

412598



Int. Cl.²: C12K/A61K

Nº 412.598

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: LABORATOIRE ROGER BELLON.

RESIDENCIA: 159, avenue de ROULE.-92200 NEUILLY

SUR SEINE.-FRANCIA.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE

UNA VACUNA ANTIBRUCELICA.

Prioridad: Patente francesa n.º 72 09684 del 20.3.72

412598



1

Esta invención se refiere a un procedimiento de cultivo de microorganismos que permiten modificar el fenotipo de estos y utilizarlos para la preparación de vacunas destinadas a combatir las enfermedades debidas a estos microorganismos.

5

La utilización como antígenos de gérmenes completos, para la preparación de vacunas, puede suponer en el suero de los animales la presencia de aglutininas o de otras reacciones serológicas que interfieren con el diagnóstico de la enfermedad correspondiente.

10

Este es especialmente el caso de la vacuna antibrucélica, ya que la utilización de Brucellas no modificados como antígenos provoca la formación de aglutininas que impiden el diagnóstico de la brucelosis.

15

Para evitar este inconveniente, ya se ha propuesto utilizar brucelas en forma rugosa que se caracterizan por su carácter de aglutinabilidad espontánea en suero fisiológico y en presencia de acriflavina y su dificultad de reversión hacia la forma S patógena, aglutinógeno y aglutinable por los sueros anti correspondientes (es decir, los sueros que contienen los anticuerpos correspondientes a los antígenos Brucella).

20

25

Igualmente se ha propuesto utilizar Brucellas S completas o extractos de Brucella bajo forma S adicionándoles suero inmune correspondiente en cantidad necesaria y suficiente para saturar la totalidad de los centros aglutinógenos del antígeno. Se obtiene así una vacuna no aglutinógena llamada vacuna de Pilet y Bonneau (Recueil de Médecine Vétérinaire Ecole Alfort 1970, 146, 25-35). Sin embargo, este procedimiento requiere la utilización de una canti-

30

412598



1 dad importante de suero anti de alto título, para garanti-
zar la neutralización de todos los centros aglutinógenos.

5 La invención tiene por objeto un procedimiento de
cultivo de microorganismos que permiten modificarlos durante
su multiplicación con el fin de hacerles perder algunas de
sus características y llegar así a un fenotipo diferente
sin modificar el genotipo.

10 En particular, la aptitud fundamental de estos orga-
nismos a provocar reacciones serológicas parásitas, que acon-
pañan a las respuestas de inmunización, puede ser limitada
o suprimida.

15 El procedimiento de la invención permite obtener en
particular, a partir de Brucellas altamente virulentas y
aglutinógenos o a partir de Brucellas no virulentas y aglu-
tinógenos, fenotipos diferentes que se caracterizan por la
pérdida de las aglutinabilidades específicas en presencia
de suero anti, la aparición de una aglutinabilidad espontá-
nea débil y una reconversión en la forma S patógena o no,
con recuperación de los caracteres de aglutinabilidad por
20 subcultivos en medio ordinario. Estos últimos caracteres
diferencian las Brucellas modificadas según la invención
de las Brucellas rugosas, tipo 45/20.

25 El procedimiento de la invención, que permite obte-
ner Brucellas así modificadas, consiste en efectuar un nú-
mero elevado de subcultivos de estos microorganismos y en
presencia de suero anti-Brucella. Este se adiciona al medio
de los cultivos en cantidad tal que no impida la multipli-
cación de las Brucellas pero que, sin embargo, provoque una
modificación fenotípica. La cantidad de suero adicional al
30 medio de cultivo puede variar así de 0,5 % a 20 % de un

412598 -1



1 suero anti con un título de 2000 U/ml.

5 Con objeto de que se pueda comprender mejor la invención, describimos a continuación, a título de ejemplo, el procedimiento de cultivo de la invención aplicado a las Brucellas.

Una Brucella, por ejemplo la Brucella Melitensis de primer aislamiento, altamente patógena, se cultiva en un medio de triptosa-gelosa conteniendo 10 % de suero anti, con un título de 2000 U/ml. El cultivo se desarrolla normalmente.

10 Pueden utilizarse indiferentemente Brucellas de cualquier origen de forma S, patógenas o no patógenas y se pueden utilizar todos los medios que permitan un buen cultivo de Brucellas.

15 Se realizan de 10 a 30 subcultivos sucesivos sobre medio sólido conteniendo suero anti para estabilizar la cepa.

Esta cepa es a continuación liofilizada y constituye la reserva de inoculum para la producción de cultivos que deben servir para la obtención de las vacunas.

20 Sobre estas reservas se procede al control de la pureza y al control de la caracterización de la cepa: 2 subcultivos en medio gelosa-triptosa permiten recuperar una Brucella bajo fase S con las características serológicas y bioquímicas de la Brucella de partida.

25 A partir de la reserva "inoculum", se procede a 2-10 subcultivos en medio nutritivo, generalmente líquido, conteniendo suero anti específico con el fin de permitir la multiplicación de los gérmenes necesarios para la obtención de los lotes industriales de vacunas. La cantidad de suero anti utilizada puede variar, para un suero anti, con un tí-
30

412598



1 tulo de 2000 U/ml de 0,5 % a 20 %, sin que estas cantida-
des ejerzan influencia sobre el contenido final en gérmenes
y sobre las características fundamentales de los gérmenes
obtenidos.

5 La invención tiene igualmente por objeto la prepara-
ción de una vacuna antibrucélica, a partir de los microorga-
nismos modificados por el procedimiento descrito. Después
de la multiplicación por cultivos sucesivos en medio conte-
niendo suero anti, las Brucellas modificadas son inactiva-
10 das por formol, recogidas y separadas del medio de cultivo.
A continuación son eventualmente tratadas con laurilsulfato
sódico para eliminar las aglutininas persistentes. La canti-
dad de laurilsulfato a agregar puede variar de 1 ‰ a 1 %
y se elimina después por diálisis. Las Brucellas son final-
15 mente puestas de nuevo en suspensión en suero fisiológico,
ajustándose la concentración por densidad óptica a 10^9 gér-
menes/ml. La vacuna de la invención no contiene coadyuvante
de inmunidad.

20 Puede ser caracterizada y diferenciada de las vacu-
nas antibrucélicas existentes por los criterios siguientes:

1) Características físico-químicas:

pH: 5,2-5,5

densidad óptica: tubo 5 en la escala de Browne

análisis de los componentes químicos:

25 después de centrifugación, la fase líquida debe contener:

formaldehído libre: 0,70-0,80 ‰

cloruro sódico: 8 a 9 ‰.

30 Estas características corresponden a las de las va-
cunas microbianas inactivadas que no contienen coadyuvante
de la inmunidad.

412598



1 2) Características bacteriológicas:

Los cuerpos bacterianos inactivados se recuperan por centrifugación y se someten a los controles de caracterización siguientes:

5 a) Resistencia a la lisis por el laurilsulfato sódico:

Los cuerpos bacterianos recuperados por centrifugación se ponen de nuevo en suspensión en suero fisiológico que contiene 1 % de laurilsulfato sódico. La concentración de gérmenes se ajusta por densidad óptica a una equivalencia de 50×10^9 gérmenes por mililitro.

10

Esta suspensión se lleva durante 4 horas a 50°C , bajo agitación permanente. Después de este tiempo se mide la densidad óptica.

15

La vacuna preparada según este procedimiento se compara con suspensiones de Brucella inactivada obtenidas a partir de diversas cepas de Brucella: Brucella original, Brucella cepa B 19 y 45/20:

Porcentaje de lisis después de 4 horas a 50°C

20

Brucella original	15 a 20 %
Brucella modificada	25 a 30 %
B. 19	75 a 80 %
45/20	60 a 65 %

25

b) Investigación de los anticuerpos antibrucella de origen bovino o equino por inmunofluorescencia.

Un residuo bacteriano de vacuna preparada según la invención y según el procedimiento denominado Pilet-Bonneau se adiciona de suero fluorescente anti-globulinas bovinas o equinas y se examina, después de dilución adecuada, en microscopio de luz ultravioleta.

30

Se comprueba que los cuerpos bacterianos de la vacuna

- 7 -
412598



1 preparada según el procedimiento Pilet-Bonneau son intensamente fluorescentes mientras que las Brucellas modificadas según el procedimiento de la invención no fijan las globulinas fluorescentes, de manera que menos del 10 % de los cuerpos bacterianos son fluorescentes.

3) Estudios serológicos:

In vitro:

a) Aglutinabilidad espontánea o provocada en tubos:

El residuo bacteriano se recupera por centrifugación, se pone de nuevo en suspensión, a una concentración de 10×10^9 por mililitro, en suero fisiológico, que por una parte contiene suero anti-brucella (10 U.I./ml) y por otra parte no lo contienen. Estas suspensiones se reparten en tubos a razón de 1 ml por tubo.

Como referencia, se puede tomar una suspensión de Brucella original inactivada.

La tabla dada a continuación da los resultados de tres ensayos comparativos.

	Porcentaje de aglutinación	
	En presencia de 10 U.I. de suero anti	En agua fisiológica
Brucella original	100 %	0 %
Brucella modificada		
Lote 1	50 %	37 %
Lote 2	25 %	50 %
Lote 3	37 %	62 %

Estos resultados indican que, después de la modificación, las Brucellas han perdido su carácter de aglutinabilidad específica ya que no hay diferencia significativa entre la aglutinación no específica en suero fisiológico y la

412598



1 aglutinación específica en suero anti.

b) Aglutinabilidad provocada sobre lámina.

5 Además, se puede comparar el aspecto de aglutinación sobre lámina para las Brucellas antes y después de la modificación.

Un asa de Brucella procedente de un residuo de centrifugación se emulsiona en suero fisiológico o en suero anti diluído.

10 La Brucella original, emulsionada en suero fisiológico, presenta un aspecto turbio uniforme; emulsionada en suero anti diluído, presenta floculados de aglutinación característica.

15 La Brucella modificada, emulsionada en agua fisiológica, presenta un aspecto turbio uniforme; emulsionada en presencia de suero anti, presenta igualmente un aspecto turbio uniforme.

c) Saturación de los centros aglutinantes:

20 El procedimiento Pilet-Bonneau, de preparación de vacunas no aglutinógenas, permite determinar la cantidad de suero anti suficiente y justamente necesaria para saturar los centros aglutinógenos de una Brucella.

25 Este procedimiento puede ser aplicado a las Brucellas antes y después de la modificación. Se comprueba entonces que son necesarias cantidades muy pequeñas de suero anti para saturar los centros aglutinógenos que quedan sobre las Brucellas modificadas:

- Para la Brucella original, son necesarias de 500 a 700 U.I. para saturar los centros aglutinógenos de 7×10^9 Brucellas.

30 - Para la Brucella modificada, son necesarias de 1 a 15 U.I.

412598

-1



1 para saturar 7×10^9 Brucellas modificadas.

Un suero con un título de 2000U se diluye de 1/2 en 1/2 y se mezcla con suspensiones de Brucella original y modificada; después de la reacción, se separa el residuo microbiano y se procede de nuevo a la valoración del poder aglutinante.

La tabla dada a continuación contiene el título del suero antes y después de la adsorción sobre Brucella original y sobre Brucella modificada.

Dilución de suero de suero diluido.	Título del suero diluido.	Título después de la adsorción por					
		Brucella original			Brucella modificada		
		Título residual	Título fijado	% fijado	Título residual	Título fijado	% fijado
1/2	1000	1000	0	*	1000	0	0 %
1/4	500	250	250	50 %	500	0	0 %
1/8	250	125	125	50 %	250	0	0 %
1/16	125	31	93	75 %	125	0	0 %
1/32	60	8	54	87 %	60	0	0 %
1/64	30	4	27	87 %	16	16	50 %
1/128	16	2	14	87 %	16	8	50 %
1/256	8		8	100 %	8	4	50 %
1/512	4		4	100 %	4	2	50 %
1/1024	2		2	100 %			

* Como las valoraciones se realizan por diluciones en tubo, una diferencia de un tubo corresponde a la pérdida de la mitad del título inicial.

Asimismo, en el caso anterior (título del suero diluido: 1000 U), se puede decir simplemente que la Brucella original ha fijado menos de 500 U (entre 0 y 500 U.I.).

El razonamiento es idéntico para los valores negativos (0 %) encontrados para las Brucellas modificadas.

412598



1 Por lo tanto, se puede deducir de estos diversos en-
sayos que las Brucellas modificadas según el procedimiento
de la invención han perdido la mayor parte de sus centros
aglutinógenos y, por consiguiente, estas Brucellas no deben
5 provocar la formación de anticuerpos aglutinantes como con-
secuencia de su inyección en el organismo.

 En conclusión, la vacuna preparada a partir de las
Brucellas modificadas según el procedimiento de la inven-
ción se diferencia de las vacunas conocidas por las caracte-
10 rísticas siguientes:

- El estado inactivado las diferencia de la vacuna del tipo B.19.
- La ausencia de coadyuvante las diferencia de las vacunas inactivadas clásicas de los tipos 45/20 o H. 38 (vacuna de Renoux).
- 15 - La sensibilidad a la lisis por el laurilsulfato sódico permite comprobar el carácter modificado de las Brucellas con respecto a las otras Brucellas.
- La ausencia de anticuerpos anti-Brucellas observables por las globulinas fluorescentes permite diferenciar la vacu-
20 na de la preparada por el procedimiento de Pilet-Bonneau.

- In vivo:

En conejos:

 La vacuna preparada por el procedimiento de la inven-
25 ción, con o sin tratamiento ulterior con laurilsulfato, se
compara con una vacuna con la Brucella original.

 Los anticuerpos aglutinantes son investigados en el
suero de los conejos tres semanas después de la vacunación.

 Se obtienen los resultados siguientes:

412598



1	50 x 10 ⁹ Brucellas originales	30.000 U.I.
	Vacuna modificada (50 x 10 ⁹ gérmenes)	3,750 U.I.
	Vacuna modificada y tratada con lau- rilsulfato (50 x 10 ⁹ gérmenes)	10 U.I.

5 En bovinos:

Unos lotes de 5 bovinos reciben una dosis de vacuna preparada por el procedimiento de la invención y tratada o no con laurilsulfato. Los anticuerpos aglutinantes son investigados en el suero 3 semanas después de la vacunación.

10 Se obtienen los resultados siguientes:

Vacuna no tratada por laurilsulfato	60 U.I.
Vacuna tratada por laurilsulfato	6 U.I.

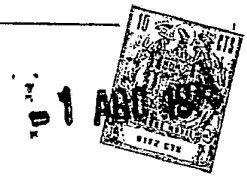
15 Se ha realizado una experiencia sobre un lote de 32 bovinos inoculados tres veces consecutivas con la vacuna no tratada con laurilsulfato.

20 El gráfico anexo da la evolución media de los anticuerpos aglutinantes y de los anticuerpos incompletos descubiertos por el ensayo de Coombs, en animales que han sufrido una primera vacunación V₁ en el tiempo T₀, una segunda vacunación V₂ dos meses después y una tercera V₃ doce meses después.

25 Esta vacuna preparada a partir de Brucellas modificadas según la invención y no tratada con laurilsulfato sódico se caracteriza, por lo tanto:

- por una parte, por su escasa reactividad en anticuerpos aglutinantes, produciéndose siempre la desaparición de las aglutininas en el periodo prescrito de 3 meses;
- por otra parte, por una reactividad marcada en anticuerpos incompletos (reacción de Coombs), sobre todo des-

412598



1

pués de la segunda operación.

5

Estas características son específicas de la vacuna modificada según la invención. La diferencia de forma indiscutible de las vacunas aglutinógenas (vacunas tipo B. 19, vacunas tipo H. 38).

4) Características antigénicas

a) Control de la actividad antigénica sobre ratones de la vacuna preparada según la invención:

10

Unos lotes de 10 ratones son vacunados por vía intraperitoneal y subcutánea con dosis variables de vacuna anti-brucélica inyectada bajo un volumen de 0,3 ml; es decir, 0,3 ml de una dosis que contiene $10 \cdot 10^9$ U.I./ml, después $1/3$, $1/9$ y $1/27$ de esta dosis.

15

La antigenicidad se compara con la de una suspensión de las mismas dosis de Brucella original, no modificadas (vacuna de referencia).

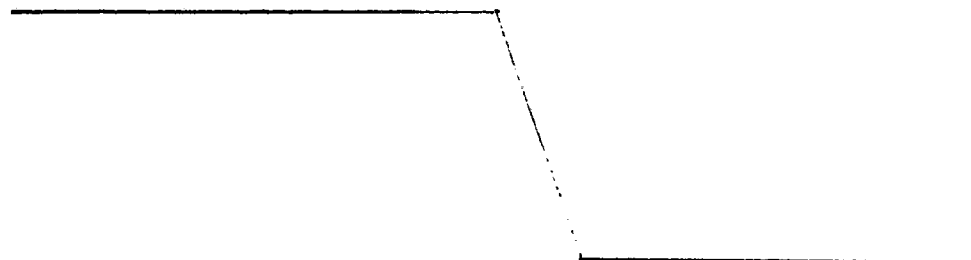
20

La prueba se realiza 15 días después de la vacunación por inoculación intraperitoneal de 50.000 gérmenes de la cepa 544. Los ratones son sacrificados 8 días después y se procede a una evaluación cualitativa de la infección que va de 0 a ++++ y una evaluación cuantitativa por numeración sobre un molido del conjunto de las ratas de un mismo lote.

25

Los resultados se dan en la siguiente tabla:

30



412598

-13-

412598



Núm. de ratones	0,3 ml de vacuna de referen- cia	1 dosis de vacuna se- gún la in- vención	0,3 ml de vacuna de referen- cia	1/3 dosis de vacuna según la inven- ción	0,3 ml de vacuna de referen- cia	1/9 dosis de vacuna según la inven- ción	0,3 ml de vacuna de referen- cia	1/27 dosis de vacuna según la inven- ción	Testigo de la infec- ción
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	+
3	0	0	0	0	0	0	0	0	+
4	0	0	0	0	0	0	+	0	++
5	0	0	0	0	0	0	+	0	++
6	0	0	0	0	0	0	+	0	++
7	0	0	0	0	0	0	+	+	++
8	0	0	0	0	0	0	+	++	++
9	0	0	+	0	0	0	++	+++	+++
10	0	0	++	0	0	+	++	+++	+++
Número me- dio de Bru- cellas por g de rata	0	90	no ceter- minado	no ceter- minado	0	120	400	1600	70.000

1

5

10

15

20

25

30

412598

	Núm. de ratones	0,3 ml de vacuna de referencia	1 dosis de vacuna según la invención	0,3 ml de vacuna de referencia	1/3 dosis de vacuna según la invención	0,3 ml de vacuna de referencia	1/9 vacu la
1	1	0	0	0	0	0	
5	2	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	
10	7	0	0	0	0	0	
	8	0	0	0	0	0	
	9	0	0	+	0	0	
	10	0	0	++	0	0	
15	Número medio de Bru cellas por g de rata	0	90	no determinado	no determinado	0	

20

25

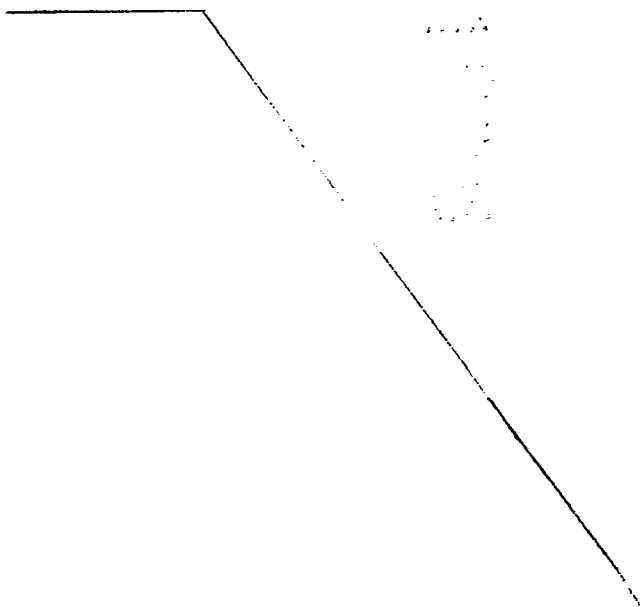
30

2598

412508



0,3 ml de vacuna de referencia	1/3 dosis de vacuna según la invención	0,3 ml de vacuna de referencia	1/9 dosis de vacuna según la invención	0,3 ml de vacuna de referencia	1/27 dosis de vacuna según la invención	Testigo de la infección
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	+
0	0	0	0	0	0	+
0	0	0	0	+	0	++
0	0	0	0	+	0	++
0	0	0	0	+	0	++
0	0	0	0	+	+	++
0	0	0	0	+	++	++
+	0	0	0	++	+++	+++
++	0	0	+	++	+++	+++
no determinado	no determinado	0	120	400	1600	70.000

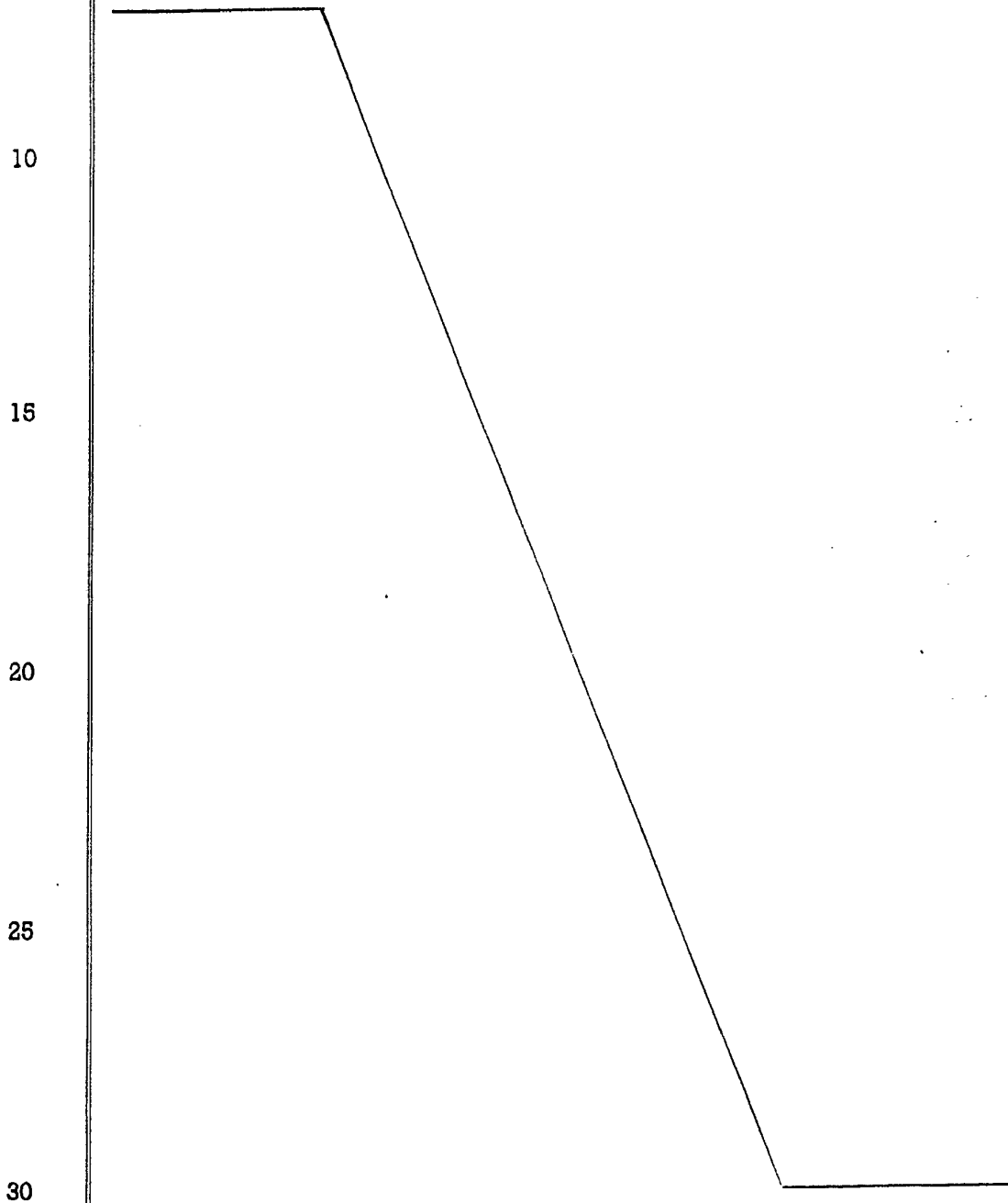


412598



1 b) Comparación de la antigenicidad de las Brucellas
modificadas o no y tratadas o no con laurilsulfato sódico.

5 Los ratones son vacunados siguiendo el mismo protoco-
lo que en la experiencia anterior y los resultados de la
evaluación cualitativa de la invención están expresados en
la tabla siguiente.



412598

412598

- 15 -

Influencia del tratamiento con laurilsulfato sobre la antigenicidad de las Brucellas

Dilución de las vacunas	Brucellas normales				Brucellas modificadas								
	Residuo después del tratamiento con laurilsulfato		Cultivo total antes del tratamiento		Residuo después del tratamiento con laurilsulfato		Cultivo total antes del tratamiento						
	Puro	1/3	1/9	1/27	Puro	1/3	1/9	1/27					
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	++	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	+	++
Poder aglutinante (conejo)					4000					10			3750
					30.000								

1

5

10

15

20

25

30

412598

1

Influencia del tratamiento con laurilsulfato sobre

Brucellas normales

5

Dilución de las vacunas	Residuo después del tratamiento con laurilsulfato				Cultivo total antes del tratamiento				Residuo tratamiento	
	Puro	1/3	1/9	1/27	Puro	1/3	1/9	1/27	Puro	1/
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	++	0	+	0	0	0	0	0	0
5	0			+	0	0		+	0	+

10

Poder aglutinante (conejo)

4000

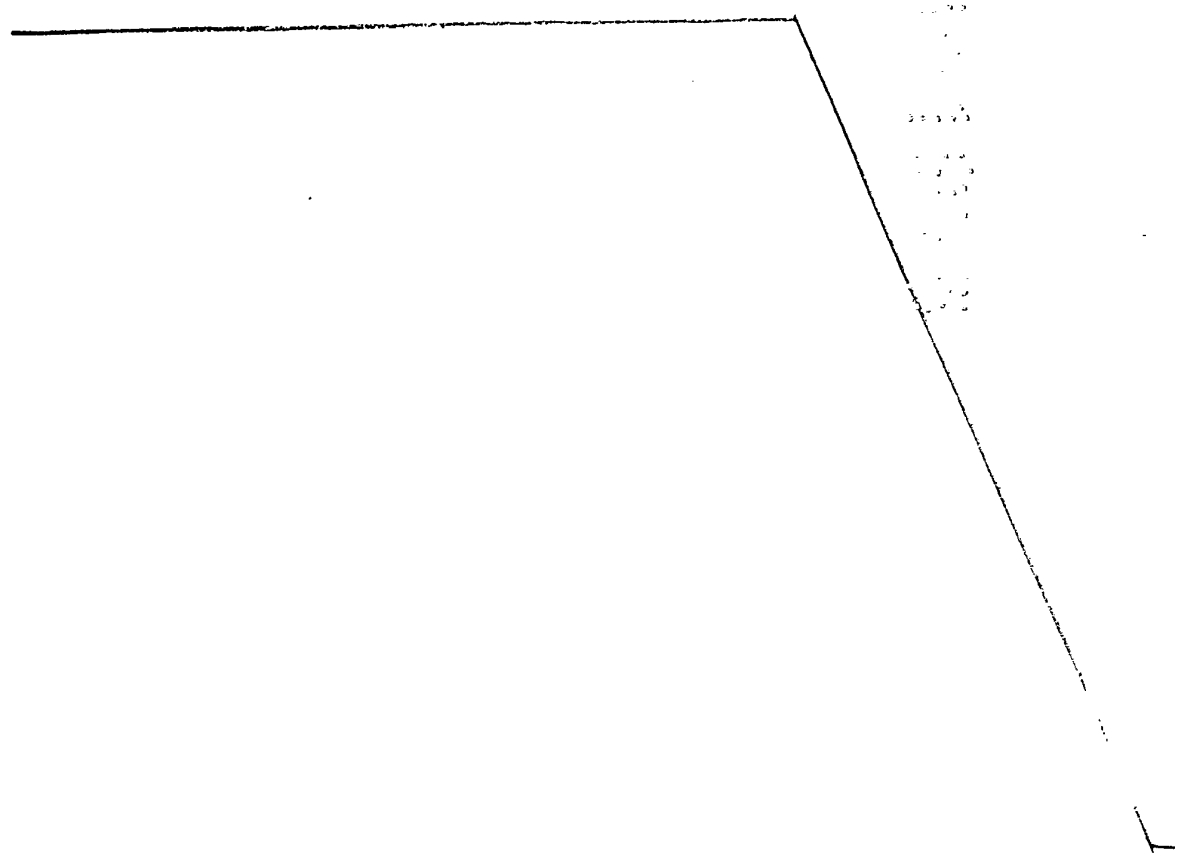
30.000

15

20

25

30

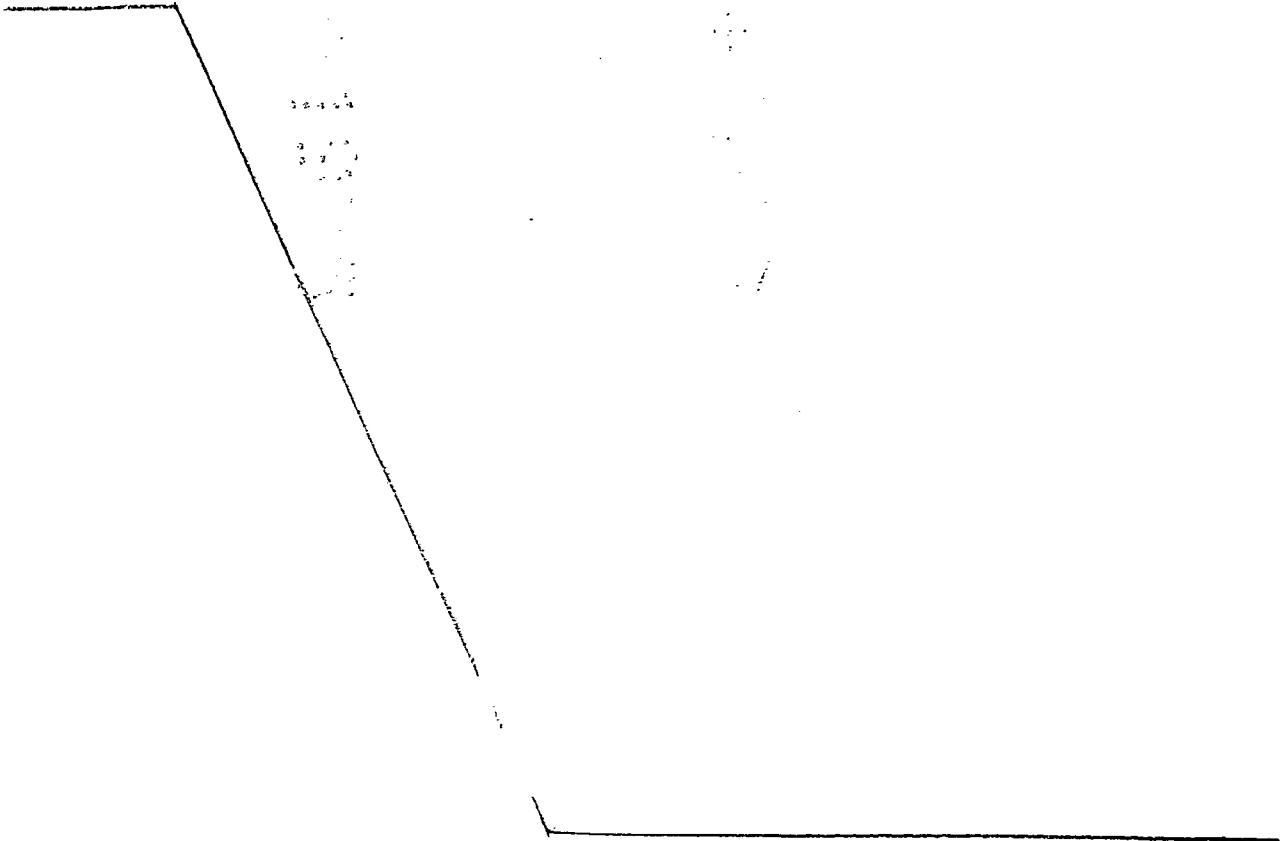


412598



Experimento con laurilsulfato sobre la antigenicidad de las Brucellas

normales				Brucellas modificadas							
Cultivo total antes del tratamiento				Residuo después del tratamiento con laurilsulfato				Cultivo total antes del tratamiento			
Puro	1/3	1/9	1/27	Puro	1/3	1/9	1/27	Puro	1/3	1/9	1/27
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
	0	0	+	0	+	+	+	0	0	0	++
30.000				10				3750			



412598



1 Por consiguiente, el procedimiento descrito en la invención (cultivo en presencia de suero anti, inhibidor de los antígenos aglutinantes y tratamiento con laurilsulfato) no modifica las propiedades antigénicas de las Brucellas.

5 En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

10 1. Un procedimiento de preparación de una vacuna antibrucélica, caracterizado porque en una primera etapa se desarrollan las bacterias Brucella en un medio adicionado con suero anti-Brucella, realizándose varios subcultivos sucesivos, en una segunda etapa se recogen los Brucella así cultivados y que han experimentado una modificación del genotipo, y se las inactivan mediante un procedimiento conocido en sí y principalmente mediante la acción del formol.

15 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en la primera etapa se realizan de 10 a 30 subcultivos de bacterias Brucella.

20 3. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en la primera etapa se adiciona un medio de cultivo de 0,5 a 20% de suero anti: Brucella con un título de 2000 U/ml.

25 4. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en la segunda etapa se trata la suspensión de Brucella modificada, inactivada con 1 0/00 a 1% de laurilsulfato de sodio para eliminar las aglutininas restantes.

30 5. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UNA VACUNA ANTIBRUCELICA.

A handwritten signature in the bottom left corner, consisting of several stylized, overlapping loops.

412598

-1



1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de diecisiete páginas mecanografiadas, y dibujos que se acompañan.

5

Madrid, 13 marzo 1.973

BERNARDO UNGRIA

P.P.

10

15

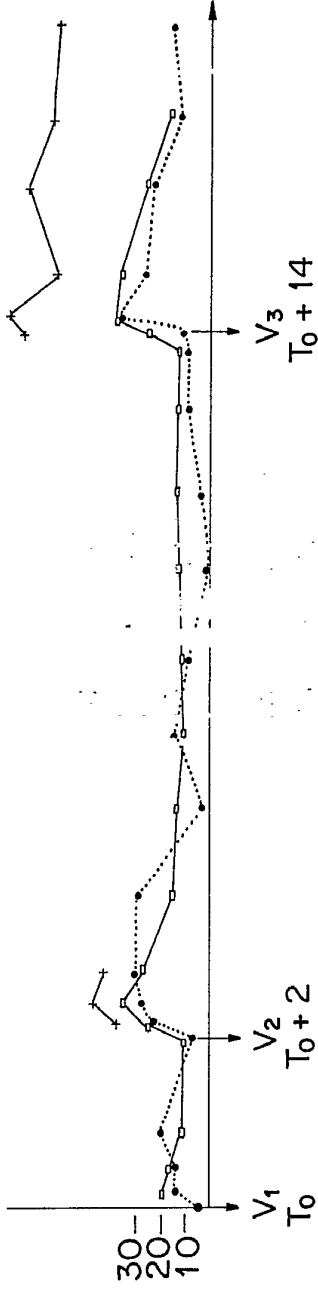
20

25

30

412598

412598

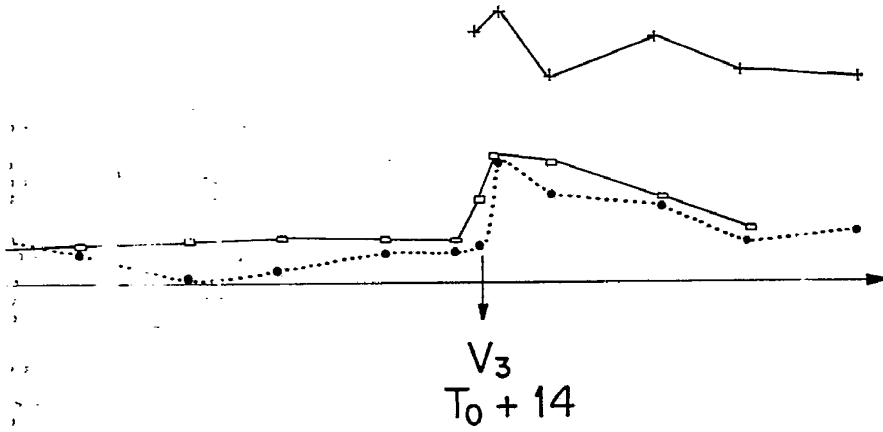
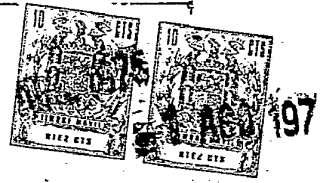


ESCALA VARIABLE

Madrid, 13 de Marzo de 1973

BERNARDO UNGRIA
P.P.

412598



ESCALA VARIABLE

Madrid, 13 de Marzo de 1973

BERNARDO UNGRIA

p. p.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Bernardo Ungria', is written over the typed name.