



255146

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña

a la solicitud de

una PATENTE DE INTRODUCCION por DESA en ESPAÑA a

Favor de

la entidad Norteamericana, CENTRO PHARMACEUTICALS CORPORATION, residente en RARITAN, New Jersey, Estados Unidos,

P O R

"METODO DE PREPARACION DE ANTIGENOS TUMORIALES, ETICA

DE LA VACUNACION DE SAINDO VACCINO"

Fuente de Origen: Sacada en la Patente Norteamericana n°

2915437 solicitada el 11 de mayo de 1955.

-O-O-O-O-

255146



Esta invención se relaciona con el control de la brucelosis y más particularmente con una vacuna rica en antígenos eficaces para la inmunización contra la brucelosis, y con el método de preparación de la misma.

5.-

La brucelosis es una enfermedad infecciosa del ganado vacuno, porcino y cabrío, causada por bacterias del grupo Brucella. Estas manifiestan su presencia en los animales al provocar un prematuro aborto del feto, produciendo así pérdidas económicas al ganadero, no sólo porque se malogran las crías sino además, en el caso de las vacas lecheras, por una gran reducción en la producción de leche.

10.-

La brucelosis constituye un serio peligro para la población humana porque los organismos infecciosos pueden transmitirse al hombre por contacto con la carne de los animales infectados o mediante el consumo de leche infectada. Esta enfermedad recibe también la denominación de brucelosis cuando se da en el hombre, si bien se emplea aún la antigua denominación de fiebre de Malta, ondulatoria o intermitente, derivada de los síntomas típicos consistentes en ataques intermitentes de fiebre. También se conoce esta enfermedad en el hombre por "enfermedad de Bang", científico que en 1897 descubrió las relaciones entre el bacilo causante y el aborto en el ganado vacuno.

15.-

20.-

Se han clasificado diferentes tipos de bacilos Brucella de acuerdo con sus principales huéspedes. La Brucella abortus es el organismo causante de la enfermedad, principalmente en el ganado vacuno; la Brucella suis o Porcine brucella es el tipo responsable de la enfermedad en los cerdos y la Brucelle melitensis entre las cabras.

25.-

Sin embargo, la infección se produce también de una especie a otra, siendo siempre patógena. El grado de patogenia en el hombre varía. La Brucella melitensis es la más peligrosa, terminando la enfermedad frecuentemente con la muerte del sujeto. La denominación de "fiebre de Malta", dada originalmente por Bruce a una enfermedad que

30.-

255146



parecía ser peculiar de la isla de ese nombre, se reserva ahora al tipo de enfermedad causado específicamente por la Brucella melitensis. La Brucella abortus, el tipo bovino, se considera la menos patógena, raras veces mortal, pero se cree que infecciones irreconocidas con la Brucella abortus son responsables de muchas condiciones debilitadoras en el hombre que predisponen a otras enfermedades más graves, tales como la fiebre reumática, la endocarditis y otras. Los departamentos de salud pública de muchos estados consideran tan peligroso para la salud pública el consumo de leche infectada con Brucellas que en muchos de ellos desde 1930 sólo se permitirá expendir leche a vaquerías donde no existen casos de ganado infectado con aquellos microorganismos.

Es un objeto de nuestra invención proporcionar una vacuna rica en antígenos que creen un estado de inmunización contra las bacterias Brucella.

Otro objeto de la invención es ofrecer una vacuna exenta de bacterias vivas. Otro objeto más es el de proporcionar una vacuna contra la brucelosis que no obstaculice la prueba de aglutinación actualmente empleada en el examen de los rebaños de ganado.

En el momento actual existen dos métodos bien conocidos de combatir la infección de Brucella en el ganado vacuno. Uno de ellos consiste en la eliminación de los animales infectados mediante el examen regular de los rebaños en la búsqueda de animales que respondan positivamente a reacciones rectoras, los cuales son sacrificados. Aunque hay rebaños e incluso regiones enteras que ocasionalmente se hallan libres de reactivos, este estado no puede ser nunca permanente, ya que cualquier animal puede adquirir organismos productores de la brucelosis procedentes de aguas infectadas, del suelo, por contacto con la cama de paja infectada en los camiones, a través de pájaros portadores o de perros vagabundos. Un inconveniente del actual sistema de

255146



infección en que los bacilos causales no pueden desarrollarse en im-
muneidad natural. Así, cuando un vacato queda expuesto a la infección
puede producirse un abortivo aborto de la talpa está con un porcentaje
de abortos tan elevada como de 75%.

5.-

El segundo método de control de la brucelosis por intentar consis-
tía en la sistemática vacunación de las terneras y becerros. Este pro-
grama se basa en el conocimiento de que la ternera o becerro, sexual-
mente maduros, poseen una inmunidad natural contra la brucelosis.

10.-

Vacunándolos entre los 4 y los 6 meses, se les proporciona una protec-
ción contra la infección al estimularse su mecanismo de la inmunidad
con los organismos vivos; sin embargo, en la edad de criar, las bacte-
rias ya no se hallan presentes. En este programa de vacunación se usa
una raza especial de Brucella abortus desarrollada por el Departamen-
to de agricultura de los Estados Unidos e identificada por usar 19. Es-
ta raza tiene una virulencia muy baja pero es elevadamente antigénica.

15.-

Cuanto más cercana a la vida sexual de la mascota sexual, tanto más efec-
tiva será la inmunidad, pero mayor también será el riesgo de que la
ternera no expulse las bacterias vivas y se convierta en portadora.
La ternera vacunada justamente antes de la madurez retendrá
también una elevada concentración de anticuerpos que resulta confusa
para el presente programa de observaciones.

20.-

Originalmente, se atribuyó una concentración de 1:50 en un ani-
mal joven vacunado a los anticuerpos producidos por la vacunación, con-
siderándose a tal animal como no infectado, en tanto que en un animal
sin vacunar esta concentración se clasificaría como sospechoso. La pro-
ducción de una concentración de 1:100 en animales vacunados era tan fre-
cuente que desde 1955 esta concentración en tales animales se conside-
ra como a un elevado grado de inmunidad y no a infección. La certeza
de esta suposición se discute aún por los especialistas, sobre todo
en virtud del hecho de que una concentración de 1:100 se encuentra con

25.-

30.-

255146

20 E



la cuencia de vacas no vacunadas que abortan.

5.- La principal desventaja del programa de vacunación citado reside en el hecho de que la inmunidad conferida a la vaca no previene por la vacunación no permite a través de su vida productiva. Después de tres o cuatro meses, el grado de infección, incluso en animales vacunados, se muy elevado, alcanzando a veces de un 20 a un 40 por un 100.

10.- La revacunación con vacuna de la Raza 19 de vacas adultas que han perdido su inmunidad reduciría considerablemente la producción de abortos en un rebaño, pero algunos animales vacunados se convertirían en portadores y estarían infectados, aun cuando no abortasen. Tales vacas contaminarían su leche con organismos Bruselae y constituirían, por consiguiente, un grave peligro para la salud. Existe alguna evidencia de que con un caso de huésped, la virulencia y el grado patogénico originalmente bajos de la Raza 19 para el ganado vacuno se vierte a una forma muy virulenta en el hombre.

15.- La vacunación de terneras con la Raza 1. es en el momento actual el único procedimiento oficialmente reconocido y permitido, a pesar de sus grandes desventajas, siendo la principal de ellas el que tanto se go una desconfianza como atenta administración de la misma, contribuye a una continua propagación de organismos Bruselae vivos.

20.- Durante algún tiempo se ha venido reconociendo que el método más eficaz de controlar la brucelosis sería el mantenimiento de las defensas naturales. Este sistema de defensa es un sistema inmunogénico del organismo. Cómo se produce es cosa que no se conoce con detalle, pero es sabido que la exposición a una infección con ciertas bacterias no crea un estado de inmunidad. La inmunidad creada puede actuar de dos maneras: puede proteger contra la infección mediante los organismos y su establecimiento permanente en el cuerpo (efecto antiinfeccioso) o bien puede proteger solamente al organismo contra el daño inmediato causado por las bacterias establecidas (efecto antitónico). En el caso de la

25.-

30.-

255146



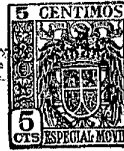
- 6 -

brucelosis, la última forma de protección sería aplicable a la protección del propio aborto y la primera a que el animal se convirtiese en portador.

- 5.- Los intentos de creación de una vacuna viva conocida se remontan hasta el momento en que Lang realizó su original descubrimiento. El uso de bacterias preparadas con bacterias muertas no es en modo alguno nuevo y en muchas enfermedades son eficaces, aun cuando no ofrecen una protección muy duradera. En la brucelosis bovina, la vacunación con bacterias muertas no ha sido satisfactoria. A la luz de los conocimientos actuales, parece posible que en los primeros intentos las bacterias fuesen tratadas con efectivo vigor. Cuando se destruían las bacterias mediante calor o determinados productos químicos, se destruían los sistemas antigénicamente activos de aquéllas en grado tal que resultaban destruidos los antígenos específicos encargados de crear la protección contra la brucelosis. El procedimiento ordinario consistía en hervir o incluso someter al autoclave, o establecer una suspensión en formalina en concentraciones superiores al 0,5% o en formalina del 0,25% o superior. De ordinario, la suspensión bacteriana original era centrifugada, eliminándose el líquido sobrenadante, usándose las bacterias suspendidas para la preparación de bacterinas. Las bacterias de la brucelosis han sido destruidas mediante irradiación con rayos ultravioleta, con éter y mediante destrucción sónica.
- 10.-
- 15.-
- 20.-

- 25.- Nosotros hemos descubierto ahora un proceso para aislar material antigénico del organismo *Brucella* con el que pueden sensibilizarse los sistemas inmunizadores antiinfecciosos y antitóxicos. A este respecto, nuestro material antigénico imita las condiciones existentes cuando el animal queda expuesto a una infección natural de bajo grado, que puede resolverse sin quedar permanentemente infectado. Es una vacuna que se administraría a intervalos anuales y los animales vacunados pueden distinguirse fácilmente de un animal infectado porque no queda de agua.
- 30.-
- 30.-

255146



que se exponerá más adelante.

Se ha descubierto ahora que en el extracto de la Brucella con una solución acuosa de carbonato de sodio que tenga un pH superior a 10 pero inferior a 11, que posea una intensidad iónica inferior a 0,3 aproximadamente, proporciona una suspensión bacteriana rica en antígenos. La suspensión así obtenida puede filtrarse para separar todas las bacterias. Sin embargo, los antígenos pasan a través del filtro y se hallan presentes en el filtrado. Una solución acuosa de carbonato de sodio que contenga del 0,5 al 1,0, aproximadamente por peso de carbonato sódico (pH de 10 a 11) es particularmente eficaz para extraer antígenos de la Brucella. El extracto puede recolectarse, mantenerse durante 24 horas a 38°C y luego solidificarse por congelación.

Después de descongelarse, se separan las bacterias por centrifugación y el líquido sobrenadante es filtrado a través de un filtro estéril. No se requiere ninguna preservación y el filtrado obtenido mediante este proceso es estéril.

Las pruebas de control efectuadas antes de la centrifugación revelan que las bacterias no están muertas en esta fase, pero si se dejan en contacto con la solución de carbonato sódico durante varios días. La fase de congelación antes descrita ayuda a impedir que las bacterias, pero no es absolutamente necesario, ya que el antígeno puede extraerse con la solución de carbonato sódico aun cuando se omita dicha fase. En los siguientes ejemplos se describe el método preferible de preparación de una vacuna de acuerdo con nuestra invención.

Ejem. 1

Se agregaron 49 g. de un agar de infusión de patata deshidratada, fabricado por los laboratorios Difco de Detroit, Michigan, a 1000 ml. de agua destilada, conteniendo un 2% de glicerol. Se calentó la solución hasta la ebullición al tiempo que se removía para disolver el

255146



agua, introduciéndose porciones de 200 cm³ aproximadamente de la solución así obtenida en botellas (Roux) de cuarzo en un cuarto. Se continúan estas botellas con tapones de algodón y se esterilizan durante 10 minutos a una presión de vapor del 1,5 (121°C). Luego se incluyó cada una de las botellas conteniendo el medio de agua con 5 cm³ aproximadamente de una suspensión densa de Brucella abortus vivas (forma de B). Se sellaron de nuevo las botellas y se incubaron durante 3 días a 37,5°C.

Se retiró el cultivo de bacterias de la superficie del agua con unos 100 cm³ de una solución acuosa de carbonato sódico al 1% y se decantó en una botella centrifugada. Se conservó la botella que contenía el extracto a la temperatura ambiente durante 24 a 40 horas, durante cuyo tiempo los antiígenos asociados a las Brucella abortus pasaron a la solución. Al cabo de 40 horas, la botella conteniendo el extracto fue centrifugada, el líquido sobrenadante decantado de las bacterias. Luego se pasó el extracto a través de un filtro esterilizante seis a baja presión.

El filtro seis va provisto de un elemento filtrante de un tamaño máximo de poro de 0,1 micras aproximadamente. Filtros adecuados para este uso son fabricados por Hercules bajo la designación de filtro SF y filtro SF-3. Estos filtros retienen todas las bacterias Brucella, con quienes que la totalidad del filtro es sensible a este efecto antes de su empleo, el efuyente de la fase de filtración es estéril. Dicho efuyente almacenado, en la fase de filtración, a unos 60°C, pudiéndose probar su esterilidad en pruebas de cultivo. El filtrado tiene un gran actividad antiígena y puede emplearse directamente en forma de vacuna contra la brucelosis sin ninguna especie de reconstitución. Esta vacuna es estable por un período de unos seis meses a una temperatura superior a 30°C. La vacuna contiene material catalásico, procedente por lo menos probablemente conge, cidas cinco -3,5 a 10⁻⁵ y -1,5 a 10⁻⁵ contraefectos por segundo por volumen por centímetro cúbico de fase-

255146

21 FEB



ba con un coartiguador de varana 6,05 gramo-mercúrico y de pH 8,6.

La vacuna preparada de acuerdo con el método del Ejezic I ex-
puesto fué inyectada en cantidades comprendidas entre 5 y 40 c.c.³ sub-
cutáneamente en el cuello de vacas que respondieron negativamente a
5.- la prueba de aglutinación. Todas desarrollaron unas concentraciones de
1:100 al cabo de 7 a 10 días.

Sin embargo, debe recordarse que los animales vacunados pueden
distinguirse de los animales infectados sin vacunar por sutiles dife-
rencias en la prueba de aglutinación. En tanto que normalmente se ob-
serva que el suero sanguíneo de un animal infectado produce coagula-
10.- ción de las agrupaciones de bacterias muertas asociadas al mismo, el
suero sanguíneo de una vaca vacunada (no infectada) da un precipitado
cuyas partículas son inconfundiblemente de menor tamaño. Además, cuan-
do se efectúa la prueba de aglutinación en la forma normal colocando
15.- una pequeña cantidad de suero en una placa de vidrio, esas particu-
las finamente divididas empujan al borde del suero estancado, dejando
complejarse la porción central. En contraste, las partículas de mayor
tamaño de precipitado, reconocidas como prueba positiva de un animal
infectado, no empujan sino que permanecen uniformemente dispersas por
20.- todo el suero estancado.

Se mantuvieron todas las vacas en un grupo, con las mismas posi-
bilidades de exposición. Al cabo de un mes, la concentración disminu-
yó a 1:50 ó inferior, con la excepción de aquellas que recibieron
la cantidad grande de 40 c.c.³. En algunos casos, aparecieron indura-
ciones de corta persistencia a la vista de la inyección, pero no se
25.- notó ni un solo caso de formación de abscesos. Sólo una vaca presen-
tó una reacción sistémica general que duró algunos días. Si se usara,
puede recomendarse la vacuna ya descrita con polivinil pirrolidona o
polivinil metil éter u otros adyuvantes que produzcan un efecto de ce-
30.- pósito.

255146

20 ENE. 19



REPORTE DE LAS VACUNACIONES DE BOVINOS Y VACUNAS DEL PERI

Tabla I

Experimento con bacterias atenuadas 1

Vacas	Cantidad en c. ³	Resultados
3.-	1: Red Foll 20 2: Red Foll 20 3: Red Foll 40	V. vacunada; negativo después 1 año. Vacunada; idem. Vacunada; profusa vacunación intravenosa; abortó a las 7 y 17 meses después vacunada; respondió negativamente 3 meses después.
	4: Red Foll 40 5: Red Foll 20 6: Red Foll 10	Vacunada; negativo después 2 años. Idem. Vacunada; negativa hasta su separación de leche o proleto.
10.-	11: Red Foll 5 13: Red Foll 5 24: Red Foll 5	Vacunada; negativa después 1 año. Idem. Vacunada; son, soncaé después 1 año (después de parir); volvió a negativa 1 mes después.
	25: Red Foll 5 30: Red Foll 5 31: Red Foll 5 32: Red Foll 5	Vacunada; negativa durante 12 meses, revacunada luego. Idem. Idem. Idem.
15.-	29: Angus 5	Vacunada; negativa durante 1 año diez meses; luego infectada artificialmente, sin elevación de conce. ácida.
	10-8: Guernsey 10	Vacunada; infectada artificialmente después de 5 meses; reactor después 7 meses; negativo después 1 año; reacción normal; permaneció negativo durante 2 años.
	11: Holstein 10	Vacunada; infectada artificialmente; después 1 año 2 meses; permaneció negativa durante 2 años; separada del rebaño probado.
20.-	13: Holstein 10	Vacunada; infectada artificialmente después 1 año 1 mes; ampiclosa 2 semanas después; volvió a negativa al mes y medio aproximadamente; después infectada artificialmente; separada del rebaño probado después 2 años.
25.-	14: Holstein 10	Vacunada; infectada artificialmente después 1 año 2 meses; reactor 2 semanas después; negativo mes y medio después; infectada artificialmente.
	16: Holstein 10	Vacunada; infectada artificialmente después 4 meses y 5 meses; permaneció negativa.
30.-	19: Total de vacas	Resumen: 1 reactor = grado de infección del 5,2%.

255146



TABLA II

CONFERENCIAS NO VACUNADOS

<u>Vacas</u>	<u>Resultados</u>
21: Red Poll	Requirió reactor a los 2 meses; abortó al cabo de 11 meses.
29: Red Poll	Reactor al cabo de cinco meses.
35: Red Poll	Reactor al cabo de cinco meses y abortó.
37: Red Poll	Reactor al cabo de 4 meses y abortó.
6: Red Poll	Reactor al cabo de diez meses.
34: Angus	Permaneció negativa.
9: Guernsey	Permaneció negativa después de 1 año.
<hr/>	
7: Total de vacas	Resumen: 5 reactores = grado de infección del 71,4%

Dentro del rebaño, un 50% de los controles no tratados se convirtieron en reactores (en 10 meses) y algunos abortaron. La Brucella se recuperó del útero, la placenta y la leche. Las vacas vacunadas con el extracto del carbonato sódico estuvieron completamente exentas de infección al cabo de dos años, habiendo permanecido negativa durante cuatro años. La eficiencia de la vacunación con la vacuna del Ejemplo I se halla resumida en la Tabla I. La Tabla II resume los resultados observados en el rebaño de control.

EJEMPLO II

Se repitió el proceso del Ejemplo I, pero se substituyó la solución de carbonato sódico de dicho ejemplo con una solución acuosa de hidróxido sódico. Se estableció la presencia de material antigénico en la solución cáustica diluida mediante filtración de las Brucella y vacunación de las vacas con el filtrado. Las vacas así vacunadas dieron una prueba positiva de sangre (prueba de aglutinación) en diez días. El precipitado finamente dividido obtenido en esta prueba, era sin embargo indicativo de vacunación en lugar de una infección activa.

Aunque se ha descrito la invención con gran detalle en la anterior exposición, tales detalles han de ser considerados solamente

255146



como ilustrativos y no de carácter restrictivo.

REIVINDICACIONES

En resumen: La Patente de introducción que se solicita recae sobre las reivindicaciones siguientes:

- 5.- 1ª.- Método de preparación de antígenos inmunizadores, eficaces en la vacunación de ganado vacuno, que comprende las fases de extraer un cultivo de Brucellas vivas con una solución alcalina acuosa, de un pH superior a 7 e inferior a 11, y separar las bacterias de la solución alcalina acuosa.
- 10.- 2ª.- Método de preparación de antígenos inmunizadores, eficaces en la vacunación de ganado vacuno, que comprende las fases de extraer un cultivo de Brucella abortus vivas con una solución acuosa alcalina de un pH superior a 7 e inferior a 11 y separar las bacterias de la solución acuosa alcalina.
- 15.- 3ª.- Método de preparación de antígenos inmunizadores, eficaces en la vacunación de ganado vacuno, que comprende las fases de extraer un cultivo de brucellas vivas con una solución acuosa de carbonato sódico de un pH superior a 7 e inferior a 11 y separar las bacterias de la solución acuosa de carbonato sódico.
- 20.- 4ª.- Método de preparación de antígenos inmunizadores, eficaces en la vacunación de ganado vacuno, que comprende las fases de extraer un cultivo de Brucellas vivas con una solución acuosa alcalina de un pH superior a 7 e inferior a 11 y conteniendo de un 0,5 a un 1,0% aproximadamente de carbonato sódico y separar las bacterias de la solución acuosa de carbonato sódico.
- 25.- 5ª.- Método de preparación de antígenos inmunizadores, eficaces en la vacunación de ganado vacuno, que comprende las fases de extraer un cultivo de Brucellas vivas con una solución acuosa de carbonato sódico de un pH superior a 7 e inferior a 11, a una temperatura comprendida entre 2 y 37°C; centrifugar el extracto de carbonato sódico acuoso.
- 30.-

255146



so para separar las bacterias del mismo y filtrar en líquido sobrenadante mediante un filtro esterilizador.

5.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Introducción que se solicita: "MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE ANTISEROS INACTIVADOS, EFICACES EN LA VACUNACIÓN DE GANADO VARIO".

Todo conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de trece páginas mecanografiadas.

10.-

Madrid, 20 Enero 1960

Handwritten signature