



331444

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

formula el 21 de septiembre de 1.966 con el N^o 331.444

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de PARKE, DAVIS & COMPANY, entidad norteamericana, establecida en Joseph Campau Avenue at the River, Detroit, Michigan, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR ANTIGENO PROTECTOR DE BORDETELLA PERTUSSIS"

=====

El presente invento se refiere a un procedimiento nuevo y mejorado para extraer antígeno protector soluble del organismo Bordetella pertussis.

5

El Bordetella pertussis es el organismo causante de la enfermedad infantil de la tosferina. Es conocido que una sustancia antigenica presente en el Bordetella pertussis y disponible en vacunas de células muertas o en preparaciones de antígeno extraído, es capaz de proteger o inmunizar contra esta enfermedad.

10

Es un objeto del presente invento crear un procedimiento para extraer antígeno protector de B. pertussis a un pH más bajo que



lo que es factible con los métodos actuales conocidos.

Otro objeto del invento es el de crear un procedimiento para extraer antígeno protector de B. pertussis a un pH relativamente bajo con lo cual se obtiene un rendimiento mejorado en antígeno muy purificado que tiene mínima contaminación con ácidos nucleicos ribosómicos.

5

Un nuevo objeto del invento es crear un procedimiento para extraer antígeno protector de B. pertussis bajo condiciones en las que se hace mínima la desnaturalización de las proteínas y la formación de subproductos hidrolíticos solubles.

10

Todavía otro objeto más del invento es el de crear un procedimiento para extraer antígeno protector de B. pertussis bajo condiciones en las que se obtiene un buen rendimiento en antígeno muy purificado sin necesidad de conducir las operaciones bajo refrigeración.

15

Este objeto, así como otros objetos que aparecerán en lo que sigue, se logran mediante el procedimiento nuevo y mejorado seguidamente descrito.

Es conocido en la técnica preparar antígeno protector de B. pertussis haciendo crecer B. pertussis en presencia de un medio nutriente, recogiendo el producto desarrollado de células bacterianas, y extrayendo las células con una solución extractora que tiene determinadas características bien definidas con lo cual se extrae una sustancia antigénica de las células bacterianas dentro de la solución extractora.

25

La patente USA 3.141.824 describe, como solución extractora, una solución de cloruro de sodio 0,5 a 1,5 molar que se emplea a una temperatura entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10°C y a un pH superior a 8,5 e inferior a 10,5, preferiblemente entre aproximadamente 9,8 y aproximadamente 10,2. Cuando se trabaja de

30

27 OCT



acuerdo con el método de la patente USA 3.141.824, se especifica que por debajo del pH 9,8 la extracción resulta progresivamente menos eficaz y por encima del pH 10,2 el antígeno tiende a resultar inactivado.

5 El presente invento crea, en un procedimiento para preparar antígeno protector de B. pertussis por extracción de dicho antígeno desde células de B. pertussis con una solución acuosa, la mejora que comprende extraer dichas células con una solución extractora de bromuro de litio, teniendo dicha solución extractora una
10 concentración en bromuro de litio entre aproximadamente 0,75 molar y aproximadamente 2,25 molar, a un pH superior a 6,0 e inferior a 8,5, y a una temperatura por debajo de aproximadamente 25°C, hasta que se haya extraído una cantidad sustancial de dicho antígeno dentro de dicha solución extractora; y separar la solución extractora
15 que contiene antígeno de dichas células y de los residuos celulares de las mismas. Así, la mejora específica del presente invento consiste en la utilización de una solución extractora de bromuro de litio que permite trabajar a un pH más bajo y, si se desea, a una temperatura más alta, con las mejoras acompañantes o concomitantes en
20 el rendimiento y la calidad del producto antigénico.

Las células de B. pertussis apropiadas para su utilización como material de partida en el procedimiento del invento pueden ser preparadas por uno cualquiera entre una variedad de métodos. Por ejemplo, una capa antigénica de B. pertussis en la fase I es nuevamente suspendida a partir del estado liofilizado y es extendida en
25 forma de raya sobre un cultivo inclinado de agar. El cultivo es incubado a 35-37°C hasta que aparece un producto desarrollado visible. Esta operación de cultivo de B. pertussis se repite por transferencia sucesiva o en serie a medios de agar frescos contenidos en tubos
30 o botellas de ensayo mayores para obtener suficiente siembra de -

cultivo para los matraces de crecimiento de producción. Los órganos son recogidos entonces desde la superficie del agar por rascado o por lavado con solución salina fisiológica y los órganos resultantes son utilizados para sembrar los matraces de crecimiento de producción. Para crecimiento en gran escala se utilizan matraces Roux que contienen un medio nutriente sólido, preferiblemente medio líquido de Cohen y Wheeler para pertusis al cual se han añadido agar y carbon orgánico. La superficie del medio es enegada o completamente rayada con los organismos de siembra y los matraces son incubados a 35-37°C hasta que aparece un crecimiento concurrente. Los organismos son entonces recogidos o cosechados mediante lavado con un medio acuoso tal como agua o solución salina, o mediante rascado y suspensión en un medio acuoso tal como agua o solución salina. Las suspensiones recogidas o cosechadas son investigadas en cuanto a la pureza y a la morfología y después son agrupadas. Esencialmente todos los organismos deberán estar en la fase I tal como se indica por su aspecto de baulos corcoides. La concentración en células se mide en términos de densidad óptica por comparación con una opacidad patrón proporcionada por la Division of Biological Standards, National Institutes of Health. La suspensión es centrifugada y el líquido flotante o efluente transparente es desechado o retenido con la finalidad de recuperar el producto antigénico que contiene, tal como se describe seguidamente con mayor detalle. La masa celular húmeda es apropiada como material de partida para el procedimiento de extracción del invento. Si se desea, la masa celular puede ser almacenada en el estado congelado antes de la utilización.

Por el procedimiento que se describe anteriormente, las células de B. pertussis son primeramente lavadas con agua o suspensiones en agua, solución salina u otros medios acuosos, antes de

27 OCT.



ser sometidas a la extracción con bromuro de litio. Es también satisfactorio utilizar células sin lavar en la extracción con bromuro de litio. El producto final obtenido de las células sin lavar es satisfactorio desde el punto de vista de potencia y toxicidad, pero la viscosidad mucho más alta de los extractos hace bastante difícil la separación por centrifugación de la masa celular extraída. Por esto, la utilización de células sin lavar para la extracción con bromuro de litio es un método aceptable pero no preferido para llevar a cabo el procedimiento del invento.

De acuerdo con el procedimiento del invento, células de B. pertussis, hechas crecer de la manera anterior o por cualesquiera otros medios apropiados, son extraídas con una solución de bromuro de litio aproximadamente 0,75 a 2,25 molar, a un pH superior a 6,0 e inferior a 8,5, y a una temperatura por debajo de aproximadamente 25°C. La solución extractora preferida es bromuro de litio aproximadamente 1,0 molar (0,8 a 1,2 molar) a un pH de aproximadamente 8,0 (7,8 a 8,2). Se obtiene un producto de la máxima pureza trabajando a bajas temperaturas, por ejemplo a aproximadamente 5 a 10°C, pero, si se desea, el procedimiento de extracción se puede llevar a cabo a temperaturas hasta de aproximadamente 25°C sin un efecto sustancialmente perjudicial sobre el rendimiento y la pureza del producto, evitando de esta manera la necesidad de operaciones de fabricación o preparación refrigeradas. La extracción se lleva a cabo hasta que se extraiga de la solución extractora una cantidad sustancial del antígeno, y generalmente la extracción se lleva a cabo hasta que la extracción del antígeno sea sustancialmente completa. El tiempo de extracción usual es al menos de aproximadamente 1 hora y de la manera más común de aproximadamente 16 a 24 horas. Sin embargo, cuando se trabaja a temperaturas más altas próximas a 25°C, se prefiere limitar el tiempo de extracción a unas



pocas horas. La proporción de solución extractora a masa celular húmeda puede ser hecha variar dentro de límites relativamente amplios pero, en general, se acostumbra utilizar aproximadamente 15 a 40 ml de solución extractora por g. de masa celular húmeda, utilizándose una proporción relativamente alta para las soluciones de bromuro de litio menos concentradas, y una proporción relativamente baja para las soluciones de bromuro de litio más concentradas. Cuando la solución extractora es bromuro de litio 1,0 molar, la proporción preferida es de aproximadamente 33 ml de solución extractora por 1 g de masa celular húmeda.

La solución extractora puede contener y en la mayor parte de los casos contiene, pequeñas cantidades de sustancias disueltas además del bromuro de litio. Usualmente se añade un agente tamponador tal como tris(hidroximetil)amino metano, un borato o barbital de sodio, para mantener un pH constante durante el procedimiento de extracción. Es preferible incorporar un agente formador de quelatos tal como ácido etilendiaminotetraacético, ácido trans-1,2-diaminociclohexanotetraacético, o una sal de uno de los precedentes compuestos, ya que esto facilita el tratamiento y da como resultado un producto de mejor calidad. Es también deseable incorporar un antioxidante tal como beta-mercaptoetanol para evitar o hacer mínima la oxidación con aire de las proteínas bacterianas. Se añade un ácido o una base en lo requerido para ajustar el pH.

Después del proceso de extracción, la solución extractora que contiene antígeno es separada de las células bacterianas y de los residuos celulares por centrifugación o por otros medios apropiados para separar los materiales sólidos. El extracto antigénico acuoso puede ser sometido, si se desea, a nuevas operaciones de purificación. Por ejemplo, el extracto es dializado frente a agua deseionizada hasta que la concentración en bromuro de litio sea -



menor de 0,1 molar, preferiblemente 0,02 a 0,04 molar. El anti-
geno de pertussis es precipitado entonces ajustando el pH a apro-
ximadamente 4,6-4,8, por ejemplo con acido diluido. El antigeno
es recogido por centrifugación y después puede ser reconstituido
5 en un medio acuoso apropiado para inyección parenteral. Dicho me-
dio es una solución tamponada, protegida contra la contaminación
bacteriana y la descomposición química por la adición de un agente
de conservación tal como timerosal. Esta solución reconstituida
es ensayada en cuanto a su potencia y es diluida entonces para -
10 proporcionar 12 unidades protectoras de raton por ml o por dosis
inmunizante, la potencia comun utilizada usualmente para vacunación
La solución antigenica diluida puede ser tambien adsorbida sobre
vehiculos apropiados tales como hidroxido de aluminio o fosfato de
aluminio para producir un antigeno adsorbido. La solución antige-
15 nica diluida puede ser tambien combinada con otros agentes immuni-
zantes tales como vacunas contra el tetanos, la difteria y la polio-
melitis, para producir de esta manera productos de vacuna polivalen-
te.

El procedimiento de extracción del presente invento apor-
20 ta diversas ventajas en la extracción del antigeno de pertussis.
El procedimiento permite trabajar en un medio aproximadamente neu-
tro o ligeramente alcalino, es decir a un pH superior a 6,0 e in-
ferior a 8,5, y de esta manera la extracción se lleva a cabo bajo
condiciones más suaves y más proximas a las fisiologicas. Sin em-
25 barco, un trabajo satisfactorio a un pH superior a 6,0 e inferior
a 8,5 no es practicable con una solución extractora de cloruro de
sodio. Por ejemplo, se obtiene poco o nada de antigeno pertussis
utilizando cloruro de sodio 1 molar a un pH de 7 a 8. Otra ventaja
del procedimiento del presente invento es que se obtiene un produc-
30 to antigenico mucho mas purificado. Se encuentra que cuando se em-

plaa el procedimiento del invento hay poca o ninguna extracción de ácidos nucleicos ribosomicos en el extracto antigenico ya que estos son precipitados por el ión litio. Además, el pH más bajo hace mi-
5 nima la desnaturalización de las proteínas, hace minima la forma-
ción de subproductos hidroliticos solubles, y permite la utiliza-
ción de temperaturas más altas hasta de aproximadamente 25°C.

La solución extractora de bromuro de litio, tal como se describe anteriormente, puede ser utilizada tambien a pH superiores a 3,5 e inferiores a aproximadamente 10,5, pero sin alcanzar todas
10 las ventajas de trabajar en el margen de pH superior a 6,0 e infe-
rior a 8,5.

De acuerdo con un aspecto opcional del invento, los pro-
ductos antigenicos obtenidos tal como se describe anteriormente por
medio de extracción con bromuro de litio pueden ser combinados con
15 el antigeno obtenido desde el liquido de lavado inicial de las ce-
lulas con agua, solución salina u otro medio acuoso. Para este fin,
la solución flotante transparente obtenida del lavado de células
original puede ser tratada ajustando el pH a aproximadamente 4,6-4,8,
recorriendo por centrifugación el producto antigenico sólido precipi-
20 tado y añadiendo el producto antigenico sólido precipitado al extrac-
to de bromuro de litio o al producto antigenico sólido precipitado
obtenido del extracto de bromuro de litio. Los productos antigeni-
cos solidos pueden ser tambien combinados después de la homogeneiza-
ción en un medio acuoso apropiado. Alternativamente, la solución -
25 flotante transparente procedente del lavado de células original pue-
de ser añadida directamente al extracto de bromuro de litio y el -
ulterior tratamiento de la solución combinada se puede llevar a ca-
bo tal como se describe anteriormente.

El invento es ilustrado por los siguientes ejemplos.

30 Ejemplo 1.- Se prepara una solución extractora disolvien-



do 1,2 gramos de tris(hidroxi metil)aminometano, 105 gramos de monohidrato de bromuro de litio y 17 mg de sal disodica de ácido etilendiaminotetraacetico en 700 ml de agua desionizada, ajustandose seguidamente el pH a 8,0 con ácido clorhidrico diluido y diluyendose el volumen final hasta 1.000 ml con agua desionizada. Esta solución extractora es mezclada en un mezclador de alta velocidad durante 15 segundos a 5°C con 30 g de masa celular humeda de B. pertussis. Con agitación, se añaden 10 ml de beta-mercaptoetanol 0,1 molar, y la mezcla es mantenida a 5°C durante 18 horas y después es centrifugada en una centrifuga refrigerada a 1500 veces la gravedad durante $1\frac{1}{2}$ horas. La fase líquida flotante es separada, es filtrada a través de lana de vidrio, y es dializada durante 18 horas a 5°C, sucesivamente frente a dos porciones de 6 litros de agua desionizada. La mezcla resultante es acidificada con ácido acetico 2,0 normal a pH 4,6 y el producto antigenico sólido precipitado es recogido por centrifugación a 8000 veces la gravedad durante 30 minutos a 5°C. Este producto es homogeneizado con 200 ml de tris(hidroxi metil)aminometano 0,02 molar. La mezcla es ajustada a pH 7,2 con ácido clorhidrico diluido y se añade timerosal hasta una concentración final de 1:10.000. Mediante el ensayo en vivo normalizado, se encuentra que esta solución contiene 420 unidades protectoras de ratón por ml.

Las células de B. pertussis requeridas como material de partida pueden ser obtenidas de la siguiente manera. Se preparan 8 pequeños tubos de ensayo que contienen cultivos inclinados de agar de Bordet Gengou más 20% de sangre de conejo normal desfibrinada. Cada cultivo inclinado es inoculado con B. pertussis liofilizado, reconstituido con un pequeño volumen de caldo nutriente. Los cultivos son incubados a 35-37°C durante 48 horas, y mediante un anillo o lazo de alambre de platino esteril, los organismos son

27 OCT 1946



retirados y rayados sobre 24 grandes tubos de ensayo que contienen
cultivos inclinados de agar de Bordet Genou más 20% de sangre de
conejo normal desfibrinada. Estos grandes tubos de ensayo son tam-
bien incubados a 35-37°C durante 48 horas y los organismos son re-
tirados tal como se describe anteriormente y son rayados sobre la
superficie de un medio de agar de sangre en 24 matraces de Roux.
El medio utilizado es un medio líquido preparado de acuerdo con el
método de Cohen y Wheeler, American Journal of Public Health, 36,
371-376 (1946) al que se ha añadido también 2,5% de agar y 20% de
sangre de conejo normal desfibrinada. Los matraces de Roux son
incubados a 35-37°C durante 48 horas. El cultivo de cada matraz es
examinado microscópicamente en cuanto a su pureza y los matraces
con producto desarrollado satisfactorio son utilizados como culti-
vo de siembra para los matraces de producción final. Los matraces
de producción son 400 matraces de Roux que contienen el medio lí-
quido de Cohen y Wheeler al que se añade también 2,5% de agar y
0,4% de carbonato activado. Los matraces de producción son sembra-
dos con B. pertussis hecha crecer de la manera anterior e incubada
a 35-37°C durante 48 a 72 horas. El producto desarrollado de cada
matraz es examinado macroscópicamente y microscópicamente (mancha
de Gram) en cuanto a su pureza y morfología. Los matraces satis-
factorios contienen bacilos coccoides puros u organismos de fase I.
El producto desarrollado es raspado de los matraces satisfactorios
y es transferido a botellas estériles, que contienen cada una 400
ml de solución salina fisiológica. Cada cultivo cosechado de esta
manera es nuevamente investigado en cuanto a su pureza y las sus-
pensiones de organismos son agrupadas. El número de células es de-
terminado por medición de la densidad óptica. Los organismos son
recogidos por centrifugación entre 5 y 10°C y la fase líquida es de-
sechada. La masa celular húmeda o pasta celular recogida por cen-

27 OCT.



trifugación contiene aproximadamente 1×10^{15} organismos por gramo, tal como se indica por la medición de densidad óptica que muestra el número total de organismos presentes en la suspensión cosechada y agrupada.

5 Ejemplo 2.- Células de *B. pertussis* son cosechadas raspando desde matraces de Roux. Las células recientemente cosechadas son suspendidas en 1000 ml de agua destilada para dar una concentración de $3,6 \times 10^{11}$ organismos por ml. La suspensión celular es centrifugada a 8000 veces la gravedad durante 30 minutos entre
10 5 y 10°C. La solución flotante transparente es decantada desde la masa celular húmeda y es tratada ulteriormente tal como se describe seguidamente. La masa celular húmeda es sometida al procedimiento de extracción con bromuro de litio que se describe en el Ejemplo 1. La solución flotante transparente obtenida por centrifugación
15 y decantación, tal como se describe anteriormente, asciende a - aproximadamente 900 ml. El pH es ajustado a 4,6 con ácido acético 2,0 normal y el producto antigénico sólido precipitado es recogido por centrifugación a 8000 veces la gravedad durante 30 minutos a 5°C. El producto antigénico sólido es homogeneizado con 200 ml de
20 tris(hidroximetil)aminometano 0,02 molar ajustado a pH 7,2 con ácido clorhídrico diluido. Se añade timerosal hasta una concentración final de 1:10.000. Por ensayo en vivo normalizado, se encuentra que esta solución contiene 50 unidades protectoras de ratón por ml. La solución es añadida al producto antigénico obtenido del extracto
25 de bromuro de litio por precipitación a pH 4,6 y por homogeneización con tris(hidroximetil)aminometano 0,02 molar, para dar un producto antigénico agrupado.

30 En el precedente procedimiento es también satisfactorio utilizar una solución diluida de cloruro de sodio tal como solución salina fisiológica en lugar de agua destilada, para preparar la sus-



pensión original de células de B. perissis recientemente cosechadas.
Es también satisfactorio añadir la solución flotante transparente
que resulta de suspender las células en agua o en solución salina
fisiológica directamente al extracto de bromuro de litio sin efec-
5 tuar primeramente la precipitación del producto antigénico sólido.
Alternativamente, se pueden preparar productos antigénicos sólidos
separadamente desde el lavado de células inicial con agua o con so-
lución salina fisiológica y desde el extracto de bromuro de litio,
por precipitación a pH 4,6, y los dos productos antigenicos sólidos
10 pueden ser agrupados y reconstituidos con tris(hidroximetil)amino-
metano 0,02 molar.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en
Estados Unidos de América, el 22 de septiembre de 1.965 bajo el núm.
489.396 y 2 de septiembre de 1.966 bajo el núm. 576.842, se acoge
15 a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propie-
dad Industrial.

27 OCT



N O T A

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

5 1.- Un procedimiento para preparar antígeno protector de Bordetella pertussis por extracción de dicho antígeno desde células de Bordetella pertussis con una solución acuosa, caracterizado por la mejora que comprende extraer dichas células: (a) con una solución extractora de bromuro de litio, teniendo dicha solución extractora una concentración en bromuro de litio entre aproximadamente 0,75 molar y aproximadamente 2,25 molar, (b) a un pH superior a 6,0 e inferior a 8,5, y (c) a una temperatura por debajo de
10 aproximadamente 25°C, hasta que se haya extraído dentro de dicha solución extractora una cantidad sustancial de dicho antígeno; y separar la solución extractora que contiene antígeno de dichas células
15 y de los residuos celulares de las mismas.

2.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en que la solución extractora tiene una concentración en bromuro de litio aproximadamente 1,0 molar y la extracción se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 8,0.

20 3.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en que la cantidad de solución extractora es de 15 a 40 ml por gramo de masa celular húmeda.

4.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en que la solución extractora que contiene antígeno es combinada con
25 el antígeno obtenido de un lavado inicial de las células con un medio acuoso.

27 OCT 1954



5 5.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en que: (a) la solución extractora que contiene antígeno es dializada después hasta que la concentración en bromuro de litio es reducida a menos de 0,1 molar, (b) el antígeno es precipitado por acidificación hasta aproximadamente un pH 4,6 a 4,8, y (c) el antígeno precipitado es recogido y reconstituido en un medio acuoso apropiado para inyección parenteral.

10 6.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en que el antígeno precipitado es combinado con el antígeno obtenido de un lavado inicial de las células con un medio acuoso.

7.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en que la solución extractora contiene como sustancias disueltas adicionales un agente tamponador, un agente formador de quelatos, y un antioxidante.

15 8.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 en que el agente tamponador es tris(hidroximetil)aminometano.

9.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 en que el agente formador de quelatos es ácido etilendiaminotetraacético o una sal del mismo.

20 10.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 en que el antioxidante es beta-mercaptoetanol.

11.- Un procedimiento para preparar antígeno protector de Bordetella pertussis.

25 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.



Esta Memoria consta de quince hojas escritas a máquina
por una sola cara.

Madrid,

27 JUL 1968

P.A.

Alberto de Elizaburu
Por Orden

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'Alberto de Elizaburu', is written over the typed name.

MGM/-