

325308



P-31.714

PH.18422

325308

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

PATENTE DE INVENCION

formulada el 7 de Abril de 1966, con el número 325.308

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de N.V. PHILIPS'GLOEILAMPENFABRIEKEN, entidad holandesa, establecida en Emmasingel 29, Eindhoven, Holanda, por:

"METODO DE PRODUCCION DE UNA VACUNA LIQUIDA DE BACTERIAS BRUCELLA ABORTUS Y SUS ETAPAS DE DESARROLLO".

5 Ya es conocido desde hace muchos años que los hombres, vacas, ovejas, cabras y cerdos son sensibles a infecciones con bacterias del grupo Brucella. La bacteria Brucella abortus se ha vuelto notablemente conocida como causante del aborto de las vacas. Esta forma de brucelosis no solamente produce la pérdida del fruto sino que también puede dar lugar directamente a enfermedades y una producción reducida del animal madre. Las infecciones con Brucella melitensis se producen en las ovejas y cabras
10 y producen igualmente enfermedades peligrosas.

325308

18



5 Las pruebas realizadas para combatir eficazmente las infecciones de *Brucella abortus* han cubierto un vasto campo. Así se ha obtenido éxito en el cultivo de la bacteria sobre un medio de cultivo artificial, tanto sobre un medio de cultivo sólido como líquido, lo que hace fundamen-
talmente posible la producción de vacunas. También se ha estudiado que cepas de bacterias pueden producir en la práctica la inmunidad más eficaz, sin efectos adicionales indeseables.

10 De las varias cepas del grupo *Brucella abortus* se han producido vacunas, entre otras, de la así llamada cepa 19. Esta cepa es avirulenta y se ha encontrado que produce una inmunidad satisfactoria cuando es administrada viva. Sin embargo, esta vacuna tiene la desventaja de que los
15 animales vacunados con ella adquieren títulos de aglutinación positiva que a menudo persisten. Tal animal posteriormente ya no puede ser distinguido serológicamente de un animal que ha sufrido una infección natural. Otra cepa de *Brucella abortus* sin las desventajas mencionadas es
20 la cepa rugosa 45/20 elegida por Mc Ewen (Vet. Rec. 50, 1097, 1938). Esta cepa cuando es administrada a un ser vivo, produce una inmunidad satisfactoria contra las infecciones por *Brucella abortus* y, además no existe sustancialmente actividad aglutinógena. Dado que esta cepa después
25 de un pasaje en serie a través de animales puede readquirir una forma virulenta, el uso de esta cepa es posible solamente en vacunas muertas.

30 Algunos investigadores han prestado atención a la forma más eficaz de formulación de las vacunas de *Brucella* muertas. En varias publicaciones se ha mostrado que



5 el uso de una vacuna de *Brucella abortus* muerta en forma adyuvante produce una inmunidad más elevada que la de una vacuna similar en un medio exclusivamente acuoso (Live, J. Am. Vet. Res. 10, 34 (1949), Watkin y Dzenes, Can. J. of Comp. Med. and Vet. Sc. 16, 78, 1952 a). En las pruebas antes mencionadas el adyuvante consistía en un aceite mineral al que se había agregado un agente emulsificador. Los agentes emulsificadores usados fueron Arlacel A, Arlacel B y Falba.

10 Mc Ewen ha producido también con la cepa 45/20 rugosa una vacuna muerta adyuvante cuyo adyuvante consistía en 4 partes de parafina líquida B.P. y 1 parte de Falba. (Vet. Rec. 67, 546 (1955). En animales de prueba se obtuvo una inmunidad más satisfactoria con la misma sin la
15 interferencia de que ocurriesen títulos de aglutinación. Mc Diarmid (Vet. Rec. 69, 1067, (1957). Vet. Rec. 72, 917 1960. Ann. L^e Institut Pasteur 102, 792-799, 1962) ha continuado las pruebas de Mc Ewen en animales de prueba pequeños y vacas siendo confirmados durante estas pruebas los
20 resultados de Mc Ewen.

Sin embargo se ha encontrado, además, que con dicha vacuna se produce una hinchazón local molesta, tanto después de la inyección intramuscular como de la subcutánea. Esta desventaja no es despreciable dado que el valor
25 de las vacas disminuye si se producen en sus tejidos variaciones locales debidas a las inyecciones.

La solicitante ha desarrollado un método para la producción de una vacuna adyuvante de cepa *Brucella abortus* muerta y para la administración de tal vacuna, con la que puede lograrse una inmunidad comparativamente elevada
30 en vacas, sin que el valor del ganado sea disminuído con

325308

13



ello.

De las pruebas realizadas por la solicitante se ha encontrado que el cultivo en un medio líquido produce un rendimiento de bacterias *Brucella abortus* que es considerablemente mayor que el del cultivo en un medio sólido. La solicitante ha encontrado también que una vacuna obtenida del cultivo de tales bacterias en un medio de cultivo líquido produce una inmunidad mayor que la de una vacuna del mismo número de dichas bacterias que fueron cultivadas en un medio de cultivo sólido. Estos resultados se han obtenido especialmente con la bacteria rugosa *Brucella abortus* 45/20 de Mc Ewen o sus etapas de desarrollo. Así en una forma preferida de la invención se utilizan estas bacterias o sus etapas de desarrollo.

La solicitante ha encontrado también que los resultados obtenidos con una vacuna adyuvante cuyo agente emulsificador consiste en un agente emulsificador de agua en aceite que tiene un número H.L.B. de 1 a 8 y un agente emulsificador de aceite en agua que tiene un número H.L.B. de 13 a 18 en que la cantidad de agente emulsificador de aceite en agua es de 10 a 2% en volumen del agente emulsificador de agua en aceite son más satisfactorios que los obtenidos con una vacuna adyuvante correspondiente en la que solamente está presente el agente emulsificador de agua en aceite. La primera vacuna mencionada tiene una estabilidad mayor que la del otro tipo de vacuna adyuvante y especialmente tiene una viscosidad considerablemente menor a una temperatura baja.

Estas ventajas se obtienen especialmente si el agente emulsificador de agua en aceite consiste en ésteres mono, di o trioleato de manie, sorbitano, manitano o mez-

325508



clas de los mismos, preferiblemente del monoato de manita,
y el agente emulsificador de aceite en agua consiste en de-
rivados polioxietileno de ésteres de un polialcohol y un
ácido graso con 12 a 20 átomos de carbono, preferiblemente
5 el derivado polioxietileno de aceite de ricino que contie-
ne un promedio 35 a 45 grupos de oxietileno por molécula de
aceite de ricino. Debido a esta última propiedad, la pri-
mer vacuna mencionada puede ser inyectada más fácilmente que
el otro tipo, obteniéndose una actividad antigéna muy pro-
longada y una inmunidad elevada como resultado de la gran
10 estabilidad de la emulsión. La solicitante ha encontrado tam-
bién que con la inyección intramuscular de la vacuna adyu-
vante se evitan sustancialmente las hinchazones en el área
de inyección, lo que no ocurre si la vacuna es subcutánea-
mente inyectada. La inyección se efectúa preferiblemente en
15 los músculos del cuello justamente frente al omóplato. En
esta área la inyección para el ganado es casi indolora sien-
do pequeña cualquier hinchazón que pudiera producirse en el
área en que la carne tiene solo poco valor. Además, los mús-
culos justamente frente al omóplato son poco contráctiles de
20 modo que la vacuna permanece en ese lugar de manera adecua-
da y no puede producirse hinchazón fuera del área de inyec-
ción. La vacunación se repite una o varias veces para obtener
una inmunidad óptima. Preferiblemente se realizan dos vacu-
naciones con un intervalo de 8 a 12 semanas.

Cuando se procede de esta manera se obtiene una
inmunidad que, tomando en cuenta cualesquier diferencias de
animal a animal, es tan buena como la que puede obtenerse
con una inyección de una vacuna viva de la cepa S 19, con
30 la ventaja de que no se producen títulos de aglutinación o,

325308



excepcionalmente, solo se producen títulos bajos temporarios de aglutinación.

Una ventaja adicional de la invención, resultante del elevado rendimiento de bacterias por mililitro de líquido de cultivo y del alto valor inmunizante de las mismas, es que es posible inyectar a los animales, cada vez, una pequeña cantidad de vacuna adyuvante (a saber 2 mililitros) que contiene un gran número de bacterias (muertas), sea 400×10^9 por mililitro de líquido de vacuna. En la práctica también puede ser suficiente una dosis menor, a saber 200×10^9 bacterias por inyección. En general se inyectarán entre 50 y 500×10^9 bacterias por inyección en cada animal.

EJEMPLO

A una ampolla que contenía gérmenes vivos de cepa 45/20 de *Brucella abortus* secada por congelación (número total de gérmenes 50×10^9), se agregaron 2 mililitros de solución fisiológica triptosada. Luego 0,05 mililitros de la suspensión antes mencionada fueron agregados a cada uno de veinte tubos llenos con agar triptosa. Los tubos fueron almacenados al aire durante 2 x 24 horas, con agitación, a 37°C. Luego se agregó a cada tubo 2 mililitros de un medio líquido, 1 litro del cual tenía la siguiente composición: 1000 ml de agua corriente, 30 mg de peptona de proteosa "Difco", 30 gr de glucosa (calidad farmacéutica), 10 gr de complejo de vitamina B en forma de extracto de levadura, 2,004 gr de fosfato de sodio secundario ($\text{Na}_2\text{H PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Frascos de agitación, cada uno de los cuales contenía 200 ml del medio líquido mencionado en el párrafo precedente, fueron inoculados con la ayuda de los cultivos así obtenidos. Los frascos fueron aireados a 37°C durante 2 x 24



horas. Los contenidos de cada frasco fueron luego divididos en diez partes iguales y cada porción fué agregada a un frasco de agitación que contenía 200 ml del medio líquido precedentemente mencionado.

5 Cada frasco fué aireado a 37°C durante 3 x 24 horas. Se contó el número de gérmenes (muertos y vivos) por ml al final del tercer día; éste era en promedio 150×10^9 . En otras palabras, el factor de aumento fué de 6 (la concentración inicial de gérmenes era 25×10^9 gérmenes por ml). El
10 número de gérmenes vivos por ml en los cultivos era aproximadamente 75×10^9 . Susecuentemente las bacterias fueron muertas calentando los cultivos a 60°C durante 2 horas. El líquido fué centrifugado, el líquido claro fué eliminado y el centrifugado suspendido en agua a la que se había agregado
15 mertiolato en una relación de 1 : 10.000. La concentración final de los gérmenes era de 400×10^9 ml.

55 ml de la suspensión así obtenida fueron homogeneizados con agitación a fondo y bajo condiciones estériles, en una mezcla estéril compuesta de 40 cm³ de aceite para vacuna (marca Bayol F), viscosidad 9 c.p. a 37,7°C, rango de
20 ebullición 314°C a 357°C; 4,7 cm³ de monooleato de manita y 0,3 cm³ de aceite de ricino-polioxietylado, que contenía aproximadamente 40 mols de óxido de etileno por molécula de aceite de ricino. La vacuna así preparada fué almacenada a
25 40°C durante 4 meses y después de este período fué aún completamente estable y no mostraba separación de aceite. Cuando se fabricó una segunda vacuna adyuvante exactamente bajo las mismas condiciones y con el uso de constituyente similares, pero omitiendo el aceite de ricino polioxietylado, la misma
30 mostraba una separación de aceite de 65%, calculado sobre la

325308



cantidad inicial de aceite mineral, después de un almacenamiento de 4 meses bajo condiciones similares, mientras que la pulverizabilidad de la última vacuna mencionada era claramente inferior a una temperatura baja (de 5 a 10°C).

5 Se vacunaron vacas en sus músculos del cuello, justamente frente al omóplato, con la vacuna adyuvante así producida. Cada animal fué inyectado con 2 ml que contenían aproximadamente 400×10^9 bacterias o gérmenes. De los 7 animales así vacunados solamente uno mostró una reacción mientras
10 que los otros animales no mostraron hinchazón o mostraron solamente una pequeña hinchazón difusa. La primera vacunación fué seguida después de diez semanas por una segunda inyección con la misma vacuna, igualmente con 2 ml por animal.

15 En otra prueba, la vacuna adyuvante fué producida de un líquido de vacuna obtenido de un cultivo de bacteria de cepa rugosa 45/20 de Brucella abortus sobre un medio de cultivo sólido. El rendimiento de gérmenes en el medio de cultivo sólido fué inferior al obtenido en el medio de cultivo líquido. Al preparar el líquido de vacuna se aseguró que se
20 obtuviera también una concentración de 400×10^9 gérmenes por ml. El líquido de vacuna fué trabajado para obtener una vacuna adyuvante exactamente de la misma manera que en la producción de una vacuna adyuvante de un líquido de vacuna proveniente del medio de cultivo líquido, de modo que finalmente se obtuvieron dos vacunas adyuvantes que tenían el mismo
25 número de gérmenes por ml y que diferían solamente en la manera en que se habían cultivado los gérmenes.

30 Un grupo de 7 vacas fueron inyectadas también intramuscularmente en sus cuellos, frente a sus omóplatos, con el segundo tipo de vacuna adyuvante. Las dosis fueron relativamente las mismas en uno y otro grupo.

325508



Para determinar la efectividad de las inyecciones se determinó la concentración de anticuerpos protectores 6 y 12 semanas después de la segunda inyección mediante medición de los títulos Coombs en el suero. En cada caso se
5 encontró que la vacuna adyuvante obtenida de las bacterias cultivadas en medio líquido daba un título Coombs más alto que el de la vacuna adyuvante obtenida de las bacterias cultivadas sobre un medio sólido.

N O T A

10 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

15 1.- Método de producción de una vacuna líquida de bacterias *Brucella abortus* y sus etapas de desarrollo, CARACTERIZADO porque gérmenes de bacterias *Brucella abortus* son cultivados sobre un medio de cultivo líquido, y porque un líquido para vacunar es obtenido de las bacterias así cultivadas de una manera en lo demás conocida.

20 2.- Método de acuerdo con la reivindicación 1 CARACTERIZADO porque los gérmenes son cultivados con aireación.

3.- Método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque se usan gérmenes de la cepa rugosa 45/20 de Mc Ewen de *Brucella abortus*.

325308



4.- Método de acuerdo con la reivindicación 1 CA-
RACTERIZADO porque después que ha transcurrido el período de
cultivo, las bacterias y sus etapas de desarrollo son muer-
tas mediante calentamiento moderado por encima de la tempera-
tura de cultivo.

5
5.- Método de acuerdo con la reivindicación 1, CA-
RACTERIZADO porque la etapa de calentamiento tiene lugar a
una temperatura comprendida entre 50°C y 75°C.

6.- Método de producción de una vacuna líquida de
10 bacterias *Brucella abortus* y sus etapas de desarrollo.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede y para los fines que se han especificado.

La presente Memoria consta de diez hojas escritas
a máquina por una sola cara.

23 NOV. 1966

Madrid,

P.A.

Alberto de Elzaburd
For Peder

RE

18-XI-1966