

PATENTE DE INVENCION.

317455



Memoria Descriptiva
sobre

"Procedimiento para la producción de
una vacuna antigéna somática".

=.=.=.=.=.

Solicitante: CANADIAN PATENTS AND DEVELOPMENT LIMITED, entidad
canadiense, residente en: National Research Bldg.
Ottawa 7, Ontario, Canadá.

=.=.=.=.=.

La presente invención se relaciona con la
producción de vacunas antigéna somáticas. Estas va
cunas antigéna somáticas son preparaciones de bac-
terias inactivadas lisadas que inducen la producción
5. de anticuerpos en el paciente.

317455



- 2 -

Un método típico para producir vacunas bacterianas es hacer crecer bacterias sobre medios de cultivo apropiados, cosechar el crecimiento resultante, normalizar la concentración de organismos, y luego inactivar o matar las bacterias mediante calor, un protector, o al mismo tiempo calor y protector.

- 5.

Se puede preparar las vacunas bacterianas a partir de cepas de bacterias de laboratorio o a partir de bacterias derivadas directamente del paciente que recibe la vacuna. En este último caso se las denomina vacunas autógenas. Las vacunas que contienen diversas cepas de bacterias son denominadas vacunas polivalentes. Las vacunas que contienen bacterias pertenecientes a dos o más especies son denominadas vacunas mixtas. Se puede preparar también vacunas a partir de fracciones de las bacterias o partir de exudados bacterianos. Los toxoides de la difteria y del tétano son ejemplos de éstas últimas. En el caso de la presente invención, las bacterias son lisadas por completo, de manera que están presentes, en forma eficaz, la totalidad de los antígenos bacterianos, tanto internos como externos. De acuerdo con la presente invención, se ha denominado a este tipo de vacuna "vacuna antígena somática". Las vacunas preparadas de acuerdo con la presente invención pueden ser de los tipos monovalente, polivalente o mixto.

10.

15.

20.

25.

30.

Ya se ha sugerido en la técnica un método para preparar vacunas antígenas somáticas, que involucra el lisado de células muertas de bacterias patógenas, sometiénolas a la acción de una enzima pro-



teolítica tal como Dornasa (desoxiribenucleasa) que causa la lisis de las células sin destruir la antigénicidad.

Se ha comprobado ahora que se puede faci-

5. litar considerablemente el lisado de las células, haciendo crecer las células en un medio que contiene un constituyente aminoácido o constituyentes que activan el desarrollo de paredes debilitadas de las células. Como resultado de éste, las bacterias debilitadas son lisadas muy fácilmente una vez que han sido inactivadas mediante un protector apropiado o bactericida tal como timerosal. Timerosal es la denominación genérica o comercial para el etil mercuri-tiosalicilato de sodio y se le prefiere en la actualidad como agente protector o exterminador; sin embargo, se puede usar también otros tales como timocresol, cloruro de benzalconio y fenol. De acuerdo con la presente invención se empleó timerosal producido por la firma Eli Lilly and Company bajo la denominación comercial Mertiolato.
- 10.
- 15.
- 20.

El uso de glicina en el rompimiento de células bacterianas ya fué descrito anteriormente por E.S. Maculla y P.B. Cowles en Science, Vol 107, p. 376 (1948). En esta publicación, se agrega la gli-

25. cina en concentraciones relativamente altas a masas de células después de cosecharlas. Sin embargo, según se juzga mediante exámen microscópico, la ruptura es mínima y los extractos así obtenidos se deben probablemente a la elución de material intracelular en la solución de glicina. En una forma preferida de llevar
- 30.

317455



- 4 -

a la práctica la presente invención, se agrega glicina inicialmente al medio de crecimiento de manera que las bacterias resultantes tendrán paredes de células particularmente susceptibles a la lisis. En efecto, se ha comprobado que en algunos casos estas células sufren suficiente autólisis para evitar la necesidad de tratamientos accesorios.

5. Las tentativas para producir vacunas antígenas somáticas mediante las técnicas de Maculla y Cowles, no alcanzaron éxito en el laboratorio. Se llevó a cabo una serie de experimentos con ciertos organismos de estafilococos, agregando glicina a los cultivos vivos en concentraciones de 0,5 a 3,5 %. Se ha llevado a cabo otro experimento con organismos tifoideos y, en este caso, se usó una concentración de glicina de 7,5 %. En ninguno de estos experimentos se pudo demostrar lisis de las células, ni se obtuvo ninguna ruptura real de las células, aunque se cree que aumentó la concentración de nitrógeno de proteínas en el sobrenadante. Los subsiguientes ensayos de potencias en animales experimentales, indicó que ni las vacunas de estafilococos ni las tifoideas, preparadas en esta manera, poseían apreciable actividad inmunizante.

10. Por consiguiente, la presente invención prevee un procedimiento mejorado para la producción de vacunas antígenas somáticas a partir de bacterias, haciéndose crecer en este procedimiento a las bacterias en un medio nutritivo que contiene uno o más de los aminoácidos utilizados o asociados con la síntesis.

15.

20.

25.

30.



sis de estructuras de células por dichas bacterias en una cantidad suficiente para dar por resultado la formación de bacterias más susceptibles a lisis.

Una forma importante de llevar a la prác-

5. tica la presente invención comprende la producción de una vacuna contra la mastitis, destinada al uso para inmunizar a las vacas contra la mastitis. La mastitis es causada por lo general por organismos estafilocócicos o estreptocócicos o por una mezcla
10. de ambos tipos. La mastitis puede ser también causada, por lo menos parcialmente, por otros organismos tales como *Escherichia coli*. Por consiguiente, la vacuna contra la mastitis, de la presente invención, puede ser una vacuna estafilocócica, una vacuna
15. estreptocócica, una vacuna estreptocócica y estafilocócica mixta, o cualesquiera de las tres a las cuales se agregó la vacuna antígeno somática de *E. coli*. Se prepara la vacuna antígeno somática *E. coli* mediante una combinación de crecimiento inicial en
20. glicina y subsiguiente lisis facilitada por una enzima proteolítica apropiada como ser, por ejemplo, Pronasa (denominación comercial). Otra forma de llevar a la práctica la presente invención, comprende la producción de una vacuna antígeno somática con
25. *Clostridium*. Por ejemplo, se ha preparado vacuna de *Clostridium chauveci* para la morriña negra del ganado vacuno, en una manera similar a la empleada para la vacuna de *E. coli*, y ha sido ensayada con éxito.

- Como un aspecto adicional, la presente invención
30. prevee un procedimiento para la producción

317455

- 6 -



- de vacuna antigéna somática de bacterias elegidas del grupo que consiste en estafilococos, estreptococos, Neisseria y Clostridium, que comprende las etapas de hacer crecer la bacteria en un medio que
5. contiene glicina en una concentración activadora de lisis, de aproximadamente 0,01 a 5,0 % p/v.
- Como otro aspecto adicional, la presente invención prevee un procedimiento para producir vacuna antigéna somática de bacterias elegida del grupo que consiste en estafilococos, estreptococos, Neisseria y Clostridium, estando presente la glicina en el medio de crecimiento en una cantidad suficiente para dar por resultado la formación de bacterias que tienen paredes debilitadas de las células, facilitando así la lisis de estas células, una vez que las bacterias han sido inactivadas mediante protectores apropiados. De preferencia, el medio de crecimiento deberá contener aproximadamente entre 0,1 y 5,0% por peso de glicina.
- 10.
- 15.
20. Se ha preparado y ensayado vacunas antigénas somáticas de acuerdo con la presente invención aquí descrita. Se dará más adelante algunos ejemplos de preparaciones típicas y ensayos que han sido llevados a cabo para determinar los resultados de dichas preparaciones. Sin embargo, no se considera que estos ejemplos y ensayos limitan a la presente invención en manera alguna. Se considera que la presente invención queda limitada solamente por las reivindicaciones que se acompaña.
- 25.
30. Aunque no se desea limitar la presente in-



vención a esta explicación, se cree que el elevado orden de antigenicidad, resultante de la puesta en práctica de la presente invención, se debe a la retención, en la vacuna, de aquellas sustancias antigénicas que se cree que son responsables de la inmunidad. Las vacunas son por lo general relativamente claras, con substancial ausencia de sedimento y de células enteras.

La concentración óptima de glicina puede variar ampliamente de acuerdo con el organismo. Para la mayoría de los organismos ensayados, la concentración óptima queda comprendida dentro de la gama de aproximadamente 0,1 a 5,0 % p/v. Se ha observado que, en general, cuanto más alto es el nivel de aminoácido que se puede usar sin afectar adversamente al crecimiento, tanto más rápida será la lisis.

EJEMPLO I

Aunque el medio utilizado para preparar las vacunas de algunos de los ejemplos siguientes es un medio de Frantz modificado (Watsen & Scherp, J. Immunol., 81, p. 331 (1958), se podrá apreciar que en algunas circunstancias pueden resultar preferibles otros medios.

25.	<u>Solución A</u> - Acidos de casamino (Tee) Difco	10 g
	Cistina (solución al 1,2 % en HCl 0,1 N)	1,0 ml
	KCl	0,090 g
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	6,5 g
30.	R rojo fenol, solución al 0,1 %	8,0 ml
	- - - - -	

317455

- 8 -



H₂O destilada, hasta 1.000 ml

Solución B - MgSO₄·7H₂O 2,4 g

Glucosa 20,0 g

H₂O destilada, hasta
100 ml.

5.

Los ácidos de Casemino son un hidrolizado de caseína que contiene material de bajo peso molecular. Se ajusta cada solución a pH = 7,4 mediante NaOH y se trata en autoclave a 121 °C durante 15 min.

10.

Normalmente, al usar el medio de Frantz, se agrega asépticamente la solución B a la solución A a razón de 25 ml/lit para uso general. La experiencia ha demostrado que algunas especies de bacterias actúan mejor cuando se varía esta proporción; por ejemplo, se

15.

ha comprobado que se prefiere las siguientes proporciones para los siguientes organismos diferentes:

Neisseria - 50 ml B a 1 lit de A

Estafilococo - 15 ml B a 1 lit de A

Estreptococo - 40 ml B a 1 lit de A

20.

EJEMPLO II

Preparación de vacuna de meningococo

Se toma directamente los cultivos de siembra desde ampollas liofilizadas introduciéndolas en frascos que contienen 250 ml del medio del Ejemplo I y se los incuba a 37 °C durante la noche (aproximadamente 18 hr) sobre una máquina sacudidora ajustada a 40 r.p.m. Se siembra 20 ml de los frascos de siembra, en frascos de litro que contienen 500 ml del medio de Frantz modificado que contiene 1 % p/v de glicina.

25.

30.

Se puede agregar la glicina a la solución A en el mo-



- mento de la producción o bien asépticamente a la mezcla antes de la siembra. Se incuban entonces los frascos, así inoculados, en la misma manera que los frascos de siembra sobre un sacudidor ajustado a 40 r.p.m.
5. durante 18 a 20 hr. Después de la incubación, se retira los frascos de la incubadora y se agrega una solución 1:100 de Mertiolato a cada frasco de 500 ml de manera de obtener una concentración final de 1:10.000 de Mertiolato. Se deja entonces los frascos a la temperatura ambiente durante 1 semana. Durante este período, la vacuna, que al comienzo tiene por lo general una indicación al nefelómetro equivalente a un Standard McFarland de 3, se aclaró por completo y proporciona una indicación cero. Se ensaya entonces las vacunas
10. con respecto a su esterilidad, innocuidad, toxicidad, pirogenicidad y potencia (ver Ejemplo VI).
- 15.

Meningococo es el nombre común para Neisseria meningitidis de la familia Neisseriaceae. Para este ejemplo, se usa las siguientes cepas de meningococo:

20.

ML027 (S. Branham)

Z1 (Lapeyssonnie)

ML29 (Lapeyssonnie)

EJEMPLO III

25. Preparación de vacunas de Estafilococo

Se produce las vacunas de estafilococos esencialmente en la manera descrita en los Ejemplos I y II, pero se ha comprobado que se requiere diferentes concentraciones de glicina para lisis óptima para las diferentes cepas, según se indica a conti-

30.

317455

- 10 -



	nuación.				
	Grupo Phage	Cepa Nº	Tipo Phage	Glicina, %	Cepas, % en vacuna humana
	I	584763	(80/81)	3,5	30
5.	II	596535	(3A/3B/3C)	3,5	30
	III	596510	7/47/53/54/75+	3,5	30
	IV	596297	42D	4,5	5
	M?	6032	KS6	3,5	5

10. Se ha comprobado que las vacunas de estafilococos mantienen su potencia después de tratamiento en autoclave a 120 °C y una presión de 1,41 kg/cm² durante 15 min.

EJEMPLO IV

Preparación de vacuna contra la mastitis

15. Esta vacuna, que es una combinación de organismos de estafilococos y estreptococos, difiere, en su técnica de fabricación, por el hecho de que hace crecer los organismos sobre un medio sólido en vez de un líquido. Se hace crecer primeramente las cepas
20. de siembra sobre placas inclinadas de ágar nutritivo al 2% durante 18 hr a 37 °C durante aproximadamente 20 hr y se separa el crecimiento por lavado ya sea con agua destilada estéril o con solución salina al 0,5%. La lisis requiere más tiempo si se usa solución
25. salina. Los organismos cosechados tienen una concentración de aproximadamente 3×10^{10} organismos /ml, y proporcionan una indicación de 10 sobre un nefelómetro McFarland. Se comprenderá que es posible hacer
30. crecer las células en un caldo nutritivo en vez de sobre ágar nutritivo sólido, en cuyo caso la concen-

317455

- 11 -



- tración de células podrá ser del orden comprendido aproximadamente entre 1×10^8 y 1×10^9 /ml. Las células quedan lisadas substancialmente por completo entre 7 y 10 días después del agregado de Mertiolato a una concentración final de 1:10.000. La concentración óptima de glicina para la activación de la lisis varía de acuerdo con el organismo. De acuerdo con la experiencia, las concentraciones más apropiadas de glicina para el crecimiento de diversas cepas sobre ágar nutritivo son las siguientes:

			<u>% de las cepas en vacu- na contra la mastitis</u>
	Estafilococo, cepa 584763 - 3,0	% de glicina	15
15.	" " 596535 - 3,0	% de glicina	10
	" " 596510 - 3,0	% de glicina	15
20.	" " 6032 - 3,0	% de glicina	20
	" " 596297 - 3,0	% de glicina	10
25.	" " del perro - 1,5 % de glicina		10
	Estreptococo A 36 (1118) - 1,5	% de glicina	10
	" C (1628) - 1,5	% de glicina	10

30. Por otra parte, si se omite los organismos estreptococo A 36 (1118) y C (1628), una combinación apropiada sería:

317455



- 12 -

% de las cepas en vacuna contra la mastitis

	Estafilococo, cepa 584763 - 3,0	
	% de glicina	15
5.	" " 596535 - 3,0	
	% de glicina	15
	" " 596510 - 3,0	
	% de glicina	25
10.	" " 6032 - 3,5	
	% de glicina	30
	" " 596297 - 3,5	
	% de glicina	10
	" " del perro - 1,5	
	% de glicina	5

15.

EJEMPLO V

Preparación de vacuna de estreptococo

Cepas humanas utilizadas:	Tipo A 36	1118
	Tipo A 19	616
	Tipo A 12	602

20.

Se siembra el contenido de ampollas liofilizadas en frascos de caldo de infusión de corazón y se hace crecer a 37 °C durante la noche. Se agrega 10 ml del cultivo de siembra a cada lote de 500 ml de medios de Frantz que contiene 2,0 % de glicina y se incuba

25.

a 37 °C sobre sacudidores durante 20 hr. Se realiza recuentos de bacterias de los organismos vivos y se agrega suficiente cantidad de una solución en existencia 1:100 de Mertiolato para obtener una concentración final de 1:10.000. Se mantiene entonces los

30.

frascos a la temperatura ambiente hasta que se completó la lisis. Estos requieren 7 a 10 días. Se lleva a cabo ensayos de la esterilidad, toxicidad, seguridad y potencia de las bacterias, después de haber sido completamente lisados los organismos.

EJEMPLO VIResultados

- Las siguientes Tablas I y II son ejemplos de los resultados obtenidos en ensayos llevados a cabo con conejos, mediante vacuna contra la mastitis preparada a partir tanto de organismos estafilococos como estreptococos. Se usa cuatro conejos para un solo lote. A cada conejo se le administra 1 ml de vacuna por vía intramuscular y 0,2 ml por vía intradermal en cada uno de cinco puntos en el lomo del conejo. Dos semanas más tarde, se infecta dos de los animales de ensayo por vía intradermal con una dosis de 0,1 ml de 15 diferentes cepas de estafilococos, y se infecta los dos restantes por vía intradermal con una dosis de 0,1 ml de 15 cepas diferentes de estreptococos. Se inyecta en cuatro conejos testigo (no vacunados) la misma dosis de las mismas cepas, en el mismo momento y en la misma manera que los animales vacunados. En dos se inyecta los estafilococos y en los otros dos los estreptococos. Se observa los conejos durante 2 a 4 días. Al término de este tiempo, los conejos testigo tienen una considerable área necrótica en cada lugar de inyección, mientras que los lugares de inyección en los conejos inmunizados están claras o por lo menos relativamente claras. En las siguientes tablas se indica los resultados de las dimensiones de las zonas obtenidas en un experimento práctico. Se indica las dimensiones en milímetros, y una "X" indica la presencia de formación de pus y necrosis.
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.

317455¹

- 14 -

TABLA I

Conejos vacunados con vacuna (humana) de estafilococos e infectados con 15 cepas de estafilococos, en dilución 1:75, en ampollas liofilizadas a razón de 0,1 ml por punto.

Conejos testigos		Estafilococos P.S.A. - Vacuna lote 7-3 (secada)			
Conejo Nº 4 estafilococos	Conejo Nº 3 estafilococos	Conejo Nº 5 estafilococos			Conejo Nº 6 estafilococos
20x 10 20x	25x 15x 20x	0	0	0	0 0 0
15x 15x 25x	20x 20x 25x	0	5	0	0 0 5
15x 10 25x	15 10 25x	0	0	0	5 0 0
20x 20x 25x	15x 15 25x	5	0	5	5 5 5
25x 25x 20x	25x 25x 15x	10	10	0	5 5 0

TABLA II

Conejos vacunados con vacuna contra la mastitis e infectados por vía intradermal con 15 cepas de estafilococos o 15 cepas de estreptococos

Conejos testigos		Conejos vacunados con vacuna contra la mastitis Nº 4-3G			
Estafilococos	Estreptococos	Estafilococos			Estreptococos
10x 25x 20x	20 x 15 10	0	0	10	20x 0 5
25x 30x 0	30 x 25x 20	10	10	5	0 10 5
5 50x 10	10 15 10	10	5	5	0 0 0
35x 20x 40x	10 20x 10x	10	0	5	0 0 0
40x 30x 30x	25 x 20x 15	5	5	5	0 0 0
	Se observa rubor rosado				No se observa rubor

Infección con estafilococos, 15 cepas, dilución 1:75 0,1 ml por punto

Infección con estreptococos, dilución 1:50 0,1 ml por punto



- Resulta evidente que se obtiene un alto grado de protección al usar las vacunas de la presente invención. Se ha comprobado que las vacunas antigénicas somáticas producidas mediante el procedimiento de la presente invención son en general más potentes que otras correspondientes vacunas de bacterias enteras convencionales, y producen menos reacciones secundarias en los seres humanos que las vacunas convencionales de bacterias enteras.
- 5.
10. El procedimiento de ensayo para meningococos consiste en inmunizar 60 ratones usando 20 ratones para cada una de tres diluciones separadas según se indica en la Tabla III. Se mantiene 20 ratones como testigos. Dos a tres semanas más tarde, se infecta
15. los animales con una cepa virulenta viviente de meningococos (*Neisseria meningitidis*) y se observa los animales durante un período de una semana. En la Tabla III se indica los resultados de un ensayo típico.
20. La cepa de infección para este experimento es la cepa 21 del Canadian Dept. of Health and Welfare Laboratory of Hygiene. Se usa un cultivo de 4 hr en medio de Frantz sobre una máquina sacudidora y se incuba a 37 °C. Se suspende la dosis de infección en mucosidad al 4 % y se administra intraperitonealmente
25. a razón de 1,0 ml por ratón.

TABLA III

Dilución	Muertes				Sobrevivientes	
	24 hr	48 hr	72 hr	144 hr		
Vacunas de meningococos P.S.A. Nº 1, lotes 2 y 3 reunidos	No diluido	0/20	2/20	2/20	2/20	18/20

317455



- 16 -

	1 - 5	3/20	6/20	6/20	6/20	14/20
	1 - 10	6/20	7/20	9/20	10/20	10/20
Vacunas de meningococos P.S.A. Nº 1, lotes 4 y 5 reunidos	No diluido	2/18	2/18	2/18	2/18	16/18
	1 - 5	0/20	0/20	0/20	0/20	20/20
	1 - 10	5/20	11/20	11/20	11/20	9/20
Testigos		15/20	18/20	18/20	18/20	2/20

Los resultados de la Tabla III demuestran que esta vacuna antigena somática proporciona buena protección a los ratones.

EJEMPLO VII

5. Se hace crecer cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) sobre un medio de Frantz modificado, en la manera descrita en los Ejemplos I y II. Se agrega al medio suficiente glicina para obtener una concentración de 1,5 % p/v. La incubación tiene lugar a 37°C durante 18 a 24 hr sobre una máquina sacudidora. Se agrega entonces Mertiolato para obtener una concentración final de 1:10.000. Se reincuba los cultivos sobre el sacudidor durante 18 a 24 hr. Se lleva a cabo ensayos de viabilidad en este punto, para asegurar que todas las bacterias quedan inactivadas.
10. Mientras todavía se encuentra sobre la máquina sacudidora, se agrega a los frascos, ya sea en una o dos etapas, una enzima de proteasa derivada de *Streptomyces griseus*. Se agrega un total de 10 µg de la enzima, con sacudimiento durante 24 hr entre las adiciones. Se continua el sacudimiento durante 1 a 3 días hasta que queda substancialmente completa la lisis. Se obtiene una vacuna relativamente clara que
- 15.
- 20.



- se ha comprobado que es eficaz para proteger ratones contra la infección con cepas de E. coli. homólogas a la cepa de la vacuna. En la Tabla IV se muestra un ejemplo de un ensayo típico. Se puede agregar esta
5. vacuna en pequeñas proporciones a vacuna contra la mastitis, puesto que el E. coli puede ser responsable para algunos casos de mastitis bovina. También puede encontrar uso en seres humanos para prevenir la diarrea infantil causada por E. coli.

10.

TABLA IVResultados

<u>Cepa Escherichia coli</u>			<u>Resultados de la infección</u>	
<u>Cepa Nº</u>	<u>Vacuna</u>	<u>Infección</u>	<u>Cantidad de ratones</u>	<u>Sobrevivientes</u>
15. A 634760	0-26	0-26	10	9
Testigo	-	0-26	10	0
B 634760	0-26	0-26	9	7
Testigo	-	0-26	10	0

EJEMPLO VIII

20.

Preparación de vacuna contra la morriña negraSiembra

- Se hace crecer cinco cepas de Clostridium chauvoei, por ejemplo, "WHW", "F", Deal, Oklahoma y Tosper, sobre caldo de tioglicolato de hígado a 37
25. °C durante 24 hr. Se usa entonces estos cultivos de siembra para inocular el medio de producción a razón de 1,0 ml por cada 100 ml de medio. La composición del medio de producción es la siguiente:

317455

- 18 -



	<u>Ingrediente</u>	<u>% p/v</u>
	Triptona	4,0
	Cloruro de sodio	0,5
	Extracto de levadura	0,5 (Amber X)
5.	L-Cisteína	0,05
	Glicina	0,25 - 0,75 (varía de acuerdo con la cepa)
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
10.	Dextrosa	0,5 (agregada asépticamente a partir de una solución estéril al 50% en existencia)

Se ajusta el pH a 7,8 mediante NaOH 5N antes de tratar en autoclave a 121 °C durante 15 min para su esterilización.

15. Referencia: J. Comp. Path. 67, 157 (1957).

Producción

Se hace crecer los cultivos de producción a 37 °C durante 24 hr y se los activa entonces con formalina al 0,5 %. Se agrega entonces Pronasa a razón de 5,0 µg/ml a partir de una solución en existencia que contiene 0,25 mg/ml. Después de la adición de la enzima, se ajusta el pH a 8,0 mediante NaOH 5N. Se activa a 45 °C durante 1 hr en un baño de agua y se deja reposar entonces a la temperatura ambiente durante 7 a 10 días, observando diariamente con respecto a cambios del pH y ajustando si fuera necesario, y observándose el progreso de la lisis. Cuando la lisis está completa, se ensaya el lisado con respecto a su esterilidad, seguridad y potencia en la manera usual.

30. Ensayo de la potencia



SEP 1950

- Por vía intramuscular se vacuna cinco cobayos con 1,0 ml de vacuna de *Costridium chauvoei* preparada a partir de células enteras lisadas según se describió más arriba. Diez días después, se administra por la misma vía una inyección de refuerzo de 1,0 ml. Diez días después de la inyección de refuerzo, se infecta por vía intramuscular dichos cinco cobayos, juntamente con otros cinco cobayos testigo no vacunados, mediante 0,5 ml de una suspensión normalizada de esporos de *Costridium chauvoei* que contiene 10 M.L.D. en 0,5 ml de suspensión. Sobreviven cuatro (80 %) de los cinco cobayos vacunados. En cambio mueren la totalidad de los cinco cobayos no vacunados.

EJEMPLO IX15. lisis con otros aminoácidos

Aunque la glicina constituye un aminoácido preferido, otros aminoácidos pueden activar la lisis de células bacterianas en una manera similar, de modo de producir vacuna útiles. Se demuestra esto en la Tabla V.

TABLA V

Aminoácido	Concentración, %	Estafilococo, Cepa N° 584763	Estafilococo, Cepa N° 596297
L.-Argentina	1,0	7×10^7	$8,5 \times 10^7 +$
25. D,L-Aspártico	2,5	1×10^7	$3 \times 10^7 +$
L-Histidina	1,5	1×10^7	$8 \times 10^7 +$
D,L-Valina	3,0	5×10^7	$8 \times 10^7 +$
L-prolina	3,0	2×10^7	$6 \times 10^7 +$
Glicina(testigo)	3,5	2×10^7	$12 \times 10^7 +$

317455



- 20 -

Otras cepas de bacterias que han sido utilizadas en la preparación de vacunas útiles son las siguientes:

5. Estafilococo 1645, 591714, 598022, 597497, 595354, 598074, 6003.
- Estreptococo 1510T35, 589T1, 601T11, 618T22, 599T9.
- Meningococo D2 (Lapeyssonnie), M111, N1 (Lapeyssonnie), 962 (Eran-non)
- M 132 (Lapeyssonnie).

10. Bacterias de especial interés son las de las familias: Micrococcaceae, Lactobacteriaceae, Pa-cillaceae y Enterobacteriaceae.

15. En dichas familias se encuentran los géne-ros Neisseria, Staphylococcus, Streptococcus, Esche-richia y Clostridium.

N O T A

20. Descrita suficientemente la naturaleza del invento así como la manera de realizarlo en la prác-tica, debe hacerse constar que las disposiciones an-teriormente indicadas son susceptibles de modifica-ciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento se refiere a dos solicitudes de patentes presentadas
25. en Norteamérica con fechas 14 de septiembre de 1964, nº 396.373 y 21 de diciembre de 1964, nº 420.130, aco-giéndose, por lo tanto, a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo
30. que se solicita Patente de Invención por 20 años en España: "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UNA VA



CUNA ANTIGENA SOMATICA"; caracterizándose por lo siguiente:

- 1ª.- Procedimiento para la producción de una vacuna antígena somática, a partir de bacterias inactivadas lisadas, caracterizado porque comprende la etapa de hacer crecer la bacteria en un medio de cultivo que contiene uno o más de los aminoácidos utilizados en o asociados con la síntesis de estructuras de células mediante dichas bacterias en una cantidad suficiente para dar por resultado la formación de bacterias más susceptibles a la lisis.
5. 10.

- 2ª.- Procedimiento para la producción de una vacuna antígena somática a partir de bacterias inactivadas lisadas elegidas de las familias Micrococcaceas, Lactobacteriaceas, Bacillaceae, Enterobacteriaceae y Neisseriaceas, caracterizado porque comprende la etapa de hacer crecer las bacterias en un medio de cultivo que contiene uno o más de los aminoácidos utilizados en o asociados con la síntesis de estructuras de células mediante dichas bacterias en una cantidad suficiente para dar por resultado la formación de bacterias más susceptibles a la lisis.
15. 20.

- 3ª.- Procedimiento para la producción de una vacuna antígena somática a partir de bacterias inactivadas lisadas, caracterizado porque comprende la etapa de hacer crecer las bacterias en un medio de cultivo que contiene uno o más de los aminoácidos utilizados en o asociados con la síntesis de estructuras de células mediante dichas bacterias en una
25. 30.

317455



- 22 -

cantidad suficiente para dar por resultado la formación de bacterias más susceptibles a la lisis, pero insuficiente para inhibir seriamente el régimen de crecimiento de las bacterias.

5. 4ª.- Procedimiento para la producción de vacuna antígena somática, que comprende las etapas de elegir una o más cepas de bacterias, cultivar las bacterias sobre un medio de cultivo apropiado que contienen uno o más de los aminoácidos utilizados en o asociados con la síntesis de estructuras de células mediante dichas bacterias en una cantidad suficiente para dar por resultado la formación de bacterias más susceptibles a la lisis, cosechar el crecimiento resultante, inactivar las bacterias y luego lisar las bacterias.
- 10.
15. 5ª.- Procedimiento para la producción de vacuna antígena somática a partir de bacterias inactivadas lisadas de cepas elegidas del grupo que consiste en *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria* y *Clostridium* y combinaciones aceptables de las mismas, caracterizado porque comprende la etapa de hacer crecer dicha bacteria en un medio de cultivo que contiene uno o más aminoácidos utilizados en o asociados con la síntesis de estructuras de células mediante dichas bacterias en una cantidad suficiente para dar por resultado la formación de bacterias más susceptibles a la lisis.
- 20.
- 25.
30. 6ª.- Procedimiento para la producción de vacuna antígena somática, caracterizado porque comprende hacer crecer bacterias inactivadas lisadas



14 SEP 48

- elegidas entre los estreptococos cepas A 36(1118), C(1628), A 19 (616), A 12 (602) y combinaciones aceptables de las mismas, en un medio de cultivo que contiene uno o más de los aminoácidos utilizados en la
5. síntesis de estructuras de células mediante dichas bacterias en una cantidad suficiente para dar por resultado la formación de bacterias más susceptibles a la lisis.
- 7^a.- Procedimiento para la producción de
10. vacuna antigénica somática, caracterizado porque comprende hacer crecer bacterias inactivadas lisadas, elegidas entre Neisseria, (Meningococcus) cepas - MLC27 (s. Branham) Z1 (Lapeys-sonnie) M129 (Lapeyssonnie); (Escherichia coli) cepas - A634760, B634760 y combi-
15. naciones aceptables de las mismas, en un medio de cultivo que contiene uno o más de los aminoácidos utilizados en la síntesis de estructuras de células mediante dichas bacterias en una cantidad suficiente para dar por resultado la formación de bacterias más
20. susceptibles a la lisis.
- 8^a.- Procedimiento para la producción de
- vacuna antigénica somática, caracterizado porque comprende hacer crecer bacterias inactivadas lisadas elegidas entre Clostridium chauvoei cepas - "WHW",
25. "F", Deal, Oklahoma y Tosper y combinaciones aceptables de las mismas, en un medio de cultivo que contiene uno o más de los aminoácidos utilizados en la síntesis de estructuras de células mediante dichas bacterias en una cantidad suficiente para dar por
30. resultado la formación de bacterias más susceptibles

317455



- 24 -

a la lisis.

5. 9ª.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en que se hace crecer dichas bacterias en un medio de cultivo que contiene aproximadamente entre 0,1 y 5,0% por peso de dichos aminoácidos.

10. 10ª.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4ª, en que se elige los aminoácidos del grupo que consiste en glicina, L-prolina, D,L-valina, L-histidina, D,L-aspartico y L-arginina, y están presentes en una concentración comprendida entre 1 y 5% por peso.

15. 11ª.- Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1ª, 3ª ó 4ª, en que el medio de cultivo es un medio de Frantz modificado.

20. 12ª.- Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1ª, 2ª ó 3ª, en que se acelera la lisis de dichas bacterias por tratamiento de las mismas con una enzima lítica, después de inactivarlas con un bactericida apropiado.

25. 13ª.- Procedimiento para la producción de vacuna antigénica somática a partir de bacterias inactivadas lisadas de cepas elegidas del grupo que consiste en Escherichia, Staphylococcus, Neisseria y Clostridium y combinaciones aceptables de las mismas, caracterizado porque comprende la etapa de hacer crecer dichas bacterias en un medio de cultivo que contienen aproximadamente entre 0,1 y 5,0% por peso de uno o más de los aminoácidos utilizados en la síntesis de estructuras celulares mediante dichas bac-

30.



terias.

- 14ª.- Procedimiento para la producción de vacuna antigéna somática, la mejora que comprende hacer crecer bacterias inactivadas lisadas elegidas de los estafilococos cepas 584.763, 596.535, 596.510, 596.297, 6032 y combinaciones aceptables de las mismas, en un medio de cultivo que contiene uno o más aminoácidos utilizados en la síntesis de estructuras de células mediante dichas bacterias en una cantidad suficiente para dar por resultado la formación de bacterias más susceptibles a la lisis.

- 15.- Procedimiento para la producción de vacuna antigéna somática contra la mastitis, a partir de bacterias inactivadas lisadas elegidas del grupo que consiste en estafilococos, estreptococos y E. coli, caracterizado porque comprende la etapa de hacer crecer dichas bacterias en un medio de cultivo que contiene aproximadamente entre 1 y 5% por peso de glicina.

- 20.- "Procedimiento para la producción de una vacuna antigéna somática"; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

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

Madrid, 14 SEP 1965

CANADIAN PATENTS AND DEVELOPMENT LIMITED.-

J. GOMEZ ACEBO Y MODET
P. p. Firmador: F. Hernández Ruiz