

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 650 184

②1 N° d'enregistrement national :

89 10234

⑤1 Int Cl⁵ : A 61 K 39/02.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 28 juillet 1989.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 5 du 1^{er} février 1991.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *MEDICINSKA AKADEMIA*. — BG et
*NAUCHNO-ISSLEDOVATELSKI INSTITUTE PO EPIDEMIO-
LOGIA I MICROBIOLOGIA « N.F. GAMALEA »*. — SU.

⑦2 Inventeur(s) : Lyudmila Julina-Zlateva ; Valentin Ivanov
Zlatev ; Svetoslav Lyubomirov Todorov ; Margarita Stepa-
novna Zaharova ; Inga Paruyrovna Amelina.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Malémont.

⑤4 Procédé pour la préparation d'antigènes protecteurs de la coqueluche.

⑤7 Le procédé selon l'invention est mis en œuvre en culti-
vant des microbes sur un milieu solide ou liquide, en rinçant la
masse microbienne ainsi obtenue avec une solution isotonique
de chlorure de sodium, puis, pour inactiver la suspension
microbienne, en ajoutant de l'acide itaconique ayant une
concentration finale dans la suspension microbienne de 3,75 à
13 mg/ml et un pH de 3,7 à 4,2. L'exposition inactivante a lieu
pendant 1 à 4 heures. Pendant le traitement, la masse micro-
bienne précipite d'elle-même. Après la décantation du liquide
hypersédimentaire, le dépôt est dilué avec une solution isoto-
nique de chlorure de sodium.

Ce procédé ne nécessite ni chauffage ni centrifugation. Il
est destiné à la production de vaccin absorbé DPT.

FR 2 650 184 - A1

Procédé pour la préparation d'antigènes protecteurs de la coqueluche

L'invention concerne un procédé pour la préparation d'antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche, servant à la production de vaccin absorbé DPT destiné au domaine médical.

5 On connaît un procédé pour obtenir des antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche, consistant à cultiver des microbes de la coqueluche dans la phase I à 36°C, sur un milieu d'agar de caséine et de carbone ou dans un milieu nutritif liquide, à rincer la masse microbienne du milieu d'agar de caséine et de carbone avec une solution isotonique de chlorure de sodium, à faire précipiter la masse microbienne
10 du milieu nutritif liquide par centrifugation ou avec de l'acide chlorydrique puis à effectuer une centrifugation et une décantation du liquide hypersédimentaire, à diluer le précipité avec une solution isotonique tamponnée de chlorure de sodium, à chauffer jusqu'à 56°C (ou sans chauffer), et effectuer un traitement avec du merthiolate pendant une période
15 de 10 à 14 jours jusqu'à quatre mois.

On connaît aussi un procédé pour l'obtention d'antigènes corpusculaires protecteurs de coqueluche, selon lequel la suspension microbienne est obtenue comme dans le premier procédé, mais elle est traitée avec
20 du formaldéhyde pendant 20 à 24 heures à la température ambiante. Ensuite, elle est centrifugée pour diminuer la concentration du formaldéhyde libre et est diluée avec une solution isotonique de chlorure de sodium contenant du merthiolate en tant qu'agent conservateur.

L'inconvénient des procédés connus pour la préparation d'antigènes corpusculaires protecteurs de coqueluche, réside en ce que les agents chimiques utilisés ont une action nocive sur les protéines des cellules microbiennes (le formaldéhyde réagissant avec leur groupes amino en provoquant une dénaturation et une coagulation tandis que les ions du mercure réagissent avec les radicaux sulfo et hydro) et, de cette
25 façon réduisent les propriétés de protection des antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche.
30

Par ailleurs, les procédés mis en oeuvre exigent un séjour prolongé et un contact des microbes avec un agent inactivant (de 10 jours à 4 mois) et une diminution ultérieure de sa concentration. Le traitement thermique utilisé, bien qu'il accélère dans une certaine mesure
35

la destruction des microbes, diminue en même temps l'activité protectrice et la stabilité du vaccin.

Un inconvénient considérable lors de l'obtention d'antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche dans un milieu nutritif liquide est la centrifugation obligatoire pour la séparation de la masse microbienne du milieu nutritif. Le remplacement de la centrifugation par la précipitation de la biomasse avec de l'acide chlorydrique diminue les propriétés protectrices et augmente la toxicité des antigènes et leur réactivité chez les enfants.

L'objet de l'invention est de proposer un procédé pour l'obtention d'antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche, qui permette d'augmenter les propriétés protectrices de ces antigènes, de diminuer leur toxicité et de réduire le temps nécessaire pour leur préparation.

Cet objet est atteint par un procédé de préparation d'antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche, dans lequel on cultive les microbes de la coqueluche, on prépare une suspension microbienne qui est inactivée par l'acide itaconique, puis après la précipitation consécutive de la masse microbienne, on fait décanter le liquide hypersédimentaire et on dilue le précipité bactérien avec une solution isotonique de chlorure de sodium.

Ce procédé est mis en oeuvre en cultivant les microbes sur un milieu nutritif solide ou liquide. La masse microbienne est rincée avec une solution isotonique de chlorure de sodium. La suspension microbienne ainsi obtenue est inactivée par l'addition d'acide itaconique à une concentration finale de 3,75 à 13 mg/ml et un pH de 3,7 à 4,2. L'exposition inactivante est effectuée pendant 1 à 4 heures. Pendant le traitement, la masse microbienne précipite d'elle même. Après la décantation du liquide hypersédimentaire, le précipité est dilué avec une solution isotonique de chlorure de sodium.

Les avantages du procédé selon l'invention sont les suivants : on obtient des antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche ayant une activité protectrice plus grande et des propriétés toxiques plus faibles ; le temps d'obtention de la préparation finale est réduit ; on élimine la nécessité de procéder à un chauffage et une centrifugation et par suite d'utiliser des équipements spéciaux.

L'invention sera décrite plus en détails en référence aux exemples ci-dessous .

EXEMPLE 1

5 On cultive les microbes de la coqueluche dans la phase I sur un milieu nutritif d'agar de caséine et de carbone, on rince la masse micro-
bienne avec une solution isotonique de chlorure de sodium, on la dilue
jusqu'à une concentration de 59 à 80 unités internationales d'opacité
(MEM/ml), on ajoute une solution d'acide itaconique jusqu'à une concen-
10 tration finale de 3,75 mg/ml et un pH de 3,7 à 4,2, on agite le mélange et
on laisse la suspension au repos pendant 4 heures à la température am-
biente et ensuite pendant la nuit à une température de 5° à 10°.

Lors du séjour des microbes, il se forme un dépôt cellulaire qui
peut être facilement désagrégé. Le jour suivant, on fait décanter le
15 liquide hypersédimentaire et on met le précipité cellulaire à nouveau
en suspension et on le dilue avec une solution isotonique de chlorure
de sodium jusqu'à sa concentration cellulaire initiale, le pH étant porté
de 7,0 à 7,2. La suspension microbienne ainsi préparée est une prépara-
tion d'antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche.

EXEMPLE 2

20 On réalise la suspension microbienne pour la préparation d'antigènes
corpusculaires protecteurs de la coqueluche comme décrit dans l'exemple I,
mais on inactive son pouvoir infectieux par une concentration d'acide
itaconique de 6,5 mg/ml, à un pH de 3,7 à 4,2, on laisse au repos pendant
25 2 à 3 heures à la température ambiante, on fait ensuite décanter le li-
quide hypersédimentaire à une température de 5 à 10°C le même jour ou le
matin suivant, puis on dilue le précipité avec une solution isotonique
de chlorure de sodium dont le pH est amené à une valeur de 7,0 à 7,2.

EXEMPLE 3

30 On prépare la suspension microbienne comme dans les exemples 1 et
2, mais on effectue l'inactivation avec de l'acide itaconique à une con-
centration de 13 mg/ml, à un pH de 3,7 à 4,2 et on laisse au repos pendant
35 1 à 2 heures. On fait décanter le liquide hypersédimentaire limpide le

même jour ou le jour suivant, on dilue le précipité avec une solution isotonique de chlorure de sodium jusqu'à une concentration cellulaire de 50 à 80 MEM/ml, à un pH de 7,0 à 7,2.

EXEMPLE 4

5 On cultive les microbes de la coqueluche dans la phase I sur un milieu semi-synthétique de Coen et de Viler (on peut éventuellement ajouter des résines échangeuses d'ions) pendant une période de 48 heures. On sépare la résine par filtration, on détermine la concentration des
10 microbes dans la suspension (elle est ordinairement de 40 à 50 MEM/ml), et on ajoute une solution d'acide itaconique jusqu'à une concentration finale de 5 mg/ml et un pH de 3,7. On inactive le pouvoir infectieux de la suspension à la température ambiante pendant 3 à 4 heures, puis on
15 laisse la suspension au repos pendant la nuit à une température de 5 à 10°C. Les cellules forment un précipité qui peut être facilement désagrégé. On sépare le liquide hypersédimentaire limpide et on dilue le précipité cellulaire jusqu'à la concentration microbienne nécessaire avec une solution isotonique tamponnée de chlorure de sodium ayant un pH de 7,2.

EXEMPLE 5

20 On prépare la suspension microbienne pour la préparation d'antigènes corpusculaires protecteurs de coqueluche comme dans l'exemple 4, mais on inactive le pouvoir infectieux à l'aide d'acide itaconique ayant une concentration finale de 10 mg/ml et un pH de 4,2, et on laisse au
25 repos à la température ambiante pendant 2 à 3 heures. On effectue ensuite le traitement de la suspension microbienne comme décrit dans l'exemple 4.

La préparation d'antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche (suspensions microbiennes) inactivées ainsi obtenus est contrôlée
30 en ce qui concerne son inactivation (stérilité spécifique) et sa pureté (absence de microflore associée) en effectuant la culture sur des milieux nutritifs, et en ce qui concerne l'innocuité par injection sous-cutanée à des souris. La toxicité et les propriétés protectrices sont vérifiées par des essais sur des souris suivant les procédés pour vaccin contre la coqueluche et vaccin adsorbé DPT.

35 Toutes les préparations d'antigènes corpusculaires protecteurs de

la coqueluche obtenues selon les cinq exemples sont des suspensions microbiennes homogènes de couleur blanc-lait et, au repos elles forment un dépôt qui peut être facilement désagréger. Les cellules microbiennes ont des propriétés morphologiques et tinctorielles typiques, et conservent leur agglutinabilité spécifique et leur aptitude à provoquer une agglutination des érythrocytes chez le mouton et l'homme.

L'efficacité de l'action bactéricide de l'acide itaconique est déterminée sur des suspensions microbiennes préparées à partir de plusieurs souches à des pH différents, à des températures de 5 à 10°C et de 20 à 22°C en fonction de la concentration de l'acide et du temps de l'exposition. Les cultures des suspensions bactériennes diluées sont réalisées après 1, 2, 3, 4, 16 et 18 heures dans une boîte de Pétri sur un milieu nutritif d'agar de caséine et de carbone contenant 5 % de sang humain. Les résultats sont relevés après 5 jours. Pendant les expérimentations, on a établi que dans des conditions déterminées, le processus d'altération des cellules peut être terminé pour 1 à 4 heures. La précipitation des cellules pour une concentration de l'acide itaconique de 10 à 13 mg/ml et un pH de 3,7 cesse ordinairement après 3 à 4 heures. En employant une concentration plus faible, ce délai est prolongé (la suspension est laissée au repos jusqu'au matin à une température de 5 à 10°C). Parmi les différentes couches bactériennes, on remarque certaines petites différences dans les délais de formation des précipités.

Les propriétés toxiques des préparations d'antigènes corpusculaires protecteurs de coqueluche obtenues d'après le procédé selon l'invention sont déterminées 10 à 30 jours après leur obtention par les tests suivants : augmentation de la masse du corps des souris et après l'activité stimulante de la lymphocytose (LPF) en comptant le nombre de lymphocytes dans le sang périphérique à la suite de l'injection de la préparation.

Au cours des essais, on utilise des souris ayant un poids de 14 à 16 g. Les antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche sont injectés par voie intrapéritonéale à raison de 10 MEM dans un volume de 0,5 ml, notamment, on introduit une dose unique pour enfant. On injecte une solution isotonique de chlorure de sodium aux souris de contrôle. Les souris sont pesées tous les jours pendant 7 jours.

Selon les exigences de l'OMS, après l'injection sur chaque souris

d'au moins la moitié de la dose unique d'immunisation d'un vaccin pour enfant, le poids total du groupe de souris au 3ème jour doit être le même que le poids initial tandis qu'au 7ème jour, il ne doit pas être inférieur à 60 % du poids des souris de contrôle. La perte ne doit pas être supérieure à 5 %.

L'injection d'antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche obtenus après une inactivation avec de l'acide itaconique des microbes cultivés sur un milieu d'agar de caséine et de carbone ou dans un milieu nutritif liquide, même en utilisant des doses d'injection plus grandes, ne provoque par une diminution du poids des souris pendant les deux premiers jours. L'augmentation de la masse du poids au 7ème jour est dans les limites de 68,9 à 91,8 % (voir le tableau joint en annexe). On n'observe pas de perte des souris.

Ces données montrent déjà que du 11ème au 30ème jour, les antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche ainsi préparés, non seulement correspondent aux exigences de l'OMS en ce qui concerne la toxicité, mais encore ils les surpassent.

Les antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche ont une faible activité stimulante de la lymphocytose, dans certaines préparations, cette activité est inférieure à celle d'un vaccin préparé suivant le procédé préconisant une précipitation avec de l'acide chlorhydrique (voir le tableau 1).

Les propriétés protectrices des antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche sont déterminées d'après la dose ED50, dose garantissant la survie de 50 % des souris d'essai. A cet effet, les souris sont immunisées par voie intrapéritonéale 3 fois avec les préparations étudiées qui sont diluées 5 fois et, après 14 jours leurs cerveaux sont contaminés par des microbes de la coqueluche virulents vivants (une dose qui n'est pas inférieure à 100 LD₅₀). Pour chacun des essais, on introduit des vaccins préparés suivant les procédés décrits dans l'introduction, à partir des mêmes suspensions microbiennes que celles à partir desquelles sont préparés les antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche.

Les antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche préparés selon le procédé proposé ont une activité protectrice plus élevée en comparaison avec les vaccins préparés avec du formaldéhyde et du merthiolate.

La dose ED_{50} de la préparation proposée ordinairement est supérieure à la dose ED_{50} des vaccins indiqués de 2,3 à 5,3 fois (voir tableau 1).

5 Il faut préciser que l'acide itaconique utilisé pour l'inactivation de la suspension microbienne représente un acide organique qui est un produit intermédiaire naturel du métabolisme cellulaire des animaux et des plantes et qui entre dans le cycle cellulaire des acides tri-carboxyliques. Cette substance est toxique uniquement envers les microbes de la coqueluche.

10 On notera ci-après l'état antérieur de la technique pris en considération pour la mise au point de la présente invention et auquel on pourra se référer pour avoir de plus amples informations:

1. Zaharova, M.C. "Vaccin associé DPT. Manuel sur les vaccins et sérums". - 1978, Moscou, éd. "Medizina", 164 P.
2. Comité des experts de l'OMS sur la standardisation (normalisation) des préparations biologiques, Rapports Techniques, 638, rapport 12, 15 1982, 65 P, OMS, Genève.
3. Minimum requirements of biological products. Ministry of Health and Wlf., Japan. Government, 1982, P. 123 - 125.

TABLEAU 1

Propriétés toxiques et protectrices des antigènes
corpusculaires protecteurs de la coqueluche.

Préparation N°	Caractéristique de la préparation		Toxicité		Propriétés de protection	
	Souche N°	Conc. de l'ac. itaconique mg/ml	Test du poids des souris %	LPF	ED ₅₀ (ml)	Activité relative
	(1 ⁺)	(2 ⁺)	(3 ⁺)	(4 ⁺)	(5 ⁺)	(6 ⁺)
<u>Culture en milieu liquide</u>						
1.	222	10	91,6	1,38		
2.	41405	10	68,8	1,64	0,018	4,2
3.	"	10	81,3	1,19	0,031	2,2
4.	"	5	76,7	1,8	0,62	4,3
5.	"	HCl et thio- sersal	62,5	2,3	0,087	1,0
<u>Culture en milieu solide</u>						
6.	41405	13	74,5	2,4	0,06	1,8
7.	"	formaldéhyde	70,5	2,7	0,08	1,0
8.	41405	6,5	65,9	2,1	0,029	4,3
9.	"	formaldéhyde	75,3	1,7	0,13	1,0
10.	38	13	78,1	1,95	0,0165	3,6
11.	"	6,5	85,4	2,76	0,011	5,1
12.	"	formaldéhyde	75,5	1,34	0,06	1,0

Notes :

- (1⁺) : Souche n° 41405 de la Collection bulgare de microbes (Institut d'Etat pour le contrôle des médicaments)
- 5 : Souches n° 222 et 38 de la Collection des microbes de l'Institut d'Etat des recherches sur la normalisation et le contrôle des préparations médicales "Tarassevitch", USSR
- (2⁺) : Concentration de l'acide itaconique mg/ml
- (3⁺) : Test du poids, augmentation de la masse du corps
- 10 (4⁺) : Activité de stimulation de la leucocytose (LPF), augmentation des leucocytes dans le sang périphérique en comparaison avec les contrôles.

REVENDICATIONS

5 1. Procédé pour la préparation d'antigènes corpusculaires protecteurs de la coqueluche, consistant à cultiver les microbes, à préparer une suspension microbienne qui est inactivée puis, après la précipitation consécutive de la masse microbienne à faire décanter le liquide hypersé-
mentaire, et à diluer le précipité avec une solution isotonique de chlorure de sodium, caractérisé en ce qu'on réalise l'inactivation avec de l'acide itaconique.

10 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la concentration finale de l'acide itaconique dans la suspension microbienne est de 3,75 à 13 mg/ml tandis que le pH est de 3,7 à 4,2.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la suspension microbienne est mise au contact de l'acide itaconique pendant 1 à 4 heures.