°C. El precipitado resultante se recoge por decantación y luego se centrifuga para proporcionar FPR crudo.

20. Etapa 2. Tratamiento con Cetavlon (bromuro de hexadeciltrimetilamonio).

25. El precipitado de la etapa 1 se disuelve en agua destilada libre del pirógeno y se centrifuga para eliminar el residuo. La solución castaña clara luego se agrega lentamente a 100 ml de una solución acuosa al 10% de Cetavlon con mezclado (concentración final de 0,5%). La mezcla se agita durante una hora y luego se centrifuga. El precipitado de ácido nucleico y complejo de FPR-Cetavlon se mezcla con dos litros de cloruro de sodio 0,3M. La solución nebulosa se centrifuga para eliminar materiales insolubles tal como sal de
- 30.

Cetavlon nucleico.

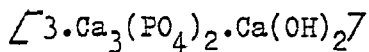
5. El sobrenadante se diluye con un volumen igual de agua provocando que se precipite la sal de FPR-Cetavlon. La mezcla se agita durante una hora, el precipitado se recoge por centrifugación y luego se disuelven 2 litros de cloruro de sodio 0,3M.

Etapas 3, Precipitación con Etanol

10. Cetavlon y los contaminantes de ácido nucleico y proteínas se eliminaron adicionalmente por precipitación con etanol (por lo menos dos veces). El FPR se precipita como se describió en la Etapa 1 mientras que se disuelve Cetavlon en la solución alcohólica. El FPR se recupera por centrifugación, se disuelve en dos litros de agua destilada libre de pirógenos y luego se reprecipita como se describió anteriormente. El precipitado de FPR final se solubiliza en fosfato de sodio 20mM pH 6,8.
- 15.

Etapas 4, Tratamiento con hidroxilapatita

20. Contaminantes (por ejemplo ácidos nucleicos, proteínas y endotoxinas) en las preparaciones de FPR parcialmente purificadas se eliminan selectivamente por adsorción en un adsorbente que contiene fosfato de calcio tal como hidroxilapatita



25. La presente invención se basa en el descubrimiento de que el polisacárido FPR no es absorbido por el adsorbente de fosfato de calcio que contiene regulador fosfato (20mM) que tiene un pH de aproximadamente 6,7-6,9; un regulador fosfato (50 mM) que tiene un pH de aproximadamente 5,8; sin embargo, los contaminantes (tales como ácidos nucleicos, proteínas y endotoxinas) son adsorbidos bajo estas condiciones. El procedimiento de la presente invención puede llevarse a cabo en una operación en tanga o en columna. En un procedimiento en tanga, la hidroxilapatita
- 30.

5. se agrega para la preparación de FPR parcialmente purificadas (en fosfato e0mM; pH 6,9). La mezcla se mezcla bien y se centrifuga para eliminar sólidos no deseados (adsorbente y los contaminantes adsorbidos por el adsorbente). El fluido sobrenadante se somete al procedimiento precedente por lo menos 2 veces más. La solución resultante se filtra a través de filtros de miliporos, se dializa contra agua destilada libre de pirógeno y se liofiliza.

10. En una operación en columna, el FPR parcialmente purificado en regulador fosfato 20mM (pH de por lo menos 5,8), se aplica una columna que contiene la hidroxilapatita adsorbente que ha sido equilibrada con regulador fosfato 20mM, pH 5,8, y eluida con un gradiente en etapas de regulador fosfato de sodio (pH 5,8) de 20mM a 100 mM. Se recogen fracciones y se analizan con relación a pentosa (para fosfato de polirotosil ribitol). Aquellas fracciones que son positivas para pentosa se dializan con agua destilada libre de pirógeno y se liofilizan.

15. (II) Un procedimiento para preparar una vacuna combinada que consiste en FPR a partir de antígenos de H. influenzae tipo b y B. pertussis

20. Para preparar una vacuna de FPR, se disuelve FPR liofilizado (preparado como se mencionó anteriormente) a una concentración de 20 ug.ml en solución salina regulada con fosfato (SRF) (0,113 g de difosfato de potasio, 0,83 g de fosfato disódico, 8,5 g de cloruro de sodio por litro, pH 7,0, que contiene 0,01% de timerosal). La vacuna se filtra estéril a través de unidades de filtro de miliporos de 0,45  $\mu$ , se suministra en ampollitas de vidrio, y se almacena a 4°C.

25. Se prepara una solución concentrada de FPR pesando 30. cantidad predeterminada del polisacárido y disolviéndolo en so-

5. solución salina regulada con fosfato (0,113 g de difosfato de potasio, 0,83 g de fosfato disódico, y 8,5 g de cloruro de sodio por litro, pH 7,0, que contiene 0,01% de timerosal). Esta solución concentrada de FPR luego se mezcla con un volumen apropiado de suspensiones de células frescas de B. pertussis para preparar la solución de carga. La vacuna combinada en esta solución de carga contiene 200  $\mu$ g de FPR y aproximadamente 70 unidades de opacidad (op) de células por ml. La solución de carga se mantiene a 4°C durante 90 días para permitir la des-  
10. toxificación de antígenos de pertussis antes de preparar el producto final (vacuna) que contiene 10  $\mu$ g de FPR y 3,5 unidades de op de células de pertussis/dosis de 0,5 ml).

EJEMPLO 1

15. Se agrega hidroxilapatita (por ejemplo, Bio. gel HTP, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.), 2,5 g se agregan a 250 ml de preparaciones de FPR parcialmente purificadas (luego de tratamientos con Cetavlon y etanol) (conteniendo aproximadamente 1,0 mg de FPR/ml) en regulador fosfato de sodio 20mM, pH 6,9 y se mezcla en un baño de agua helada (1-4°C) durante  
20. una hora. La mezcla se centrifuga en el Sorvall RC2-B durante 30 minutos a 16,000 x g. El fluido sobrenadante luego se hace pasar a través de un filtro de miliporos de 0,65  $\mu$  y se somete al procedimiento precedente (tratado cada vez con 2,5 g de hidroxilapatita dos veces más). La solución resultante se  
25. filtra a través de filtros de miliporos 0,65  $\mu$  y 0,45  $\mu$ , se dializa contra agua destilada libre de pirógenos y se liofiliza. El producto liofilizado exhibe fuerte actividad inmunógena (ver más adelante vacuna combinada y experimento con animales) y contiene muy bajos contaminantes (tales como ácidos nucleicos,  
30. proteínas y endotoxinas) (ver la Tabla I siguiente). Se obtiene

aproximadamente 170 mg del FPR liofilizado. La recuperación de FPR por el procedimiento es aproximadamente 70% del polisacárido de partida. El FPR debe almacenarse bajo condiciones apropiadas, tal como a 4°C en un desecador sobre pentóxido de fósforo y gel de sílice.

5.

#### EJEMPLO 2

Un FPR parcialmente purificado (300 mg de FPR) se disuelven en 100 ml de regulador fosfato de sodio 20mM, pH 5,8 (es decir 3 mg de FPR/ml). Esta solución se aplica a una columna a temperatura ambiente (5,0 x 45 cm) de hidroxilapatita (un volumen de lecho de aproximadamente 250 ml que ha sido equilibrado con regulador fosfato de sodio 20mM, pH 5,8 y eluido con un gradiente en etapas de regulador fosfato de sodio 20mM, 50mM, 100mM, pH 5,8. Las fracciones individuales (200 ml) eluidas con regulador fosfato de sodio 20mM y 50 mM (pH 5,8), positivos para pentosa (determinación de pentosa mediante el método orcinol) se recogen, se dializan y contra agua destilada libre de pirógeno y se liofilizan. Se obtiene aproximadamente; 206 mg del producto liofilizado, FPR.

10.

15.

20.

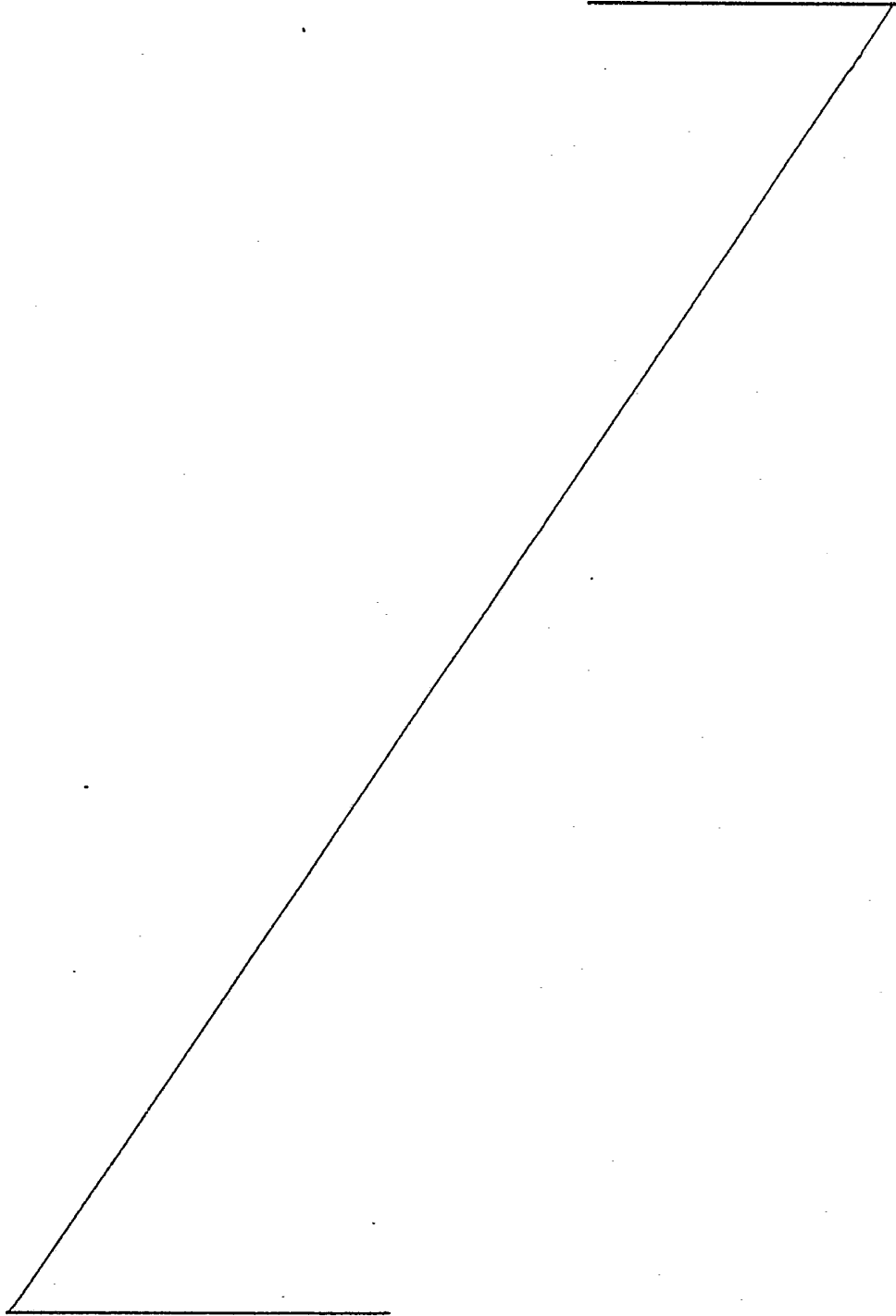
La pureza del polisacárido. FPR se analiza estimando hasta que grado está contaminado con ácidos nucleicos, proteínas y endotoxinas. La concentración de proteína se determina mediante el método de Lowry, y otros en J. Biol. Chem. 193:265 (1951) con albúmina de suero bovino como norma. El ácido nucleico se mide mediante la adsorción de la solución de FPR a 260 nm. La adsorción a 50 ug de ácido nucleico es un ml de agua en una célula de un pasaje de luz de 1 cm se presume como igual a 1,0. El tamaño molecular se estima mediante medios de filtración de Sefarosa 4B a 2B gel en columnas de 1,5 x 90 cm

25.

30.

(Pharmacia-Fine Chemicals, Piscataway, N. J.). Los valores de

coeficiente de partición (Kd) se calculan a partir del diseño de elución desarrollado por la reacción orcinol (Herbert, y otros, *Methods in Microbiology*, Vol. 5B, 285-291).



T A B L A I

Características físico-químicas de FPR Preido

Procedimiento	Ensayo				Endotoxina	
	tamaño mol.(Kd)	Pentosas %	Acido nucleico %	Proteína %	Ensayo de pí- rógono de conejo	Ensayo d Lisato de Limulus
Ejemplo 1	0 <sup>a</sup>	35,0	0,8	0,7	10,0	1/400
Ejemplo 2	0,44 <sup>b</sup>	33,8	0,3	0,7	10,0	1/1000

- a) Utilizando Sefarosa 25 y 43, peso molecular > 2KI
- b) Utilizando Sefarosa 43
- c)  $\mu\text{g FPR}/\mu\text{g}$  de peso corporal del conejo que no propiona fiebre.
- d) Dilución recíproca de FPR (100  $\mu\text{g FPR}/\text{ml}$ ) cuando se compara con "Bureau of Biologies EI (norma de endotoxina)."

T A B L A I

Características físico-Químicas de FPR Preido

Ensayo				
Procedimiento	tamaño mol.(Kd)	Pentosa %	Acido nucleico %	Prot %
Ejemplo 1	0 <sup>a</sup>	36,0	0,8	0,7
Ejemplo 2	0,44 <sup>b</sup>	33,8	0,3	0,7

- a) Utilizando Sefarosa 2B y 4B, peso molecular > 2KI
- b) Utilizando Sefarosa 4B
- c)  $\mu\text{g}$  FPR/kg de peso corporal del Conejo que no propiona fie
- d) Dilución recíproca de FPR (100  $\mu\text{g}$  FPR/ml) cuando se compara con "Bureau of Biologies El (norma de endotoxina).-

01

Endotoxina		
Proteína %	Ensayo de pi- rógeno de conejo	Ensayo <sup>d</sup> de Lisato de Limulus
0,7	10,0	1/400
0,7	10,0	1/1000

na fiebre.

EJEMPLO 3

- Se prepara como sigue una vacuna combinada que contiene FPR a partir de antígenos H. influenzae tipo b y B. pertussis se disuelve 140 mg de FPR (como se prepara en el Ejemplo 2)
5. 350 ml de solución salina regulada con fosfato estéril (SRF) (0,113 g de difosfato de potasio, 0,83 g de fosfato disódico, y 8,5 g de cloruro de sodio por litro, pH 7,0, que contiene 0,01% de timerosal), y se filtra a través de un filtro de miliporos de 0,45  $\mu$ . Esta solución concentrada de FPR (400  $\mu$ g/ml)
10. se utiliza para preparar una vacuna combinada que consiste en antígenos de FPR y B. pertussis.

- A 150 ml de la solución concentrada de FPR (400  $\mu$ g/ml) se agrega 150 ml de suspensión de células frescas B. pertussis (Cepa 138) en SRF, pH 7,0 (que contiene células de unidad de opacidad 149; op./ml) para preparar la solución de carga de la
15. vacuna combinada. Esta solución de carga (300 ml) se mantiene a 4°C hasta que se disminuye el nivel de endotoxina de la pertussis (por lo menos 90 días). La esterilidad de la solución de carga se ensaya con un medio de tioglicolato (a 32-33°C).
20. El pH de la solución de carga luego de una incubación de 90 días se verifica y se regula a pH 7,0  $\pm$ 1. El producto final (vacuna) utilizado para experimentos con animales se prepara diluyendo la solución combinada de carga con SRF que contiene 10  $\mu$ g de FPR y 3,5 unidades de op de células de pertussis/0,5 ml) (dosis).

25. Los resultados de la respuesta de anticuerpo de esta vacuna combinada en las ratas jóvenes aparecen en las figuras 1 y 2 como se indica más adelante.

EJEMPLO 4

- Una solución de carga de FPR (400  $\mu$ g/ml) se prepara
30. disolviendo 30 mg de FPR (como se preparó en el Ejemplo 1)

5. en 75 ml de solución salina regulada con fosfato estéril (SRF) y se filtra a través de un filtro de miliporos 0,45  $\mu$ . A 25 ml de este FPR concentrado se agrega un volumen igual (es decir 25 ml) de suspensión de células frescas de B. pertussis (Cepa 138) en SRF, pH 7,0 (que contiene células de 149 unidades de op/ml) para preparar la solución de carga de vacuna combinada. La solución de carga (50 ml) se mantiene a 4°C durante (por lo menos 90 días). La esterilidad de la solución de carga se ensaya como se mencionó anteriormente con un medio de tioglicolato. El pH de la solución de carga es 7,0  $\pm$  1. El producto final (vacuna) utilizado para experimentos con animales se prepara diluyendo la solución combinada de carga con SRF, y contiene 10  $\mu$ g de FPR y 3,7 unidades de op de células de pertussis/0,5 ml (dosis).

15.

EJEMPLO 5

- La solución de carga de FPR (200  $\mu$ g/ml en SRF (pH 7,0) se preparan como en el Ejemplo 4. La solución de carga de pertussis (que contiene 75 unidades de op/ml) se prepara diluyendo 25 ml de la suspensión de células frescas de B. pertussis (149 unidades de op/ml) con una cantidad igual de SRF. Ambas soluciones de carga se incuban a 4°C durante 90 días o escasamente más tiempo. La vacuna combinada se prepara tomando 14 ml de la solución de carga de FPR (200  $\mu$ g/ml), más 14 ml de solución de carga (destoxificada) de antígeno de pertussis, (75 unidades de op/ml) y diluyendo con 112 ml de SRF (volumen final 140 ml). La vacuna final utilizada para experimentos con animales contiene 10  $\mu$ g de FPR y 3,7 unidades de op de pertussis/, 0,5 ml (dosis).

30. Los resultados de la respuesta de anticuerpos a esta vacuna combinada en ratas jóvenes aparecen en las figuras 3 y

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para aislar y purificar fosfato de polirribosil ribitol inmunológicamente activo, abreviado por las siglas FPR y consistente en el polisacárico capsular de Haemophilus influenzae tipo b, en donde se fermentan capas del organismo Haemophilus influenzae tipo b bajo condiciones convencionales; se aísla el FPR mediante precipitación convencional con etanol; y se aísla adicionalmente el FPR como un complejo de bromuro de hexadeciltrimetilamonio mediante procedimientos convencionales; caracterizado porque comprende las etapas de purificar el FPR agregando hidroxilapatita  $[3.Ca_3(PO_4)_2Ca(OH_2)]$  en un regulador fosfato de sodio 20 milimolar a un pH de 6,5 a 7,0 aproximadamente; mezclar a una temperatura de aproximadamente 2 a 10°C; centrifugar; eliminar el sobrenadante; y repetir el procedimiento anterior de por lo menos dos veces más; filtrar el sobrenadante a través de filtros apropiados; dializar contra agua destilada libre de pirógenos; y luego liofilizar.

2.- Procedimiento para aislar y purificar fosfato de polirribosil ribitol inmunológicamente activo, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los dibujos adjuntos.

Esta Memoria consta de 14 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 2 de Abril 1979

AMERICAN CYANAMID COMPANY

J. M. GOMEZ BARRERO Y POMBO  
p. p. Firmador J. Suarez Diaz

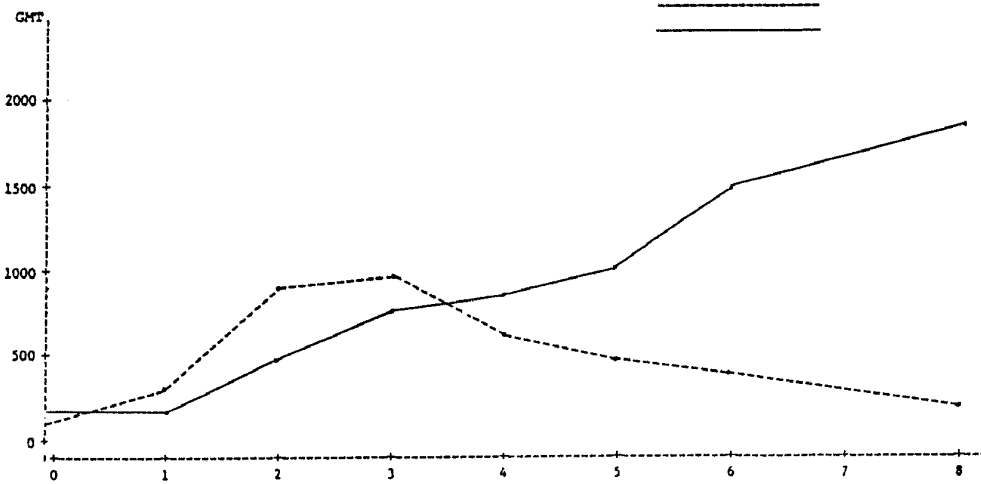


FIG.1

ESCALA  
VARIABLE

Madrid, 10 de 1978

*[Handwritten signature]*

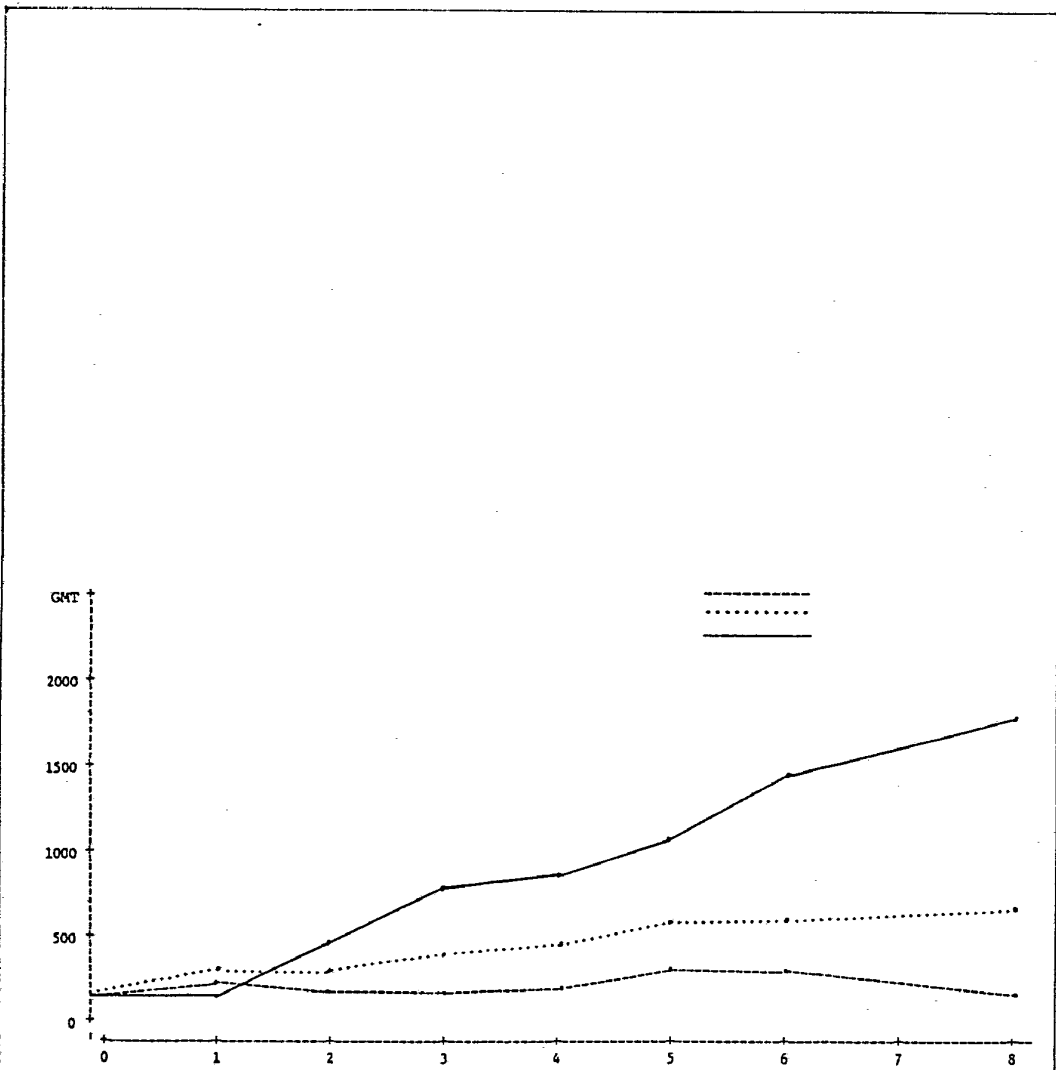


FIG. 2

ESCA  
VALOR

Madrid

27 OCT 1979

J. M. BARRAL Y FORNOS  
p. p. Firmado: J. Suarez Diaz

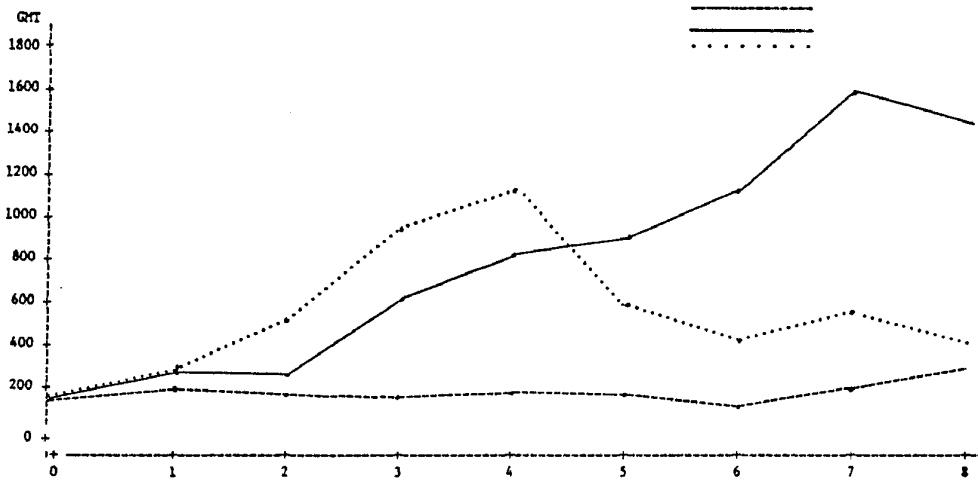


FIG. 3

~~VALIDADO~~  
J. M. GONZALEZ ACEVEDO Y PARRA  
p. p. Firmado J. Suarez Diaz