



23 NOV 1975

P. - 59.844

HOE 74/B 007

Int. Cl. C12K 1/02

MEMORIA DESCRIPTIVA

36866

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en Marburg/Lahn, República Federal Alemana.

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ANTIGENOS".

(Clase Internacional C12K)

11-3-75

- 1 -

**POOR
QUALITY**

23



La invención se refiere a un procedimiento para la obtención de antígenos a partir de esquistosomas adultos vivos, a agentes de diagnóstico para infecciones de bilharziosis que contienen los antígenos o anticuerpos correspondientes preparados según la invención, y a su utilización para la detección e identificación de la bilharziosis "in vivo" e "in vitro".

La bilharziosis es una enfermedad que es provocada por parásitos del género esquistosoma. Se calcula que aproximadamente 200 millones de personas, en especial en Asia, Africa, Sudamérica y Centroamérica están infectadas por especies de esquistomas patógenos para el hombre, en especial por *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. japonicum*.

Desde hace unos 50 años son utilizados métodos serológicos para la diagnosis de la bilharziosis, que tienen ventajas considerables frente a procedimientos parasitológicos, debido a la sencillez de la realización. La especificidad de estos procedimientos de ensayo es dependiente, en el sentido más amplio, de la calidad del material antígeno utilizado para ellos.

Es conocido que los pacientes de bilharziosis, en una etapa precoz de la enfermedad, presentan una sensibilidad específica de la piel, que ha de ser atribuida a anticuerpos presentes frente a los agentes patógenos y que puede ser provocada con correspondientes antígenos.



23 ABR 1973

Una inyección intradérmica de un extracto de esquistosomas conduce a un enrojecimiento y a una induración (formación de habones) que aparece al cabo de pocos minutos en la zona inyectada de la piel.

5 In vitro, los anticuerpos pueden ser detectados con procedimientos de ensayo conocidos, si son utilizados antígenos apropiados.

10 Como material de partida para la obtención de los antígenos son utilizados, entre otras determinadas etapas de desarrollo del ciclo vital de agentes patógenos de la bilharziosis, de preferencia esquistosomas adultos, que son llevados a desarrollo en un animal huésped, lo más frecuentemente en roedores. La obtención de los organismos se realiza por medio de una técnica de perfusión descrita por Pellegrino y Siqueira (1956). Los esquistosomas a obtener a partir de la solución de perfusión son lavados con una solución isotónica de cloruro de sodio (sal común) y a continuación, o bien son utilizados inmediatamente para la preparación de antígenos, o bien son
15 secados y conservados en ampollas hasta que se les necesite.
20

25 Los antígenos utilizables para el diagnóstico son preparados o bien por extracción de las lombrices secadas, con solución isotónica de cloruro de sodio (extracto de cloruro de sodio) o por extracción con ayuda de la



23 APR 1975

solución según Coca (extracto de Coca), o según la propuesta de Melcher, por deslipidación de los esquistosomas con éter de petróleo y extracción subsiguiente con un tampón de borato y una purificación por precipitación con ácido, después de lo cual se obtiene la fracción soluble en ácido como el llamado antígeno de Melcher. Se han llevado a cabo varias experiencias para purificar aún más los antígenos obtenidos en lo esencial según este procedimiento. En tales casos se obtuvieron también fracciones reactivas en el ensayo de la piel. Sin embargo, pudo ser demostrado además que la porción activa del antígeno del ensayo de la piel no ha de ser limitada a las fracciones puras. En lugar de ello se pudo determinar que la reactividad del antígeno ha de ser puesta en correlación con su contenido de nitrógeno. En tal caso se pone de manifiesto siempre la necesidad de excluir reacciones no específicas que pueden ser provocadas por la inclusión de componentes específicos para el huésped en el organismo de los esquistosomas.

Se ha encontrado ahora que los esquistosomas obtenidos por perfusión a partir de sangre de roedor, pueden ser liberados de una gran porción de material específico para el huésped si los esquistosomas son mantenidos durante varias horas en medios salinos adecuados, libres de proteínas, y que estos esquistosomas previamente puri-



23 ABR. 1975

ficados proporcionan antígenos somáticos de elevada especificidad.

5 Por consiguiente, objeto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de antígenos a partir de esquistosomas adultos vivos, caracterizado porque esquistosomas obtenidos de animales infectados se mantienen vivos a 10-40°C, durante 12-96 horas en 10-100 veces su volumen de una solución acuosa de sal, estéril, fisiológicamente tolerable, libre de proteínas y de nitrógeno, y a continuación son aislados y extraídos con un medio acuoso.

10 Como soluciones de sal, en las que los esquistosomas son mantenidos vivos durante algún tiempo después de su obtención, son adecuadas todas las soluciones acuosas de sales fisiológicamente tolerables, cuya osmolaridad sea de aproximadamente 200 - 450 miliosmoles/litros. Junto a solución fisiológica de cloruro de sodio pertenecen a ellas las soluciones nutricias conocidas, por ejemplo las de Locke, Tyrode o Ringer. Adiciones de aproximadamente 15 0,5 % de glucosa y/o de aproximadamente 1 % de asparagina, de las que es sabido que hacen posible mantener con vida durante 2-12 días a los esquistosomas en soluciones nutricias, son también ventajosas en el caso del procedimiento según la invención.

25 En una forma de realización especialmente venta-



josa, los esquistosomas obtenidos por perfusión son mantenidos en aproximadamente 50 veces su volumen de una solución acuosa que contiene NaCl, KCl, $MgSO_4$, glucosa, $NaHCO_3$, Na_2HPO_4 y $CaCl_2$ con una concentración total de 200 - 450 miliosmoles/litro, a 35-40°, con la condición de que al menos la mitad de la osmolaridad de la solución sea debida al contenido de cloruro de sodio y de que los demás componentes contribuyan al contenido de sustancia disociada en la solución en cada caso con 2-50 miliosmoles/litro. En este caso debe darse por sabido que para la preparación de una solución ópticamente transparente, las sales mencionadas no pueden ser añadidas al disolvente agua en cualquier proporción de mezcla. Por ejemplo, la solución acuosa puede tener la composición siguiente:

- 15 0,120 moles/litro correspondientes a 240 miliosmoles/litro de NaCl.
- 0,004 moles/litro correspondientes a 8 miliosmoles/litro de KCl.
- 0,0007 moles/litro correspondientes a 2 miliosmoles/litro de $MgSO_4$.
- 20 0,0055 moles/litro correspondientes a 5 miliosmoles/litro de glucosa
- 0,018 moles/litro correspondientes a 36 miliosmoles/litro de $NaHCO_3$
- 25 0,0035 moles/litro correspondientes a 10 milios-

23



moles/litro de Na_2HPO_4

0,001 moles/litro correspondientes a 3 milio-
moles/litro de CaCl_2 .

5 Ha manifestado ser conveniente cambiar varias
veces la solución a intervalos de algunas horas, por ejem-
plo en el caso de un mantenimiento de las lombrices du-
rante 24 horas, llevar a cabo el cambio de la solución
cada 8 horas.

10 Hasta ahora no era conocido que los esquisto-
somas, durante el tiempo de incubación en los medios co-
rrespondientes, pudieran dejar libres las sustancias nutri-
cias absorbidas en su intestino, y que por ello resultaba
-como pudo ser demostrado según la invención- un efecto
esencial de purificación en la preparación de los antígenos
15 somáticos. Puede ser demostrado, en efecto, que el
peso en húmedo de los esquistosomas obtenidos por perfu-
sión a partir de un animal huésped, disminuye en 10-30%
por la incubación según la invención.

20 Esta disminución del peso de las lombrices con-
duce a un material de partida específica y esencialmente
más puro, para la preparación de los antígenos somáticos.

Mientras que esquistosomas no incubados sólo
pueden ser utilizados para la obtención de antígeno me-
diante medidas muy cuidadosas de procedimientos de extrac-
25 ción, la elevada pureza del material de partida hace posi-



23 ABR. 1975

ble el empleo de fuerzas de cizallamiento y de cavitación más intensas, por ejemplo, de ultrasonidos, y conduce después de ello a un rendimiento más elevado de material antígeno específico.

5 Los esquistosomas que sirven como material de partida para el procedimiento según la invención son obtenidos de modo conocido de por sí, por ejemplo con ayuda de la técnica de perfusión, a partir de la sangre de animales infectados. Animales adecuados son, por ejemplo, cerdos o
10 de preferencia roedores, tales como conejos, cobayas, hamster dorados o en especial ratas o ratones. Para la obtención de esquistosomas, los animales son convenientemente infectados artificialmente, aunque también puede hacerse uso de igual modo para la obtención de esquistosomas de animales
15 infectados naturalmente, teniendo que contentarse, no obstante, con obtener un material de partida menos homogéneo.

 Acto seguido los esquistosomas son recogidos y reunidos, convenientemente sobre un tamiz con una anchura de mallas adecuada, y lavados de nuevo, por ejemplo sobre
20 este tamiz o también por decantación. Como solución de lavado sirve una solución acuosa de sal, isotónica frente a los organismos, convenientemente una solución de cloruro de sodio.

 Los esquistosomas así tratados de modo previo
25 se mantienen con vida del modo ya descrito, en una solución



de sal.

A continuación, los esquistosomas incubados son separados de la solución de sal por decantación o por tamizado y, en el caso de que se desee, son lavados de nuevo con solución isotónica de sal o con agua pura.

Para la extracción subsiguiente sirven como agentes de extracción los medios conocidos en la técnica y descritos más arriba, que ya han sido utilizados antes de ahora para la extracción de esquistosomas no tratados previamente según la invención, pero que con los esquistosomas tratados previamente según la invención proporcionan un extracto esencialmente mejorado.

Si así se desea, los esquistosomas aislados de la solución de sal pueden ser liofilizados (secados por congelación) y/o deslipidizados con por lo menos 50 veces su peso en seco de disolventes de lípidos, tales como éter dietílico, antes de la extracción. Antes de la extracción o durante la misma puede ser conveniente la utilización de fuerzas de cizallamiento o de cavitación, por ejemplo el tratamiento con un agitador rápido o con ultrasonidos, o también de una trituración mecánica sencilla. A continuación de la extracción, el extracto acuoso obtenido puede ser sometido, si así se desea, a otras operaciones de purificación, tales como diálisis o cromatografía.

El producto purificado puede ser normalizado para



la detección de la bilharziosis según los requisitos de los sistemas de ensayo de diagnóstico.

5 Para el ensayo intradérmico ha manifestado ser conveniente, basándose en extensos ensayo de campo, llevar a cabo una determinación de nitrógeno en el material antígeno y ajustar la solución de los antígenos somáticos a una concentración final de 0,03 mg de nitrógeno por ml, con ayuda de una solución de sal fisiológicamente tolerable.

10 Objeto de la presente invención son además antígenos que pueden ser obtenidos a partir de esquistosomas obtenidos de animales artificialmente infectados, después de que éstos hubieron sido mantenidos vivos a 10-40°C durante 12-96 horas en 10-100 veces su volumen de un medio salino isotónico, definido químicamente, estéril, libre
15 de proteínas y de nitrógeno.

Los antígenos de esquistosomas, preparados según la invención y normalizados respecto a la cantidad de nitrógeno, permiten investigaciones epidemiológicas en personas afectadas de bilharziosis. 0,05 ml de la solución de
20 antígeno conduce, después de una inyección intradérmica, a un habón en la piel en el lugar de inyección, cuya superficie de más de 1 cm² 15 minutos después de la inyección sirve como una indicación fidedigna de la presencia
25 de anticuerpos de esquistosomas. A base de reacciones sero-



lógicas cruzadas con esquistosomas patógenos frente a animales, por ejemplo *Trichobilharzia* spp. y *Ocellata* spp., que invaden a las personas como huéspedes equivocados o erróneos, el antígeno antes mencionado puede ser utilizado en el diagnóstico para la detección del contacto que ha tenido lugar con las etapas de esquistosomas implicadas.

Sin embargo, los antígenos obtenidos según la invención resultan ser adecuados también para la realización del ensayo de hemaglutinación, como fue descrito por Kagan en 1955 para el diagnóstico de la bilharziosis. Asimismo el antígeno obtenido según la invención puede utilizarse para la reacción de fijación del complemento que fue discutida como procedimiento de diagnóstico para la detección de esquistosomas en *Wld. Hlth. Org. (Organización Mundial de la Salud)* 1961, 25, 611-674.

Además de para los métodos aquí enumerados, los antígenos obtenidos según la invención son utilizables para una serie de otros procedimientos serológicos de ensayo como antígeno en el diagnóstico de la bilharziosis. Sin embargo, también son utilizables para la obtención de antisuero, que pueden ser obtenidos por inmunización de animales de experimentación adecuados con el antígeno de esquistosoma. De este modo se pueden obtener sueros que se comportan en sistemas inmunológicos análogamente a los



que pueden ser obtenidos de pacientes afectados de bilharziosis.

Por consiguiente, otros objetos de la invención son agentes de diagnóstico que contienen antígenos somá-
5 ticos previamente purificados o preparados según la invención, o anticuerpos obtenidos con ellos, y la utilización de los agentes de diagnóstico para la detección de la bilharziosis.

La invención se ha de ilustrar más detallada-
10 mente en el siguiente ejemplo.

Ejemplo

15 35 g, pesados en húmedo, de esquistosomas obtenidos por medio de la técnica de perfusión, a partir de los vasos sanguíneos del mesenterio de ratones infectados experimentalmente, son lavados varias veces en condiciones estériles sobre un tamiz con una anchura de mallas de 0,5 mm
20 cada vez con 100 ml de solución estéril isotónica de cloruro de sodio. Las lombrices liberadas de este modo de sustancias extrañas adheridas son añadidas a 500 ml de una solución compuesta del modo siguiente y filtrada a conti-
25 nuación asépticamente:

		g/l
	NaCl	7,4
	KCl	0,75
	CaCl ₂	0,55
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2
	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	2,7
	NaHCO ₃	0,84
	citrato de Na	2,9
	glucosa	3,6
10	valor del pH	8,3

y mantenidos en total durante 24 horas a 37°C. Después de cada 8 horas tiene lugar un cambio de la solución por otros 500 ml.

15 A continuación las lombrices son lavadas sobre el tamiz con 100 ml de solución isotónica estéril de cloruro de sodio, puestas en suspensión en unos 100 ml de agua destilada estéril y secadas en una instalación de liofilización. Se obtienen 6,25 g de esquistosomas secos.

20 Para la obtención de los antígenos somáticos a partir de los esquistosomas, el material de lombrices desecado se pulveriza finamente en un mortero y a continuación se homogeneiza en porciones, en un homogeneizador de tejidos según FOTTER (fabricado por la firma B. Braun Melsungen) con 950 ml en total de éter dietílico.

25



En tal caso el recipiente del homogeneizador se enfría desde fuera con una mezcla de metanol y de ácido carbónico seco. Los componentes insolubles en éter son separados por centrifugación a -10°C en una centrífuga con refrigeración, protegida contra explosiones. Se desecha la porción que sobrenada y el residuo se libera del éter restante en un desecador bajo vacío. La cantidad total de la sustancia seca obtenida se suspende en 625 ml de una solución de cloruro de sodio, tamponada con borato de sodio (pH 7,4) que consta de 6,202 g de H_3BO_3 , 50 ml de NaOH 1 N, 2,925 g de NaCl, 46,5 ml de HCl 1 N y completada hasta 1000 ml con agua destilada, y se reparte homogéneamente en la solución con el homogeneizador de tejidos mencionado. Después de ello el material homogeneizado es sometido durante 10 minutos a un tratamiento con ultrasonidos a 0,6 A, 220 V (fabricante del aparato: Schöllerschall). A continuación se centrifuga durante 1 hora a 30.000 g (veces la aceleración de la gravedad) se desecha el sedimento y la porción que sobrenada, que contiene el antígeno somático, se dializa durante 10 horas frente a un volumen 10 veces mayor de la solución de cloruro de sodio tamponada con borato que ha sido mencionada. Los antígenos somáticos obtenidos en el material dializado interno pueden ser utilizados para la preparación de agentes de diagnóstico para infecciones de bilharziosis.



Si se desea, los antígenos pueden ser también purificados adicionalmente por medidas cromatográficas adecuadas y, para investigaciones especiales, pueden ser fraccionados en componentes individuales.

5 El ensayo de la actividad biológica de los antígenos somáticos obtenidos se realiza en cobayas, a los que había sido inyectado suero de pacientes de bilharziosis con resultados parasitológicos comprobados, por la detección de la anafilaxia cutánea pasiva:

10 Si a los animales sensibilizados con estos sueros de pacientes, 48 horas después de la administración del suero se les aplica por vía intracutánea el antígeno preparado según el ejemplo precedente, en una dilución de 1 : 50, y simultáneamente se les administra por vía intravenosa
15 1,2 ml de una solución al 0,12 por ciento de azul de Evans, aparece en el lugar de la inyección una aureola azul.

La actividad serológica se determina por valoración mediante la técnica de hemoaglutinación pasiva según Kagan 1955, utilizándose como patrón de suero, sueros
20 seleccionados de pacientes de bilharziosis.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en la República Federal Alemana, el 29 de Abril de 1974, bajo el Nº P 24 20 706.5, se acoge a los beneficios del
25 artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Indus-



23 ABR. 1975

trial.

5

REIVINDICACIONES

10

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15

1ª.- Procedimiento para la preparación de antígenos, caracterizado porque esquistosomas obtenidos de animales infectados son mantenidos vivos a temperaturas de 10 a 40°C, durante 12 - 96 horas en un volumen 10 - 100 veces mayor de una solución acuosa de sal, fisiológicamente tolerable, estéril, libre de proteínas y de nitrógeno, y a continuación son aislados y extraídos con un medio acuoso.

20

25

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque los esquistosomas son liofilizados antes de la extracción, tratados con un disolvente de lí-

75

pidos, y sometidos a fuerzas de cizallamiento o de cavitación y/o dializados antes o durante la extracción.

5 3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 2ª, caracterizado porque la solución de sal fisiológicamente tolerable, estéril, libre de proteínas y de nitrógeno, contiene cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, glucosa, bicarbonato de sodio, fosfato disódico y cloruro de calcio con una concentración en total de 200 a 450 miliosmoles/litros, con la condición de que por lo menos la mitad de la osmolaridad de la solución sea debida al contenido de cloruro de sodio, y de que los demás componentes contribuyan en cada caso con 2-50 miliosmoles/litro al contenido de sustancia disociada en la solución.

10 4ª.- Procedimiento para la preparación de antígenos.

15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

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

Madrid, 03. MAY 1976

P.A.

Oscar de Elzaburu
Por Poder.



23-4-76
VGD.