



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101990900127186
Data Deposito	21/06/1990
Data Pubblicazione	21/12/1991

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

VACCINI ACELLULARI CONTRO LA PERTOSSE
--

TITOLARE: SCLAVO S.p.a. con sede in Siena

Inventori designati: NENCIONI Luciano, BUGNOLI Massimo, MANETTI

Roberto, MARSILI Ilio, RUGGIERO Paolo,

RAPPUOLI Rino

DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce a vaccini acellulari contro la pertosse contenenti un doppio mutante non tossico della tossina della pertosse, emagglutina filamentosa (FHA), proteina di 69 kilodaltons (69Kd) e vettori farmaceuticamente accettabili eventualmente in associazione ad anatossina difterica e tetanica.

Stato dell'arte

21 GIU. 1990

20710A/90

La pertosse, malattia infettiva di origine batterica caratterizzata da eccessi di tosse convulsa e grave sintomatologia respiratoria, colpisce individui di ogni età e, nei primi anni di vita, provoca la morte nello 0,5% dei casi.

Bordetella pertussis che è l'agente eziologico della pertosse, produce durante la fase virulenta (Fase I) una serie di componenti tossici dei quali la tossina della pertosse (PT) rappresenta non solo il principale agente patogeno di tale malattia, ma anche il maggior immunogeno.

La PT, che è strutturata in un esamero composto da cinque differenti subunità (S1, S2, S3, S4 ed S5) è in grado infatti di indurre in animali da esperimento livelli anticorpali

sufficienti a conferire una protezione contro la pertosse.

L'incidenza di detta infezione può essere efficacemente controllata mediante immunizzazione di un individuo con un vaccino adatto.

Attualmente viene utilizzato un vaccino cellulare, costituito cioè da cellule intere di B.pertussis virulenta trattate con mertiolato e uccise a 56°C. Detto vaccino, pur conferendo una immunità protettiva, può indurre tuttavia degli effetti collaterali indesiderabili che vanno da semplici ponfi, eritema e febbre a convulsioni e danni cerebrali reversibili ed irreversibili.

Sono stati quindi proposti dalla tecnica vaccini acellulari costituiti da una o più proteine antigeniche, fra cui la tossina della pertosse detossificata con una varietà di reagenti chimici quali, formaldeide [Sato et al., (1983), Infect.Immun., 41, 313-320], gluteraldeide [Quentin-Millet et al., (1988), J.Biol.Stand., 16, 99-108], tetranitrometano [Siber et al., (1988), Winberry et al., 1988, International Workshop of Bordetella pertussis, Hamilton, MO], acido trinitrobenzensolfonico [Fisch et al., 1984, Infect.Immun., 44, 1-16], acqua ossigenata [Sekura et al., (1983), Infect.Immun., 113, 806-813].

Tali metodi di detossificazione presentano tuttavia i seguenti inconvenienti:

- reversione alla tossicità. Infatti, vaccini acellulari

- costituiti dalla sola PT detossificata con formaldeide [Sato Y. et al., Lancet i, 1984, 122-126], pur essendo in grado di proteggere l'80% dei bambini dalla malattia e il 50-60% dall'infezione [Ad hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines, Lancet i, 1988, 959-960], mostrano in qualche caso reversione alla tossicità [Storsaeter, J. et al., Pediatr. Infect. Dis. J., 7, 1988, 637-645];
- ridotta immunogenicità causata dalle condizioni drastiche richieste nella fase di detossificazione
 - assenza di riproducibilità dei prodotti detossificati
 - necessità di saggi per la valutazione della reversione per ciascuna preparazione che richiedono lunghi tempi di esecuzione; ed infine
 - la pericolosità di maneggiamento di grandi quantità di materiale tossico da parte del personale addetto alla preparazione.

E' noto che la tossicità della tossina della pertosse è mediata dall'attività ADP-ribosiltransferasica della subunità S1.

Allo scopo di ottenere delle molecole con una tossicità alterata rispetto a quella della PT wild type, adatte alla preparazione di vaccini antipertosse privi degli inconvenienti sopra riportati, sono stati costruiti e prodotti, come descritto nella domanda di brevetto N° 19286 del 7/2/90, dei mutanti della tossina della pertosse contenenti una o più sostituzioni aminoacidiche nella sequenza della subunità S1

delle PT.

Un esempio della riduzione di tossicità di alcuni di detti mutanti viene riportato in TABELLA I

TABELLA I

Correlazione percentuale fra attività enzimatica e tossicità in vitro di alcuni mutanti della PT

Mutante	ADP- ribosilazione	Tossicità su CHO
PT	100	100
PT-9K (Arg9 → Lys)	0,1	0,1
PT-13L (Arg13 → Leu)	2	25
PT-26I (Trp26 → Ile)	N.D.	10
PT-129G (Glu129 → Gly)	0,5	5
PT-9K/129G	< 0,01	< 0,0001
PT-13L/129G	< 0,01	< 0,0001
PT-26I/129G	< 0,01	< 0,0001

Descrizione dettagliata dell'invenzione

E' stato ora sorprendentemente trovato e forma oggetto della presente invenzione che mutanti della tossina della pertosse in cui, nella subunità S1, l'aminoacido Glu 129 ed un qualsiasi altro aminoacido la cui sostituzione provochi un abbassamento della tossicità vengono entrambi sostituiti da un aminoacido naturale sono praticamente completamente atossici e quindi utilizzabili per la preparazione di vaccini acelulari contro la pertosse.

Come esempi particolari, ma non limitativi, della presente invenzione sono descritti vaccini contenenti mutanti in cui sono state operate le seguenti sostituzioni : Arg 9 e Glu 129 o

Trp 26 e Glu 129 o Arg 13 e Glu 129 o Asp 11 e Trp 26 e Glu 129. Negli esempi suddetti gli aminoacidi indicati sono stati sostituiti nel modo seguente : Glu 129 → Gly, Arg 9 → Lys, Trp 26 → Ile, Arg 13 → Leu, Asp 11 → Ser.

E' stato inoltre trovato, ed è un ulteriore oggetto della presente invenzione, che per ottenere una più completa protezione contro la pertosse altri antigeni di Bordetella come la FHA e la proteina della membrana più esterna di B.pertussis di 69 kilodaltons (69Kd) possono eventualmente essere presi in considerazione per la formulazione di vaccini acellulari; in particolare FHA e 69Kd prodotti da ceppi di Bordetella in cui è stato deletato il gene della PT (vedi IT-A-19286).

La presente invenzione si pone quindi come obiettivo quello di mettere a punto degli immunogeni adatti alla preparazione di vaccini antipertosse privi degli inconvenienti della tecnica nota. Questo obiettivo viene ottenuto secondo la presente invenzione mettendo a disposizione dei nuovi ceppi di Bordetella capaci di produrre un mutante della tossina della pertosse immunogenicamente attivo con una tossicità assente, FHA e 69Kd, e/o di ceppi di Bordetella Δ tox incapaci di produrre la tossina della pertosse ma ugualmente capaci di produrre FHA e 69Kd per la preparazione di vaccini acellulari antipertosse efficaci.

Costituisce un ulteriore scopo della presente invenzione l'uso di detti antigeni, eventualmente trattati con formaldeide, per

la preparazione di vaccini acellulari antipertosse efficaci. Costituiscono ancora uno scopo della presente invenzione formulazioni immunogeniche adatte come vaccini antipertosse capaci di indurre nel modello animale una risposta protettiva efficace contro infezioni causate da B.pertussis virulenta contenenti una quantità immunologicamente efficace di un mutante della PT da solo e/o FHA e/o 69Kd o ulteriormente combinato con le anatossine difterica e tetanica dove detti antigeni sono eventualmente stabilizzati con formaldeide.

Ulteriori scopi e modalità di realizzazione della presente invenzione risulteranno evidenti dalla descrizione e dagli esempi qui di seguito riportati a scopo illustrativo ma non limitativo.

Gli antigeni preferiti secondo la presente invenzione sono il mutante della tossina della pertosse caratterizzato dal fatto che i residui aminoacidici Arg 9 e Glu 129 sono deleti e sostituiti rispettivamente con i residui aminoacidici Lys e Gly (PT-9K/129G), la FHA e la 69Kd.

In accordo con la precedente invenzione descritta nella domanda di brevetto italiano 19286 del 7/2/1990 i ceppi di Bordetella capaci di produrre i suddetti antigeni sono ottenuti mediante un procedimento che comprende :

- a) il selezionare ceppi di Bordetella wild type resistenti ad almeno un antibiotico;
- b) il sostituire mediante ricombinazione omologa nei ceppi

- ottenuti nello stadio (a) il gene cromosomale che codifica per la tossina della pertosse con un gene che codifica per una proteina diversa;
- c) il selezionare i ceppi Bordetella privi del gene PT (Δ tox) ottenuti nello stadio (b);
- d) il mutagenizzare il gene della tossina della pertosse isolato da B.pertussis;
- e) l'introdurre detto gene mutagenizzato in un plasmide non replicabile in Bordetella opportunamente modificato;
- f) l'introdurre detto plasmide nei ceppi di Bordetella (Δ tox) selezionati nello stadio (c) mediante coniugazione; e infine
- g) l'isolare i ceppi di Bordetella in cui è avvenuta una ricombinazione omologa con il gene della tossina della pertosse mutagenizzato.

In accordo con la presente invenzione il doppio mutante PT-9K/129G o PT-13L/129G o PT-26I/129G e la FHA vengono purificati dal terreno di coltura acellulare mentre la 69Kd viene purificata dal corpo cellulare.

In accordo con la presente invenzione le caratteristiche chimico-fisiche, e le attività biologiche ed immunologiche di dette proteine sono state determinate in vitro ed in vivo.

Per quanto riguarda le proprietà chimico-fisiche, l'analisi mediante elettroforesi in SDS su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e l'analisi Western blotting mostrano l'assenza di proteine contaminanti ed un profilo conforme al peso molecolare

di dette proteine, mentre l'analisi aminoacidica evidenzia una composizione in accordo con i valori predetti sulla base della sequenza aminoacidica nota.

In accordo con la presente invenzione, le proprietà immunogeniche del doppio mutante PT-9K/129G, della FHA e della 69 Kd vengono saggiate in vivo come riportato negli esempi descritti in seguito. I risultati mostrano che detti antigeni sono in grado di indurre la formazione di anticorpi specifici con un elevato titolo anticorpale e di conferire un'alta protezione contro infezioni con B.pertussis virulenta sia che vengano usati da soli, che in combinazione con anatossina difterica e tetanica.

Detti antigeni ottenuti in accordo con la presente invenzione, sono quindi eccellenti candidati per lo sviluppo di vaccini antipertosse efficaci. In accordo con la presente invenzione formulazioni immunogeniche adatte come vaccini anti-pertosse possono essere preparati addizionando detti antigeni ad un carrier farmaceuticamente accettabile scelto tra quelli generalmente utilizzati come veicoli di materiali immunogenici in un paziente. Un esempio di tali carriers è la soluzione salina. Il prodotto antigenico può essere presente nel carrier in soluzione o in sospensione. dette formulazioni possono anche comprendere un adiuvante per stimolare la risposta immunitaria e quindi migliorare l'efficacia del vaccino. Adiuvanti adatti agli scopi della presente invenzione

includono per esempio fosfato di alluminio (AlPO_4), idrossido di alluminio [$\text{Al}(\text{OH})_3$], interleuchina 1 o 2 o loro frammenti peptidici.

Formulazioni immunogeniche adatte come vaccini antipertosse contengono, generalmente, una concentrazione finale di antigeni scelta in modo tale da conferire una immunità efficace contro la pertosse. Il vaccino dopo formulazione, può essere introdotto in un contenitore sterile e conservato a varie temperature o liofilizzato.

Per indurre una immunità efficace contro la pertosse possono essere somministrate una o più dosi del vaccino convenientemente formulato. Vaccini secondo la presente invenzione possono essere somministrati secondo metodiche convenzionali. Il trattamento può consistere nella somministrazione di un'unica dose o di più dosi successive. Vaccini in accordo con la presente invenzione possono includere uno o più componenti antigenici diversi quali, ad esempio, tossoide tetanico, tossoide difterico o altri antigeni di Bordetella.

Allo scopo di assicurare le migliori formulazioni da includere in un vaccino antipertosse, il doppio mutante della PT, la FHA e la 69 Kd possono essere stabilizzati con lo 0,035% di formaldeide, espresso come peso/volume (p/v), corrispondente cioè ad un rapporto ponderale mutante/formaldeide di 0,3.

La formaldeide impiegata in tale concentrazione, consente la

stabilizzazione di detti antigeni e conseguentemente il loro mantenimento per lunghi periodi impedendone la degradazione enzimatica senza alterarne le proprietà immunologiche.

In conclusione il mutante della PT, la FHA e la 69Kd ottenuti da ceppi mutanti di B.pertussis in accordo con la presente invenzione costituiscono per la loro elevata immunogenicità e assenza di tossicità, degli antigeni particolarmente adatti per lo sviluppo di vaccini acellulari antipertosse monovalenti o trivalenti (DPT) aventi le caratteristiche desiderate.

ESEMPIO 1

Produzione, purificazione e caratterizzazione di PT-9K/129G

Il doppio mutante PT-9K/129G contenente le due sostituzioni aminoacidiche Arg9 → Lys e Glu129 → Gly nella sequenza della subunità S1 viene ottenuto da colture del ceppo ingegnerizzato di B.pertussis W28-9K/129G.

La costruzione del batterio ingegnerizzato nonché la produzione, la purificazione e le proprietà fisico-chimiche e immunologiche del doppio mutante PT-9K/129G sono state descritte in dettaglio nella domanda di brevetto italiano 19286 del 7/2/90.

In alternativa a quanto descritto nella domanda di brevetto sopra riportata, il primo processo di purificazione può essere effettuato oltre che con assorbimento su Affigel Blu, anche mediante passaggio del supernatante di coltura di B.pertussis W28-9K/129G contenente il doppio mutante, su idrossilapatite

secondo una modificazione del metodo descritto da Sato et al. (Infect.Immun.,1983, 41:313-320).

Al termine della crescita a centrifugazione della coltura di B.pertussis W28-9K/129G come descritto nella domanda di brevetto precedentemente citata, il supernatante viene filtrato in condizioni di sterilità mediante passaggio su cartuccia DuraporeR (Millipore) da 0,22 µm e quindi portato a pH 6,65 con HCl 2M. Questo supernatante derivante da 20-40 litri di coltura viene opportunamente diluito in modo da avere una conducibilità equivalente a quella di una soluzione 100 mM di NaCl e quindi applicata ad una colonna cromatografica contenente 500 ml di Idrossilapatite (IBF, Francia) (questo volume può legare 300-400 mg di proteina), equilibrata mediante ripetuti lavaggi con tampone fosfato 10 mM, pH 6,65. Dopo successivi lavaggi con tampone fosfato 70 mM pH6,65, il doppio mutante PT-9K/129G viene eluito alla temperatura di 8°C con tampone fosfato 0,25 M pH 6,65. Le frazioni contenenti il doppio mutante vengono raccolte, riunite e sottoposte ad un secondo processo di purificazione mediante assorbimento su fetuina come descritto nella domanda di brevetto IT 19286 del 7/2/90.

ESEMPIO 2

Caratterizzazione delle attività del mutante PT-9K/129G

Le proprietà chimico-fisiche e le attività biologiche del doppio mutante PT-9K/129G sono state analizzate dettagliatamente nella domanda di brevetto IT 19286 del 7/2/90.

Nella Tabella II viene riportato un sommario di dette attività
 Tabella II. Attività in vivo e in vitro del doppio mutante PT-
 9K/129G e della PT wild type

Attività	PT	PT-9K/129G
ADP ribosilazione (µg)	0,001	> 20
Mitogenicità (µg/ml)	0,1-0,3	0,1-0,3
Emagglutinazione (µg/pozzetto)	0,1	0,1
Affinità (anti-S1) [Ka(L/mol)]	$2,4 \times 10^8$	$6,1 \times 10^8$
Affinità (anti-PT) [Ka(L/mol)]	2×10^{10}	$9,8 \times 10^9$
Istamina (sensibilizzazione) (µg/topo)	0,1-0,5	>50
Leucocitosi (stimolazione) (µg/topo)	0,02	>50
Anafilassi (potenziamento) (µg/topo)	0,04	>7,5
Iperinsulinemia (induzione) (µg/topo)	< 1	>25
Tossicità su cellule CHO (µg/ml)	0,005	>5.000
Tossicità acuta <u>in vivo</u> (µg/kg)	N.D.	>1.500

N.D. = Non Determinato

L'analisi della immunogenicità del mutante PT-9K/129G in cavia, della capacità protettiva nei topi contro infezioni intracerebrali con B.pertussis virulenta ed i risultati della sperimentazione clinica effettuata nel volontario adulto, sono state descritte rispettivamente negli esempi 9,10 e 11 della domanda di brevetto italiano 19286 del 7/2/90.

Un sommario dei risultati è riportato nelle Tabelle III e IV.

Tabella III. Immunogenicità del doppio mutante PT-9K/129G

Protezione		Risposta anticorpale in cavia				
in topo		Titolo Elisa ^a			Titolo neutralizzante ^b	
Dose (µg)	S/T ^c (µg)	Dose (µg)	Post 1/ Pre	Post 2/ Pre	Post 1	Post 2
30	16/16	3	35	48	1/20	1/1.280
12	16/16	10	38	52	1/20	1/1.280
4,8	12/16	25	52	55	1/20	1/1.280
1,9	10/16	50	55	63	1/80	1/1.280
0,7	7/16					
0,2	3/16					

a) Il titolo viene espresso come rapporto fra le ABS-MAX

b) Il titolo viene espresso come diluizione del siero di cavia capace di neutralizzare l'effetto tossico della PT nativa su cellule CHO

c) S/T = sopravvissuti su un totale di 16 topi infettati per via intracerebrale con B.pertussis virulenta

Tabella IV - Titolo anticorpale e neutralizzante in sieri di volontari adulti che ricevono placebo o vaccino PT-9K/129 G

TEMPO		GRUPPI SPERIMENTALI			
		Placebo		Vaccine	
		Media geometrica (95% intervallo di confidenza)	Post/Pre	Media geometrica (95% intervallo di confidenza)	Post/Pre
Titolo neutralizzante (Reciproco diluizione siero in saggi di CHO)	giorno 0	12.8 (7.5-21.6)		13.6 (8.6-21.5)	
	giorno + 30	12.8 (6.7-24.9)	1.0	1,810.2 ** (737.0-4,446.0)	133
	giorno + 72	11.7 (5.9-23.0)	0.9	1,974.0 ** (820.1-4,751.4)	145
Titolo di anticorpi anti-PT (unità ELISA) per ml)	giorno 0	6.5 (3.5-12.2)		6.7 (4.6-9.8)	
	giorno + 30	8.1 (4.2-15.5)	1.2	496.5 ** (199.9-1,233.3)	74
	giorno + 72	7.9 (4.5-13.9)	1.2	522.4 ** (216.8-1,258.6)	78
Titolo di anticorpi antiFHA (unità ELISA) per ml)	giorno 0	9.4 (4.3-20.7)		12.7 (7.5-21.6)	
	giorno + 30	9.9 (4.7-20.9)	1.0	85.1 ** (54.9-131.7)	6.7
	giorno + 72	8.4 (4.1-17.3)	0.9	57.7 * (39.1-85.5)	4.5

* $P \leq 0.05$ vs valore giorno 0

** $P \leq 0.01$ vs valore giorno 0

Riportiamo qui di seguito due ulteriori tipi di esperimento non descritti nel suddetto brevetto a conferma della capacità del doppio mutante PT-9K/129G di indurre anticorpi protettivi.

A) Neutralizzazione in vivo della leucocitosi e della sensibilizzazione all'istamina

Gruppi di topi femmine BALB/c del peso di circa 16-18g vengono inoculati per via intraperitoneale (i.p.) con 0,5 ml di soluzione fisiologica contenente 3 µg di PT-9K/129G adsorbito su $Al(OH)_3$ (1 mg/ml). Topi di controllo vengono inoculati i.p. con soluzione fisiologica contenente 0,02-0,1 o 0,5 µg di PT. Al giorno + 33 vengono prelevati campioni di sangue dal plesso orbitale di ciascun topo e quindi viene misurata la leucocitosi in un contatore di cellule (Coulter counter, Coulter Electronics Ltd, Luton, England). Gli stessi topi vengono poi inoculati i.p. al giorno + 36 con 4 mg di istamina dicloroidrato (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) in 0,5 ml di soluzione fisiologica e 24 ore più tardi vengono registrate le morti.

TABELLA V Neutralizzazione in vivo della leucocitosi e della sensibilizzazione all'istamina

Immunizzazione	Dose di PT (µg/topo)	Leucocitosi (PBMCM/ml $\pm$ SD $\times 10^6$)	Istamina N° di morti/ totale n° topi saggiato
$Al(OH)_3$	-	7.7 $\pm$ 0.40	0/8
	0.020	7.9 $\pm$ 0.31	2/8
	0.100	16.3 $\pm$ 1.32	8/8
	0.500	18.6 $\pm$ 0.85	8/8

Al(OH) ₃ +			
PT-9K/129G	0.020	8.2 ± 0.61	0/8
(3 µg/topo)	0.100	7.8 ± 0.42	0/8
	0.500	7.5 ± 0.25	0/8

I risultati riportati in Tabella V mostrano che 0,1 µg di PT sono capaci di indurre un significativo aumento del numero di leucociti del sangue periferico e il 100% di morti conseguente a challenge con istamina in topi iniettati con solo Al(OH)₃ e saggiati individualmente. Al contrario, nè leucocitosi, nè sensibilizzazione all'istamina veniva osservata in topi immunizzati con 3 µg di vaccino PT-9K/129G.

B) Neutralizzazione in vitro dell'attività enzimatica della tossina della pertosse

Anticorpi di tre volontari adulti vaccinati con una dose di vaccino PT-9K/129G ed inclusi nella sperimentazione clinica descritta nell'esempio 11 della domanda di brevetto italiano 19286 vengono saggiati per la loro capacità di neutralizzare in vitro l'attività ADP-ribosiltransferasica della PT. Il saggio viene effettuato come descritto precedentemente (Pizza et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85:7521-7525) usando la transducina bovina come substrato della reazione enzimatica.

Per eseguire il test, 10 µl di siero umano diluito 1/10, 1/30, 1/90, 1/270, 1/810 e 1/2430 vengono incubati con 5 µl contenenti 50 ng di PT per 60' a 37°C. Le miscele vengono poi preattivate mediante incubazione per 30' a temperatura ambiente, con ditiotreitolo 25 mM. Alla fine del periodo di

preattivazione, vengono aggiunti in un volume finale di 100 μ l, 5 μ l di TRIS 2M, pH 7,5, 1 μ l di una soluzione 100 mM di adenosina trifosfato, 10 μ l di una soluzione 25 mM di timidina e 10 μ l di una miscela di membrane del segmento più esterno di retina bovina contenente transducina. Le miscele di reazione vengono quindi incubate per 2 h a temperatura ambiente. Le miscele vengono poi centrifugate ed il pellet contenente la transducina viene solubilizzato in 30 μ l di sodio dodecilsolfato, applicato e fatto correre su un gel di acrilamide al 12,5% secondo il metodo classico (Laemmli et al., Nature, 1970; 227:680-685).

La transducina marcata con l'isotopo radioattivo viene visualizzata per autoradiografia. L'inibizione dell'ADP-ribosilazione della trasducina bovina con [32 P] NAD da parte di sieri immuni di tre volontari adulti (RR,CC,V11) vaccinati con PT-9K/129G è appunto mostrata nella Figura 1.

I reciproci delle diluizioni del siero sono riportati nelle corsie 1 - 6.

Per l'analisi quantitativa le bande contenenti la transducina vengono tagliate e la radioattività viene contata in un β -counter (Beckman).

I risultati espressi come conte per minuto (cpm) vengono riportati in Tabella VI.

TABELLA VI Inibizione in vitro dell'attività ADP-ribosilante della PT con sieri di volontari adulti vaccinati con PT-9K/129G

Siero	PT	<u>Diluizione del siero</u> ⁻¹						
		Campione	(50 ng)	10 ^a	30	90	270	810 2430 ED ₅₀
-	1.264 ^b	-	-	-	-	-	-	-
RR			44	62	191	391	467	532 1.264
CC			53	82	313	410	978	788 665
V11			63	115	461	540	674	799 675

a Reciproco della diluizione del siero capace di inibire il 50% dell'ADP-ribosilazione della transducina bovina marcata con

[³²P] indotto da 50 ng di PT.

b Conti per minuto (cpm).

Come mostrato nella Figura 1 e tabella VI i sieri di volontari adulti vaccinati con il doppio mutante PT-9K/129G sono capaci di inibire completamente l'attività enzimatica di 50 ng di PT.

ESEMPIO 3

Produzione e purificazione della emagglutina filamentosa (FHA)

La FHA viene secreta nel supernatante di coltura di

B.pertussis W28-9K/129G che produce il doppio mutante PT-9K/129G o di PT B.pertussis W28 Δ Tox, che non produce PT, descritti nella domanda di brevetto italiano 19286.

La proteina viene purificata a partire dal supernatante di coltura da cui viene purificato anche il doppio mutante PT-9K/129G usando la stessa colonna di idrossilapatite oppure dal

supernatante della coltura di B.pertussis W28 Δ Tox preparando ex novo una colonna di idrossilapatite. Immediatamente dopo l'eluizione del doppio mutante PT-9K/129G effettuata a 8°C con tampone fosfato con forza ionica e pH riportati nell'esempio 1 di questa domanda di brevetto, la FHA viene eluita impiegando un tampone fosfato 0,1 M pH 8,0 contenente una concentrazione finale 0,5 M di NaCl. Nel caso in cui invece si proceda alla preparazione e purificazione della FHA partendo dal supernatante di coltura di B.pertussis W28 Δ Tox si procede direttamente all'applicazione del supernatante nella colonna di idrossilapatite superando lo stadio relativo alla purificazione del doppio mutante PT-9K/129G e operando come descritto sopra. Le frazioni di eluizione contenenti la FHA vengono riunite e precipitate a 4°C per una notte con solfato di ammonio alla concentrazione finale del 70% di saturazione. Il precipitato viene centrifugato ed il pellet ottenuto viene risospeso in tampone TRIS HCl 50 mM pH 8,0 contenente NaCl 0,5 M.

ESEMPIO 4

Produzione e purificazione della proteina 69 Kd

La proteina 69Kd viene ottenuta purificando un estratto cellulare di B.pertussis W28-9K/129G o di B.pertussis W28 Δ Tox. L'estratto cellulare viene preparato essenzialmente secondo Brennan et al. [(Infect. Immun. 56 : 3189 - 3195 (1988))]. Il pellet cellulare proveniente da 20 - 40 litri di coltura, viene sospeso in 9 litri di tampone TRIS - HCl 10 mM,

pH 8,0 contenente 0,15 M NaCl e, sotto blanda agitazione, riscaldato a 60°C per 1 ora.

Dopo raffreddamento a 10°C la sospensione viene centrifugata a 18.000 rpm (rotore JCF-Z, Beckman) ed al risultante supernatante viene aggiunto solfato di ammonio fino ad una concentrazione finale di 2M. Si centrifuga a 9.500 rpm ed il pellet viene estratto sospendendolo sotto blanda agitazione per 15' a 4°C in 100 ml di una soluzione di dietanolammina 50 mM, pH 8,8 (tampone A).

L'operazione viene ripetuta ancora una volta. Gli estratti centrifugati vengono sottoposti a dialisi contro tampone A.

Dopo centrifugazione il dializzato viene applicato su una colonna mono Q preparativa (colonna cromatografica a scambio anionico della Pharmacia, Uppsala, Svezia) equilibrata con tampone A. La colonna viene eluita con gradiente di NaCl 0,1 M in tampone A.

Le frazioni contenenti la proteina 69Kd OMP vengono riunite, portate a 4°C, precipitate aggiungendo solfato di ammonio fino ad una concentrazione finale pari a 2 M e lasciate a sedimentare per una notte. Il precipitato viene dializzato contro tampone A contenente 300 mM NaCl e sottoposto a gel filtrazione su una colonna di Sephacril HR200 (Pharmacia) equilibrata con lo stesso tampone.

Usando questo metodo di purificazione la resa è di circa 100-120 mg di 69Kd per 20 litri di supernatante derivante siada

colture di B.pertussis W28-9K/129G che da B.pertussis W28 Δ Tox.

ESEMPIO 5

Caratterizzazione delle proprietà chimico-fisiche della FHA e della 69Kd

A) Profilo elettroforetico

Le proprietà chimico-fisiche della FHA e 69Kd purificate sono determinate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (8% per la FHA e 12,5% per la 69Kd), in sodio dodecil solfato (SDS) operando come descritto da Laemmli U.K. (1970) Nature, 227 : 680-685. Il gel viene colorato con Comassie blue R250. I risultati riportati in figura 2 mostrano il profilo elettroforetico di PT-9K/129G (corsia A), di 69Kd (Corsia B) e FHA (Corsia C) purificate. Sul margine sinistro in basso sono riportate le bande caratteristiche delle 5 subunità della PT. Come si vede nella preparazione di FHA (Corsia C) è presente una singola banda del peso molecolare di circa 200 kilodaltons ed in quella di 69Kd (Corsia B) una singola banda del peso molecolare di circa 69 kilodaltons. Un più accurato controllo effettuato mediante analisi Western blotting (Towbin H.T. et al., Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 1976, 73 : 361-365) utilizzando anticorpi specifici per PT, FHA e 69Kd ha confermato la completa assenza, nelle preparazioni di FHA o 69Kd di proteine contaminanti.

Le proteine FHA e 69Kd mostrano una purezza del 99%.

B) Analisi della composizione aminoacidica

L'analisi dei residui aminoacidici della FHA e 69Kd viene effettuata come descritto da Spackman D. H. et al., Anal.Chem., 1958, 30 : 1190-1206.

L'idrolisi acida delle proteine è condotta in HCl 6N a 110°C per 24 ore, in fiale chiuse sotto vuoto. Quindi l'analisi aminoacidica è effettuata utilizzando l'analizzatore di aminoacidi (Kontron, Zurigo, svizzera). I valori riportati in tabella VII ed espressi come rapporto molare aminoacido/proteina sono in accordo con quelli teorici dedotti dalle strutture primarie delle suddette proteine.

TABELLA VII Composizione aminoacidica della FHA e 69 Kd purificate

Rapporto molare aminoacido/proteina

Aminoacido	Teorico ^a		Trovato ^b	
	FHA	69 Kd	FHA	69 Kd
Asp	227	59	227.7	57.6
Thr	128	38	122.5	38.3
Ser	168	43	146.7	42.2
Glx	185	57	188.3	60.9
Pro	45	43	54.71	52.8
Gly	296	101	292.2	88.9
Ala	339	97	331.0	91.7
1/2 (Cys) ₂	3	0	-	-
Val	208	56	206.9	58.7
Met	25	4	28.7	3.9
Ile	83	22	76.4	23.3
Leu	198	61	199.8	61.1
Tyr	29	7	29.2	6.9
Phe	27	14	26.3	12.3

NH ₃	200	51	191.4	52.4
Lys	98	14	97.7	13.7
His	41	11	36.6	11.9
Arg	126	40	129.3	35.7

a Valori teorici dedotti dalla struttura primaria della proteina

b Residui amminoacidici trovati nelle preparazioni purificate

ESEMPIO 6

Caratterizzazione in vitro della FHA

A) Emagglutinazione

Il saggio di emagglutinazione viene effettuato come descritto da Sato Y. et al. Infect.Immun., 1983, 41: 313-320 usando come cellule bersaglio eritrociti di pollo fissati con gluteraldeide. I risultati espressi come dose di FHA che causa completa agglutinazione di eritrociti mostrano che la dose minima agglutinante è di 100-150 ng per pozzetto.

ESEMPIO 7

Trattamento con formaldeide della FHA e della 69Kd

La FHA e la 69 Kd purificate come descritto rispettivamente negli esempi 3 e 4 vengono dializzate contro PBS pH 7.4 contenente lisina 0,025 M (Ajinomoto, Tokio, Giappone) e mertiolato 0,01% (ELANCO, USA) per 24 ore a 4°C e quindi risolubilizzate in PBS. Dopo determinazione del contenuto proteico (Lowry O.H. et al. J.Biol.Chem., 1951, 193 : 265-275) le miscele vengono addizionate con formaldeide (soluzione al 4%

in PBS pH 7,4 contenente NaCl 0,5 M) così da ottenere un rapporto finale di 0,3 tra proteine e formaldeide. Le miscele risultanti sono incubate a 37° C per 48 ore e poi dializzate ripetutamente contro PBS. Quindi le miscele vengono saggiate per determinare il contenuto in formaldeide libera che risulta inferiore allo 0.01% (peso/volume).

La FHA stabilizzata in questo modo mantiene la stessa attività emoagglutinante delle molecole non trattate con formaldeide. Inoltre, l'elettroforesi su gel di poliacrilammide mostra una banda principale a 200 Kd e alcune bande con peso molecolare superiore derivanti dal trattamento con formaldeide. Dopo stabilizzazione con formaldeide non si osserva la tipica degradazione della FHA. Al contrario la FHA non stabilizzata con formaldeide, mantenuta a 4° C o congelata mostra un profilo elettroforetico contraddistinto da una progressiva scomparsa della banda a 200 Kd e la comparsa di prodotti di degradazione a più basso peso molecolare (Figura 2, Corsia 3) che sono stati confermati nell'analisi Western immunoblotting come derivanti dalla banda principale di FHA a 200 Kd.

In seguito a trattamento con formaldeide, la proteina 69Kd rispetto a quella non stabilizzata mostra una lieve seppure più diffusa banda a 69 Kd. La proteina 69Kd, trattata con formaldeide, è stabile per 30 giorni a 37° C. Al contrario quella non trattata e mantenuta a 4° C e 20° C per 15 giorni va incontro ad una progressiva degradazione.

ESEMPIO 8

Sviluppo di vaccini acellulari antipertosseA) Formulazione di vaccini monovalenti

Composizione per dose				
Lotto Vaccino	PT-9K/129G (µg)	FHA (µg)	69Kd (µg)	Al(OH) ₃ (mg) ³
A (D5/FA)	15	-	-	0.5
B (PT-FHA/1)	10	15	-	0.5
C (PFK/1)	7.5	10	10	2
D (PFK/2)	7.5	10	10	0.5
E (D9/Fa)	5	-	-	0.5
G (D9/Fb)	10	-	-	0.5
H (PFK/4)	7.5	5	5	0.5

B) Formulazione di vaccini trivalenti (DPT)

Composizione per dose							
Lotto Vaccino	PT-9K/129G (µg)	FHA (µg)	69Kd (µg)	Tossoide Difterico (Lf)	Tossoide Tetanico (Lf)	Al(OH) ₃ (mg)	AlPO ₄ (mg Al)
A (DPT1/P/A)	15	-	-	30	15	2	-
B (DPT/H)	5	-	-	15	10	2	-
C (DPT/M)	10	-	-	15	10	2	-
D (DPT/A4)	15	-	-	15	10	2	-
E (DPT2/PF/A)	10	15	-	30	15	2	-
F (DPT/AF/1)	15	-	-	15	10	1	0.3
G (DPT4/P/AH)	10	-	-	15	10	1	-
H (DPT7/PFK/AH)5	5	5	3	20	12.5	1	-
I (DPT8/PFK/AF)5	5	5	5	15	10	-	0.3
L (DPT5/P/AF)	10	-	-	15	10	-	0.3
M (DPT/G) ^a	10	-	-	15	10	1	-
N (DPT6/P/AH)	10	-	-	20	12.5	1	-
O (DPT9/PFK/AH) 5	5	5	3	20	12.5	2	-
P (DPT10/PFK/AH)5	5	2.5	2.5	20	12.5	1	-

Q (DPT11/PFK/AH)5	2.5	2.5	20	12.5	-	-
-------------------	-----	-----	----	------	---	---

a PT-9K/129G trattato con lo 0.07% di formaldeide pari ad un rapporto proteina/formaldeide di 0.15

ESEMPIO 9

Sperimentazione preclinica in vivo di vaccini acellulari antipertosse.

A) Analisi della immunogenicità in cavia

Allo scopo di investigare l'immunogenicità dei vaccini acellulari, gruppi di 6 porcellini d'India di 4 settimane, con un peso pari a 350 g, sono inoculati per via sottocutanea (s.c.) con 0,5 ml di soluzione fisiologica (salina) sterile apirogena contenente 0,001 mg di sodio-etil-mercurio tiosalicilato e differenti dosi di vaccino adsorbito. Dopo 4 settimane dal primo inoculo si effettuano dei prelievi di sangue e gli animali sono nuovamente inoculati per via s.c. con le stesse dosi di vaccino. Dopo 2 settimane dal secondo inoculo vengono effettuati altri prelievi di sangue. I sieri ottenuti dai campioni prelevati sono quindi saggiati mediante test ELISA, per determinare il titolo anticorpale anti-PT, anti-FHA ed anti-69Kd e mediante saggio CHO per determinare la capacità degli anticorpi di neutralizzare la tossicità della PT wild type.

Il saggio ELISA, che è una versione modificata di quella descritta da Engvall e Perlmann (J.Immunol., 109 : 129-135, 1972) è condotto come segue.

In ciascun pozzetto di una micropiastra in polistirene a fondo piatto (Dynatech, Laboratories Inc. Alexandria, VA) sono introdotti 200 µl di PBS pH 7,4 contenenti 1 µg di PT o 1 µg di FHA o 1 µg di 69Kd purificata. L'adsorbimento dell'antigene sulla fase solida viene effettuato in una camera umidificata a 37° C per 3 ore e poi a 4° C per una notte. Dopo minimizzazione dell'adsorbimento non specifico delle proteine seriche alla plastica con 1% di BSA in PBS, i campioni di siero ottenuti dai porcellini d'India e diluiti serialmente fino a 1:9120 con PBS addizionato con 0,05% Tween-20, sono introdotti in ciascun pozzetto delle micropiastre e incubati per 2 ore a 37° C. Al termine, anticorpi IgG di capra anti-porcellino d'India coniugati con fosfatasi alcalina (Miles, Yeda, Israele), diluiti 1:3000 in PBS 0,05% Tween-20, sono introdotti in ciascun pozzetto e le piastre sono incubate a 37° C per 2 ore. Volumi di 100 µl sono utilizzati in tutti gli steps e 200 µl per i lavaggi delle piastre tra una incubazione e l'altra. Questi sono effettuati per tre volte impiegando PBS contenente 0,05% tween 20 e 0,02% NaN_3 . La reazione colorimetrica, che si sviluppa a temperatura ambiente in 30 minuti dopo aggiunta del substrato specifico (p-nitrofenilfosfato), 1mg/ml, viene letta a 405 nm in un Titertek Multiskan (Flow Laboratories, McLean, VA).

Controlli per ogni piastra includono pozzetti con campioni di siero privi dell'antigene e viceversa. I titoli anticorpali

sono valutati riportando in un grafico (ascissa) le diluizioni del siero saggiato in duplicato contro la media delle rispettive assorbanze (ordinate). L'intersezione tra la retta passante per il punto di flesso e l'asse di assorbanza rappresenta il valore dell'assorbanza del siero non diluito (ABS-MAX). I valori di ABS-MAX ottenuti per ogni gruppo di animali immunizzati con differenti dosi di antigene sono confrontati dopo ciascun prelievo con i rispettivi sieri pre-immuni. L'incremento di ABS-MAX è considerato statisticamente significativo quando è almeno 4 volte più elevato del valore ottenuto per un siero pre-vaccinazione. I risultati ottenuti con alcuni lotti di vaccini acellulari sono riportati in tabella VIII.

TABELLA VIII

Titolo anticorpale (IgG ELISA) e neutralizzante (CHO) nel siero di cavia immunizzate con una o due dosi dei vaccini acellulari trivalenti DPT1/P/A e DPT2/PF/A.

VACCINO	DOSE (µg) PT/FHA	TITOLO ELISA ^a				TITOLO NEUTRALIZZANTE ^b	
		POST 1/PRE		POST 2/PRE		POST 1	POST 2
		PT	FHA	PT	FHA	PT	PT
DPT1/P/A	15/-	24	-	29	-	1/80	1/640
	5/-	23	-	28	-	1/20	1/320
	1,6/-	21	-	23	-	1/10	1/160
DPT2/PF/A	10/15	29	36	34	44	1/20	1/320
	3.3/5	25	34	30	40	1/20	1/160
	1.1/1.6	23	33	26	38	1/10	1/80

a) Il titolo ELISA viene espresso come ABS-MAX del siero indiluito

b) Il titolo neutralizzante viene espresso come diluizione del siero di cavia capace di neutralizzare l'effetto tossico della PT wild type su cellule CHO.

Come si può osservare dalla Tabella VIII i sieri prelevati dopo 4 settimane dal primo inoculo mostrano valori di assorbanza (ABS-MAX) a 405 nm che sono, a seconda del vaccino impiegato e dipendentemente dalla dose iniettata, circa 21-24 e 23-29 (anti-PT) e 33-36 (anti-FHA) più elevati di quelli determinati

prima dell'immunizzazione. Un ulteriore incremento è osservato per i sieri prelevati dopo due settimane dal secondo inoculo.

L'incremento del titolo anticorpale osservato dopo l'immunizzazione con i vaccini acellulari, correla con l'attività neutralizzante determinata nel saggio CHO effettuato secondo quanto descritto da Gillenius P. et al., J.Biol.Stand., 1985, 13:61-66; Gandstrom M. et al., J.Infect.Dis., 1985, 151:646-649. Infatti i sieri ottenuti dopo una singola iniezione sono capaci di neutralizzare l'effetto agglutinante sulle cellule CHO indotto da 120 pg di PT. La capacità di neutralizzare la tossina aumenta notevolmente dopo la seconda immunizzazione.

B) Analisi della potenza dei vaccini acellulari antipertosse in topi

Gruppi di 16 topi maschi CD1 (Charles river, Calco, Italia) di 3-4 settimane, con un peso pari o circa pari a 16 g, sono inoculati i.p. in accordo alla normativa dell'OMS con 0,5 ml di soluzione salina sterile contenenti differenti dosi di PT-9K/129G, FHA e 69Kd a seconda della formulazione del vaccino impiegato adsorbito su adiuvante. Come controllo positivo, gruppi di topi sono inoculati i.p. con 0,00032, 0,001, 0,008 e 0,04 ml di vaccino cellulare antipertosse standard (National Institute of Health, Bethesda, MD). Dopo 14 giorni dalla somministrazione i topi sono infettati intracerebralmente (IC) con una sospensione di B.pertussis virulenta (ceppo 18323,

Sclavo S.p.A.) contenente 300 dosi letali medie.

I topi sono quindi tenuti sotto osservazione per 14 giorni. La potenza antitetanica viene valutata in topo e la potenza antidifterica viene valutata in cavia in accordo alla normativa dell'OMS.

I risultati della potenza antitetanica ed antidifterica vengono espressi in unità internazionali per ml (UI/ml) in riferimento al vaccino cellulare standard.

I risultati di alcuni lotti descritti nell'esempio 8 sono riportati in Tabella IX e X.

TABELLA IX

Potenza antipertossica in topo dei vaccini monovalenti acellulari adsorbiti
(Punto A dell'esempio 8)

Vaccino cellulare ^a		Vaccino acellulare				
Dose (ml)	Sopravv.	Lotto	PT-9K/129G (µg)	FHA (µg)	69Kd (µg)	Sopravv ^b
0.04	16/16	A	30	-	-	14/16
0.008	13/16		6	-	-	14/16
0.001	9/16		1.2	-	-	8/16
0.0003	1/16		0.24	-	-	2/16
0.04	12/16	B	10	15	-	7/16
0.008	6/16		3.3	5	-	6/16
0.001	3/16		1.1	1.6	-	7/16
0.0003	0/16		0.3	0.5	-	2/16
0.04	10/16	C	7.5	10	10	15/16
0.008	2/16		2.5	3.3	3.3	15/16
0.001	0/16		0.83	1.1	1.1	12/16
0.04	10/16	D	7.5	10	10	15/16

0.006	2/16		2.5	3.3	3.3	15/16
0.001	0/16		0.83	1.1	1.1	12/16
0.04	9/16	E	5	-	-	11/16
0.008	4/16		1	-	-	1/16
0.001	0/16		0.2	-	-	0/16
0.04	9/16	F	10	-	-	10/16
0.008	4/16		2	-	-	1/16
0.001	0/16		0.4	-	-	0/16

Lotto H = in corso di sperimentazione

a Il vaccino contiene 8 unità internazionali protettive per ml (UI/ml)

b I valori sono espressi come numero di topi sopravvissuti su un totale di 16 topi infettati per via intracerebrale.

TABELLA X

Potenza antipertossica in topo di vaccini trivalenti (DPT) acellulari adsorbiti
(Punto B esempio 8)

Vaccino cellulare ^a			Vaccino Acellulare					
Dose (ml)	Sopravv.	Lotto	PT-9K/129G (µg)	FHA (µg)	69Kd (µg)	Toss. Dift (Lf)	Toss. Tet. (Lf)	Sopravv. ^b
0.04	9/16	A	15	-	-	30	15	6/16
0.008	2/16		5	-	-	10	5	5/16
0.001	0/16		1.66	-	-	3.3	1.66	4/16
						81 ^c	762 ^d	
0.04	9/16	B	5	-	-	15	10	9/16
0.008	4/16		1	-	-	3	2	4/16
0.001	0/16		0.2	-	-	0.6	0.4	0/16
						100 ^c	237 ^d	
0.04	9/16	C	10	-	-	15	10	10/16
0.008	4/16		2	-	-	3	2	5/16
0.001	0/16		0.4	-	-	0.6	0.4	1/16

						96 ^c	216 ^d	
0.04	14/16	D	15	-	-	15	10	6/16
0.008	9/16		5	-	-	5	33	10/16
0.001	0/16		1.6	-	-	1.6	1.1	8/16
						89 ^c	485 ^d	
0.04	9/16	E	10	15	-	30	15	8/16
0.008	2/16		3.3	5	-	10	5	11/16
0.001	0/16		1.1	1.6	-	3.3	1.66	10/16
						76 ^e	1115 ^c	
0.04	14/16	F	15	-	-	15	10	6/16
0.008	9/16		5	-	-	5	3.3	8/16
0.001	0/16		1.6	-	-	1.6	1.1	8/16
						93 ^e	273 ^c	
0.04	16/16	M	15	-	-	15	10	15/16
0.008	7/16		5	-	-	5	3.3	15/16
0.001	0/16		1.6	-	-	1.6	1.1	7/16
			0.5	-	-	0.5	0.3	1/16
						ND ^e	281 ^d	

Lotti G, H, I, L, N, O, P, Q in corso di sperimentazione

a) Il vaccino contiene 8 UI/ml

b) I valori sono espressi come numero di topi sopravvissuti su un totale di 16 topi saggiati

c) Titolo antidifterico espresso in UI/ml

d) Titolo anitetanico espresso in UI/ml

e) ND = Non Determinato (in corso di sperimentazione)

La preparazione in bulk dei vari lotti di vaccino adsorbito viene eseguita in contenitori sterili di vetro pirex muniti di agitatore, miscelando quantità idonee dei vari componenti

antigenici, di alluminio o fosfato idrossido come adiuvante e di soluzione fisiologica sterile apirogena contenente sodio etil-mercurio-tiosalicilato allo 0,01%, come preservante, in modo da ottenere la formulazione proposta per dose. dopo accurata miscelazione, viene prelevato un campione della sospensione per il controllo di sterilità. Ad esito favorevole ciascun lotto di vaccino è inviato al reparto infialamento. La distribuzione nei contenitori finali (0,5 ml per fiala) è compiuta in apposito reparto dotato di area sterile e di sterilizzatori completi di programmazione automatica, registrazione della temperatura e dispositivo di raffreddamento. L'infialamento e la chiusura dei contenitori finali sono eseguiti con infialatrice a fiale chiuse e saldatrice automatica. il prodotto infialato è trasferito nella zona refrigerata di quarantena (cella frigorifera a +5°C) in attesa del risultato di sterilità e dei controlli qualitativi e quantitativi.

RIVENDICAZIONI

1. Vaccini acellulari contro la pertosse contenenti un doppio mutante non tossico della tossina della pertosse, emagglutina filamentosa (FHA), proteina di 69 kilodaltons (69Kd) e vettori farmaceuticamente accettabili eventualmente in associazione con anatossina difterica e/o tetanica.
2. Vaccini acellulari contro la pertosse secondo la rivendicazione 1 in cui l'emagglutina filamentosa (FHA) e

antigenici, di alluminio o fosfato idrossido come adiuvante e di soluzione fisiologica sterile apirogena contenente sodio etil-mercurio-tiosalicilato allo 0,01%, come preservante, in modo da ottenere la formulazione proposta per dose. dopo accurata miscelazione, viene prelevato un campione della sospensione per il controllo di sterilità. Ad esito favorevole ciascun lotto di vaccino è inviato al reparto infialamento. La distribuzione nei contenitori finali (0,5 ml per fiala) è compiuta in apposito reparto dotato di area sterile e di sterilizzatori completi di programmazione automatica, registrazione della temperatura e dispositivo di raffreddamento. L'infialamento e la chiusura dei contenitori finali sono eseguiti con infialatrice a fiale chiuse e saldatrice automatica. il prodotto infialato è trasferito nella zona refrigerata di quarantena (cella frigorifera a +5°C) in attesa del risultato di sterilità e dei controlli qualitativi e quantitativi.

RIVENDICAZIONI

1. Vaccini acellulari contro la pertosse contenenti un doppio mutante non tossico della tossina della pertosse, emagglutina filamentosa (FHA), proteina di 69 kilodaltons (69Kd) e vettori farmaceuticamente accettabili eventualmente in associazione con anatossina difterica e/o tetanica.
2. Vaccini acellulari contro la pertosse secondo la rivendicazione 1 in cui l'emagglutina filamentosa (FHA) e

- la proteina di 69 kilodaltons (69Kd) sono ottenute da un ceppo di Bordetella pertussis in cui il gene della tossina della pertosse è stato deleto (B.pertussis Δ Tox) o modificato in modo che produca una PT non tossica.
3. Vaccini secondo le rivendicazioni 1 e 2 in cui il mutante non tossico della tossina della pertosse contiene nella sequenza aminoacidica della subunità S1 la sostituzione di Glu 129 e di almeno un qualsiasi altro aminoacido della subunità, la cui sostituzione provochi una diminuzione della tossicità del mutante, con aminoacidi naturali.
 4. Vaccini secondo la rivendicazione 3 in cui nella sequenza aminoacidica della subunità S1 Glu 129 è stato sostituito con Gly.
 5. Vaccini secondo la rivendicazione 4 in cui nella sequenza aminoacidica della subunità S1 è stato sostituito l'aminoacido Arg 9.
 6. Vaccini secondo la rivendicazione 5 in cui Arg 9 è stato sostituito con Lys.
 7. Vaccini secondo la rivendicazione 4 in cui nella sequenza aminoacidica della subunità S1 è stato sostituito l'aminoacido Trp 26.
 8. Vaccini secondo la rivendicazione 7 in cui Trp 26 è stato sostituito con Ile.
 9. Vaccini secondo la rivendicazione 4 in cui nella sequenza aminoacidica della subunità S1 è stato sostituito

- l'aminoacido Arg 13.
- 10.Vaccini secondo la rivendicazione 9 in cui Arg 13 è stato sostituito con Leu.
- 11.Vaccini secondo la rivendicazione 4 in cui nella sequenza aminoacidica della subunità S1 sono stati sostituiti gli aminoacidi Asp 11 e Trp 26.
- 12.Vaccini secondo la rivendicazione 11 in cui Asp 11 è stato sostituito con Ser e Trp 26 con Ile.
- 13.Mutante atossico della tossina della pertosse contenente nella sequenza aminoacidica della subunità S1 la sostituzione di Glu 129 e di almeno un qualsiasi altro aminoacido della subunità, la cui sostituzione provochi una diminuzione della tossicità del mutante, con aminoacidi naturali.
- 14.Mutante secondo la rivendicazione 13 in cui Glu 129 è stato sostituito con Gly.
- 15.Mutanti secondo le rivendicazioni 13 - 14 stabilizzati mediante trattamento con 0,035% - 0,7% di formaldeide (percentuale peso/volume).
- 16.Ceppi di Bordetella pertussis in cui il gene cromosomale della pertosse codifica per i mutanti descritti nelle rivendicazioni 13 - 14.
- 17.Processo per la preparazione di FHA e 69Kd in cui si utilizza un ceppo di Bordetella pertussis il cui gene per la

tossina della pertosse è stato deleto (B.pertussis Δ Tox) o modificato in modo che produca una PT non tossica.

18.Processo per la preparazione di FHA e 69Kd in cui un ceppo secondo la rivendicazione 16 è coltivato in un mezzo di coltura liquido e gli antigeni così ottenuti vengono isolati e purificati.

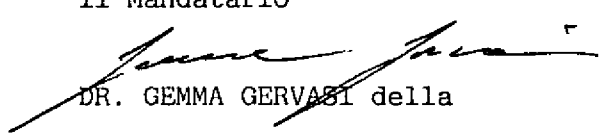
19.Uso degli antigeni ottenuti secondo il processo della rivendicazione 18 come principi attivi per la preparazione di vaccini acellulari antipertosse monovalenti.

(BRI/sa)

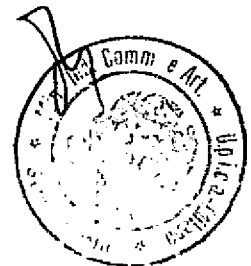
Milano, li **21 GIU. 1990**

P. SCLAVO S.p.a.

Il Mandatario


DR. GEMMA GERVASI della

NOTARBARTOLO & GERVASI S.r.l.

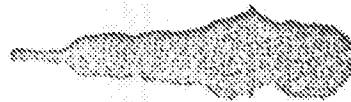


1 2 3 4 5 6

RR



CC



20710A/90

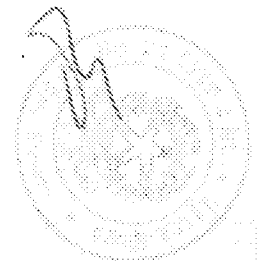
VII



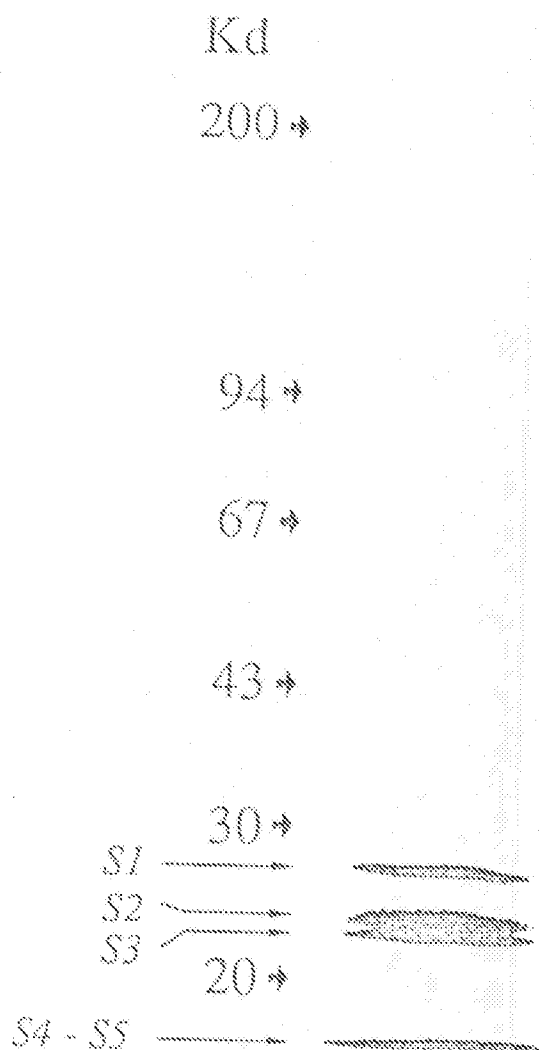
10 30 90 270 810 2430

RECIPROCO DI DILUIZIONE DEL SIERO

Fig.1



A B C



2071 0A/90

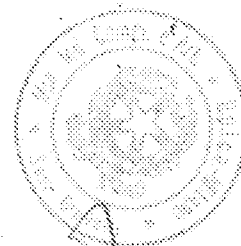


Fig. 2