

301910

PATENTE DE INVENCION



=====
Case 5325/1 + 2.
=====

301910

Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la preparación de una vacuna
contra la tuberculosis".

Solicitante:

CIBA SOCIETE ANONYME, entidad suiza, residente en
Basilea, Suiza.

El objeto de la invencion es un procedi-
miento técnico para la obtención de cultivos vivien-
tes de *Mycobacterium tuberculosis* var. BGG debilita-
do (*Bac. Calmette-Guérin*) se emplea como vacuna vi-
va para la inmunización contra la tuberculosis.

5.



301910

- Tambien los extractos celulares BGG muestran un cierto efecto inmunizante. Para la obtención de la vacuna y de los extractos celulares en gran escala se debía disponer de cantidades celulares unitarias, y capaces de vivir correspondientemente --
5. grandes. Esto, hasta ahora, sin embargo era el caso BCG es muy sensible con respecto al cultivo. Hasta ahora no se ha logrado preparar el BCG en escala técnica en los fermentadores usuales de acero inoxidable bajo aireación y agitación, ya que el BCG, bajo estas condiciones, no crecía o sólo muy lentamente.
10. Se ha descubierto ahora que la composición del caldo de cultivo, especialmente con respecto a las fuentes de carbono y la adición de materiales de actividad de superficie, así como una reducida ventilación y agitación, son de importancia decisiva para el cultivo del BCG en escala técnica.
15. Se ha demostrado que la combinación de glicerina como fuente de carbono y de energía con reticuladores del tipo Tween (vease The Merck Index, 7ª edición 1960, pagina 970), especialmente con Tween 80, hace posible un crecimiento óptimo del BCG en --
20. los fermentadores. Las partes de ambos componentes dependen de los demás componentes del caldo de cultivo. La glicerina se agrega en concentraciones de 20 - 100 g/litro de caldo de cultivo, el medio de reticulación en tales de 1 - 20 g/litro. Los demás componenetes del caldo de cultivo, fuentes de nitrógeno, sales, elementos en indicios, corresponden ---
25. esencialmente a los medios indicados en la litera-
- 30.



301910

tura para el cultivo de BCG. La aireación ha de ser débil, aprox. 0,1 hasta 0,5 volúmenes de aire por volumen de solución de cultivo por minuto. También la agitación deberá mantenerse baja, por ejemplo aprox.

5.

50 - 100 revoluciones por minuto.

La temperatura de incubación en los fermentadores asciende preferentemente a 37°C. Para la inyección de los fermentadores sirven cultivos de agitación de 6 - 9 días, incubados a 37°C; se inyecta con 2 - 5% en volumen de cultivo de agitación.

10.

El crecimiento del cultivo se comprueba turbidimétricamente, por ejemplo midiendo la absorción de luz a 655 m/μ en un colorímetro fotoeléctrico. Se recoge a una densidad óptica de 2 - 10 correspondiente a aprox. 1 - 5 g de peso seco de célula por litro de caldo de cultivo. Esta densidad se ha alcanzado después de 5 - 15 días. Para la propagación a etapas de fermentador más elevadas se emplean cultivos con una densidad óptica de 1 - 3, tal y como se obtienen después de una incubación de menos 4 - 6 días.

15.

20.

Cuando se ha alcanzado la densidad deseada se separan las bacterias del caldo de cultivo, por ejemplo por centrifugado. Para la obtención de vacuna BCG se pueden secar por congelación o elaborarse para obtener extracto de células.

25.

En caso de que los cultivos de BCG se hayan de emplear para la obtención de vacunas deberán mostrar el mayor contenido posible de células vivas (en proporción al número total de células) y además

30.



ser relativamente insensibles a las influencias de temperatura, presión, medios de suspensión, etc. tal y como se presenta en la preparación y almacenamiento de las vacunas.

5. Para obtener cultivos vivos de tal manera estables, se emplean como material de partida, en el procedimiento arriba mencionado, preferentemente los cultivos que se obtuvieron sometiendo un cultivo de BCG a las condiciones de la obtención y almacenamiento de la vacuna y seleccionando de los cultivos individuales los más estables a estas condiciones. En la obtención de vacuna BCG liofilizada se procede -
10. por ejemplo, liofilizando un cultivo de BCG, almacenando durante largo tiempo, por ejemplo 1 - 6 meses a una temperatura eventual de almacenamiento de la vacuna, por ejemplo 37°C, suspendiendo después, sembrando la suspensión en un caldo de cultivo sólido -
15. en concentraciones tales que crezcan colonias separadas, multiplicando las distancias coloniales en -
20. caldo de cultivo líquido y liofilizando los cultivos individuales, así obtenidos, para determinar el porcentaje de sobrevivientes sembrándolos sobre caldo -
25. de cultivo estable, seleccionado los distintos cultivos con proporción de supervivientes mayor y empleándolos como material de partida para el procedimiento según la presente invención.

30. La temperatura de liofilización asciende preferentemente a 15 hasta 20°C, la presión a 0,02 mm. Hg. La suspensión de bacterias a liofilizar se deberá congelar lo más rápidamente posible a unos



50°C (Bajada de temperatura 3 hasta 4° por minuto). La liofilización se efectúa en presencia de un "Medio secador" por ejemplo una solución acuosa de -- dextrano (5%), glutamato sódico (5%) y azúcar (5%) (veáse Greaves, Ann.N.Y.Acad.Sci.85, 723 (1960) -- El liofilizado contiene 1 -2 % de agua.

La invención se describe en los ejemplos siguientes. Las temperaturas se indican en grados -- Celsius.

10.

Ejemplo 1 .-

En un fermentador de 50 litros (de construcción usual en la producción de antibióticos) con distribuidor de aire, agitador y regulador de temperatura se introducen 30 litros de caldo de cultivo - que por litro tiene la composición siguiente:

15.

| | |
|----------------------------|---------|
| Glicerina | 75,0 g |
| Tween 80 | 2,0 g |
| Solución de albúmina al 5% | 50,0 ml |

20.

| | |
|---|-------|
| L-asparagina | 2,0 g |
| Bacto-Casiton | 1,0 g |
| Fosfato potásico prim. | 1,0 g |
| Fosfato sódico sec. 12 H ₂ O | 2,5 g |

25.

| | |
|--|---------|
| Citrato ferriamónico | 10,0 mg |
| Sulfato de magnesio 7 H ₂ O | 10,0 mg |
| Cloruro de calcio 6 H ₂ O | 0,5 mg |

30.

| | |
|------------------------------------|--------|
| Sulfato de cinc 7 H ₂ O | 0,1 mg |
|------------------------------------|--------|



Sulfato de cobre
5 H₂O 0,1 mg
Agua desionizada ad 1000 ml

5. El caldo de cultivo se trata en el autoclave antes de ser cargado, sin adición de la solución de albúmina, durante 20 minutos a 120° y 1,2 atm., después se agrega la solución de albúmina inactiva en dos días consecutivos, cada vez durante 2 horas a 56°, y filtrada a través de un filtro Seitz.
10. El fermentador se inyecta con 900 ml de un cultivo BCG de 9 días de edad, cultivado en matraces de Erlenmeyer, cada vez con 100 ml de caldo de cultivo, en una máquina agitadora de rotación, y que muestra una densidad óptica de 0,3 - 0,4 (medición a 655 m/u) (El caldo de cultivo de los matraces Erlenmeter corresponde al arriba indicado, contiene - sin embargo, en lugar de 50 ml de solución de albúmina por litro, 100 ml y nada de glicerina y de Tween).
15. El cultivo se efectúa a 37° con un paso de aire de 0,25 vol. por Vol. de caldo de cultivo por minuto y agitando con un agitador de turbina de 6 hojas con 50 revoluciones por minuto.
20. Después de 10 días muestra la solución de cultivo una densidad óptica de 4,40 (a 655 m/u) es decir un peso de célula en seco aprox. 2,2 g por litro de solución de cultivo.
25. Empleando bajo las mismas condiciones una solución de cultivo, que en lugar de la glicerina - contenga 75 g de glucosa, entonces la densidad óptica es después de 10 días de 0,13; con un caldo de
- 30.



cultivo sin glicerina, y con sólo 0,5 g de Tween, - sin embargo con 100 en lugar de 50 ml de solución - de albúmina por litro, la densidad óptica después de 10 días es de 0,02.

5. Ejemplo 2 .-

Bajo las condiciones indicadas en el ejemplo 1 se cultiva en un fermentador de 50 litros un cultivo de BCG en 30 litros de un caldo de cultivo que por litro tiene la siguiente composición:

| | | |
|-----|--|---------|
| 10. | Glicerina | 50,0 g |
| | Tween 80 | 15,0 g |
| | Acetato sódico | 1,0 g |
| | L-asparagina | 2,0 g |
| | Bacto Casitona | 1,0 g |
| 15. | Extracto de levadura Difco | 3,0 g |
| | Fosfato potásico, prim. | 1,0 g |
| | Fosfato sódico, sec. 12 H ₂ O | 2,5 g |
| | Citrato ferriamónico | 10,0 mg |
| | Sulfato de magnesio, 7 H ₂ O | 10,0 mg |
| 20. | Cloruro de calcio, 6 H ₂ O | 0,5 mg |
| | Sulfato de cinc, 7 H ₂ O | 0,1 mg |
| | Sulfato de cobre, 5 H ₂ O | 0,1 mg |
| | Agua desionizada ad | 1000 ml |

La solución se trata en el autocable durante 25. 20 mn. a 120° y 1,2 atm. Después de 10 días muestra la solución de cultivo una densidad optica de 5,65 (a 655 m/u) lo que corresponde aproximadamente 2,8 g. de peso de celula en seco por litro.

30. Empleando un caldo de cultivo que en lugar de glicerina y Tween contenga 10,0 g de glucosa



y 15,0 g de Triton (WE 1339) entonces la densidad -
optica después de 10 días es de 0,27.

Ejemplo 3.-

5. Se inyecta un fermentador de 50 litros que
contiene 30 litros de caldo de cultivo mencionado en
el ejemplo 2, con 900 ml. de un cultivo de agitación
que se cultivó en el matraz Erlenmeyer como descrito
en el ejemplo 1, pero en un caldo de cultivo de la
composición indicada en el ejemplo 2. Después de una
10. incubación de 4-6 días del fermentador se trasladan
cada vez 15 litros de la solución de cultivo a fer-
mentadores de 500 litros con 300 litros de caldo de
cultivo. Los fermentadores de 500 litros corresponden
en su construcción a los fermentadores de 50 litros.
15. El cultivo se efectúa a 37° con una aireación de 0,1
hasta 0,5 vol. de aire por vol. de caldo de cultivo
por minuto y agitación hasta cien revoluciones por -
minuto. Después de 7 días de incubación asciende la
densidad óptica de 4-6, lo que corresponde a 2-4 de
20. peso de célula seca por litro de solución de cultivo.
El rendimiento se puede aumentar considerablemente -
prolongando la duración del cultivo.

Ejemplo 4.-

25. Para obtener suspensiones para preparar -
ampoyas y liofilizar se enfria uno de los cultivos,
obtenidos según los ejemplos anteriores, a 4° y se
centrifuga con una centrifugadora continua. El se-
dimento de BCG así obtenido se lava una solución de
albúmina esteril al 0,05 % ("Bovin Albumin Fracción
30. V" Fabricante Pentex Inc., Kankakee, Illinois).



Suspensiones utilizables para inyecciones se obtienen si el sedimento de BCG lavado se suspende, por ejemplo, en solución de sal común fisiológica.

5. Para la obtención de ampoyas liofilizadas se suspende el sedimento lavado en un "Medio de secado" (1 g de peso en seco de BCG por litro) que se obtiene completando 50 g de dextrano, 50 g de glutamato sódico y 50 gramos de sacarosa con agua destilada a un litro, calentando a 90° hasta la solución total y filtrando a través del filtro Seitz para desgerminizar después de enfriar a unos 30°. Después se llena la suspensión en ampoyas. Con una velocidad de 40°/mn. se enfrían las ampoyas se llevan al secador por congelación y se liofilizan a -15 hasta -20° y 0,02 mm. Hg.
- 10.
- 15.

20. Las ampoyas se secan ulteriormente en un secador, evacuado con una bomba de difusión, con gel. azul a 0,02 mm. Hg, se gasifican con nitrógeno hanhido y se cierran por fusión. El contenido final de agua de la vacuna es de 1-2%.

Ejemplo 5.-

25. Para la obtención de cultivos vivos, que son especialmente adecuados para la preparación de vacunas liofilizadas, estables, con elevado número de germenés vivos y buena resuspensión, se emplea un material de partida que se obtiene de la manera siguiente:

30. Sedimento de BCG lavado con una solución de albúmina Fraktión W al 0,05%, esteril, se suspende, como descrito en el ejemplo 4, en un "Medio de -



- secado" (densidad óptica 0,44 hasta 0,6 a 655 m/u) y se liofiliza bajo las condiciones indicadas. El liofilizado se almacena durante 6 meses a 37° y después se vuelve a suspender en una solución de albúmina -
5. Fraktion V al 0,25%. La suspensión se vierte sobre placas de Löwenstein-Jensen en cuencos Petri, de manera que por cuenco Petri no crezcan más de 100 colonias. Las placas se incuban a 37°. Algunas de las colonias individuales se inyectan cada vez en 100 ml.
10. de caldo de cultivo, por ejemplo la solución glicerinosa del ejemplo 2, que se encuentra en matraces de Erlenmeyer de 500 ml, y se incuban en una máquina -- agitadora, rotante, a 120 revoluciones por minuto a 37° hasta que la densidad óptica a 655 m/u asciende a 0,5 hasta 0,8. Se trasladan entonces cada vez 5%
15. de los cultivos a nuevos matraces de agitación con el mismo caldo de cultivo (para obtener un cultivo homogéneo), se deja crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 1,0 hasta 1,5, se centrifuga, el sedimento
20. se lava con solución de albúmina Fraktion V, al 0,05 % se suspende en el medio de secado arriba indicado y una parte se siembra sobre placas de Löwenstein-Jensen, mientras que otra parte se liofiliza bajo las 9 condiciones indicadas en el ejemplo 4 y después se
25. siembra sobre placas de Löwenstein-Jensen. Al incubar las placas se observa que el porcentaje de sobrevivientes es decir, la proporción del número de gérmenes -
- vivientes antes de liofilización de los distintos cultivos monocelulares, es muy distinto (véase tabla 1).
30. En los cultivos monocelulares con gran porcentaje de



- sobrevivientes se trata de cultivos que se han producido de una mutante genotípicamente termoestable de la cepa BCG. Tales cultivos dan, al cultivarse según el procedimiento descrito en los ejemplos 1 - 3, cultivos vivos en elevado grado sólidos a la liofilización y al almacenamiento, que son muy bien adecuados para la obtención de vacunas liofilizadas. Los cultivos seleccionados con 100% de sobrevivientes muestran en el ensayo animal el efecto totalmente inmunizante en comparación con un cultivo vivo fresco liofilizado.
- 5.
- 10.



T A B L A 1

| Cultivo mo nocelular nº | Número de colonias por ml, antes de la liofiliación | Número de colonias por ml, después de la liofilización | Porcentaje de supervivientes en % |
|----------------------------|---|--|---|
| 1 | $1,03 \cdot 10^8$ | $1,04 \cdot 10^8$ | 100 |
| 2 | $9,0 \cdot 10^7$ | $3,24 \cdot 10^7$ | 40 |
| 3 | $7,8 \cdot 10^7$ | $7,0 \cdot 10^6$ | 8 |
| 4 | $8,6 \cdot 10^7$ | $5,44 \cdot 10^7$ | 52 |
| 5 | $4,8 \cdot 10^7$ | 0 | 0 |
| 6 | $1,47 \cdot 10^8$ | $1,46 \cdot 10^8$ | 100 |
| 7 | $1,07 \cdot 10^8$ | $1,06 \cdot 10^8$ | 99 |
| 8 | $1,03 \cdot 10^8$ | 0 | 0 |
| 9 | $1,16 \cdot 10^8$ | $1,50 \cdot 10^6$ | 1 |

30191



N O T A

5. Descrita suficientemente la naturaleza del invento así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles a modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También debe hacerse constar que la invención corresponde a una solicitud de patente presentada en Suiza
10. con fecha 12 de julio de 1.963 y 27 de mayo de 1.964. bajo los números 8736/63 y 6913/64, acogiendo por tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita la Patente de Invención por 20 años de España sobre: "Procedimiento para la preparación de una vacuna contra la tuberculosis"; caracterizándose por lo siguiente:
- 15.
20. 1ª.- Procedimiento para la preparación de una vacuna contra la tuberculosis, formada por un cultivo del *Mycobacterium tuberculosis* var. Bac. -- Calmette-Guérin; el cual se obtiene mediante el cultivo de Bac. Calmette-Guérin bajo condiciones aeróbicas en un caldo de cultivo que contiene una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, así como sales inorgánicas, caracterizado, porque el cultivo se efectúa en un fermentador empleándose una solución de --
25. cultivo que contiene glicerina como fuente de carbono y energía, así como medios de reticulación del --
30. tipo Tween.



- 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la solución de cultivo contiene Tween 80 como reticulador.
5. 3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizados porque durante el cultivo se mantienen bajo la aireación y la agitación.
10. 4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el caldo de cultivo contiene 20 - 100 g de glicerina por litro de solución de cultivo.
15. 5ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado porque la solución de cultivo contiene 1 a 20 g de reticulador del tipo Tween - por litro de caldo de cultivo.
20. 6ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el caldo de cultivo, además de albumina como fuente de nitrógeno, contiene 50 a 80 g de glicerina y 1 a 5 g de reticulador del tipo Tween.
25. 7ª.-Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el caldo de cultivo además de fuentes de nitrógeno sintéticas, contiene aproximadamente 50 g de glicerina y 10 a 15 g de reticulador del tipo Tween.
30. 8ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque se airea con 0,1 hasta 0,5 volúmenes de aire por volumen de cultivo por minuto.
- 9ª.- Procedimiento según reivindicación 1 a 8, caracterizado porque se agita con aproximadamen



te 50 a 100 revoluciones por minuto.

5. 10ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque como material de partida se emplean cultivos que se obtuvieron sometiendo un cultivo de BCG a las condiciones de la obtención y del almacenamiento de la vacuna y seleccionando los cultivos monocelulares más estables - bajo estas condiciones.

10. 11ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque se liofiliza un cultivo de BCG, se almacena durante un largo periodo de tiempo a una temperatura de almacenamiento - eventual, después se suspende, la suspensión se - siembra sobre un caldo de cultivo sólido en una con centración tal que las colonias crezcan separadas, algunas colonias monocelulares individuales se hacen crecer en caldo de cultivo líquido, los cultivos monocelulares así obtenidos se liofilizan, para comprobar el porcentaje de sobrevivientes se siembra sobre caldo de cultivo sólido, se seleccionan -
15. 20. los cultivos monocelulares con mayor porcentaje de sobrevivientes y estos se emplean como material de partida.

25. 12ª.- Procedimiento para la preparación de una vacuna contra la tuberculosis; tal y como - queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

- 16 - 3 910



Esta memoria consta de DIECISEIS hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 10 JUL. 1964

CIBA SOCIETE ANONYME,

J. GOMEZ ACEBO Y MODER