

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

27 FEB. 1978

ES

11

21

22

NUMERO

455 435

A1

FECHA DE PRESENTACION

**CONCEDIDA**

**PATENTE DE INVENCION**

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
653.672	29 de Enero de 1976	EE.UU. de A.
653.673	29 de Enero de 1976	EE.UU. de A.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12K	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCIÓN  
PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE ANTIGENOS SUPERFICIALES.

71 SOLICITANTE (S)  
AMERICAN CYANAMID COMPANY.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE  
Berdan Avenue, Township of Wayne, Estado de New Jersey, EE.UU. de A.

72 INVENTOR (ES)  
Michael Francis Turnachik., Richard William March.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE  
Don José Miguel Gómez-Acebo Pombo.

5. La presente invención se relaciona con los campos de serología, microbiología e inmunología y específicamente se relaciona con la preparación de antígeno a partir de células enteras y el medio de cultivo en donde se desarrollaron las células, el uso del antígeno así obtenido y productos que contienen el antígeno.

10. De acuerdo con la presente invención puede obtenerse cualquier antígeno asociado con membrana o antígeno superficial de bacterias, hongos, moho, protozoarios, etc., o cualquier antígeno del animal multicelular. El antígeno así obtenido puede utilizarse en procedimientos de ensayo antígeno-anticuerpo para la detección de infecciones y enfermedades o como un agente inmunizante para la prevención de las mismas.

15. Dentro de las bacterias de neisseria que pueden emplearse en la realización de la presente invención están Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitis, Neisseria lactamicus, Neisseria Sicca, Neisseria flava, Neisseria flavescens, Neisseria pufava y Neisseria catarrhalis.

20. Otras bacterias que pueden emplearse en la realización de la presente invención son: Staphylococcus, Streptococcus, Diplococcus, Vibrio, Samonella, Arizona, Citrobacter, Bethesda-Ballerup, Shigella, Escherichia, Klebsiella, Aerobacter, Serratia, Proteus, Providence, Brucella, Henipophilis, Pasteurella, Actinobacillus, Bordetella, Pseudomonas, Listeria, Erysiplothrix, 25. Bacteriodes, Streptobacillus, Bartonella, Mycoplasma, Donavania, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Mycobacterium, Actinomyces, Borellia, Treponema, Leptospira y Spirillum.

30. Además, Rickellsia tal como Chlanydia, virus de membrana, por ejemplo Mycovirus, Arbovirus y Poxvirus; Protozoarios tal como Sarcodina, Ciliophora, Mastigophora y Sporozoa; Meta-

zoarios tal como Trematoda, Cestoda y Nematoda; y células neoplásticas y otras eucarióticas pueden emplearse en la realización de la presente invención.

5. La presente invención se relaciona particularmente con, pero no está limitada a, un método para obtener antígeno a partir de células de Neisseria gonorrhoeae y/o el medio de cultivo en donde se desarrollaron las células, el uso del antígeno así obtenido en procedimientos de ensayo de antígeno-anticuerpo y como un agente inmunizante y con productos que contienen el antígeno.

10. En la realización de una aplicación particular de la presente invención, antígeno obtenido de células de Neisseria gonorrhoeae desarrolladas en un medio de cultivo líquido y del medio de cultivo en sí ha sido obtenido y fijado en partículas de colesterol-lecitina. Las partículas luego sirven como un vehículo para la aglutinación del antígeno en presencia de suero que contiene anticuerpos contra Neisseria gonorrhoeae. La visibilidad de la aglutinación del complejo de antígeno-colesterol-lecitina es mejorada secando el complejo con un colorante soluble en lípidos.

15. Un aspecto de la presente invención se relaciona con un ensayo macroscópico a ser utilizado con suero humano para detectar anticuerpos contra Neisseria gonorrhoeae, el agente causante de gonorrea. Estos anticuerpos indican la presencia o presencia pasada de gonorrea. El presente ensayo

20. utiliza suero calentado de sangre venosa e indica aquellos afectados con gonorrea y aquellos que son portadores de la enfermedad. Los resultados de ensayo realizados en animales de sangre caliente han demostrado que el antígeno obtenido de células de Neisseria gonorrhoeae y el medio de cultivo en donde

25. fueron desarrolladas también produce una respuesta vigorosa

30.

de anticuerpo en animales de sangre caliente y que el antígeno puede ser útil como un agente inmunizante contra gonorrea.

- En su aspecto más amplio, la presente invención se relaciona con lo siguiente: un método para obtener antígeno(s)
5. a partir de cualquier célula u organismo celular que tiene un antígeno superficial o asociado con membrana, siendo dicho antígeno obtenido ya sea a partir de las células o el medio de desarrollo líquido, semisólido o sólido en donde se desarrollaron las células; el antígeno así obtenido; un método para preparar una preparación reactiva de antígeno específica para la
10. detección de infección o enfermedad utilizando el antígeno así obtenido en combinación con un colorante y partículas de colesterol-lecitina; el reactivo de antígeno así preparado; un método para llevar a cabo ensayos de aglutinación para la detección de infecciones utilizando el reactivo de antígeno así pre-
15. parado y dicho método en una ficha de ensayo; un conjunto para llevar a cabo un ensayo de aglutinación para la detección de infecciones que contiene el reactivo de antígeno así preparado junto con otros componentes de conjunto utilizados para
20. llevar a cabo el ensayo; y el uso del antígeno así obtenido para causar respuesta de anticuerpo y como un agente inmunizante en animales de sangre caliente.

- La presente invención ilustra específicamente el desarrollo del organismo o células en un medio de cultivo líquido y la extracción del antígeno a partir de células enteras y el
25. medio líquido en donde se desarrollaron las células. Sin embargo, la presente invención puede ser aplicable al desarrollo de organismos y células en una matriz semisólida o sólida tal como gelatina, ágar, agarosa y mezclas de estos seguido por
30. extracción del antígeno a partir de las células y la matriz

semisólida o sólida en donde se desarrollaron las células. En este caso, las células se raspan del medio de cultivo tal como ágar y el ágar es licuado por ejemplo, por una mezcladora, y el antígeno luego es extraído como se da a conocer aquí a partir de las células y el ágar licuado.

5.

La presente invención permite la solubilización de antígeno superficial y/o ligado a membrana mientras que mantiene la integridad estructural de la célula con sólo una mínima filtración de componentes citoplásmicos. Los antígenos utilizados en la forma cruda (sin precipitación con ácido y digestión con enzima) o elaborados adicionalmente con precipitación con ácido y digestión con enzima pueden absorberse en partículas de colesterol-lecitina para proporcionar una preparación reactiva de antígeno diagnóstica de la presente invención. El antígeno utilizable que puede emplearse para preparar el reactivo de antígeno incluye el antígeno crudo de células que no ha sido precipitado con ácido y enzimáticamente digerido, el antígeno precipitado con ácido y el antígeno enzimáticamente digerido de las células, el antígeno crudo del medio de cultivo que no ha sido precipitado con ácido y el antígeno precipitado enzimáticamente digerido y el antígeno enzimáticamente digerido del medio de cultivo, o mezclas recolectadas de los mismos.

10.

15.

20.

25.

30.

Los antígenos preparados de acuerdo con el método de la presente invención han demostrado actividad in vivo e in vitro. El ensayo de Neisseria gonorrhoeae ilustrado específicamente aquí es un ejemplo de la actividad in vitro e in vivo del antígeno preparado de acuerdo con la presente invención. Los resultados de ensayo realizados en animales de sangre caliente han demostrado que el antígeno preparado de acuerdo con

- la presente invención produce una respuesta de anticuerpo en animales de sangre caliente y que tal antígeno puede utilizarse como un agente inmunizante, tal como una vacuna, en humanos. El antígeno de Neisseria gonorrhoeae digerido con enzima ha
5. sido inoculado en ratones y conejos en combinación con coadyuvante incompleto de Freund. Tanto los ratones como los conejos respondieron serológicamente, produciendo anticuerpos que aglutinaron fuertemente el antígeno cuando se fijó a las partículas de colesterol-lecitina. Esto indicaría que el obtenido
10. antígeno de Neisseria gonorrhoeae digerido con enzima, puede utilizarse como un antígeno de ensayo de piel para detectar gonorrea en humanos. El antígeno sería regulado hasta el nivel deseado de reactividad e incorporado en una mezcla de inmersión similar a aquella utilizada para el ensayo de tina para tuberculosis. Las tintas serían sumergidas en esta mezcla y la dosificación necesaria para causar una reacción en la piel se adheriría a los extremos de la tina. Cuando los puntos de la tina se aplican a o perforan la superficie de la piel, una parte
15. del antígeno sería retenido en el tejido. Si ocurre una respuesta celular inmunológica al antígeno, entonces sería evidente una roncha y un área de eritema según se observa con otros antígenos de ensayo de piel. Alternativamente, el antígeno podría inocularse intradérmicamente y causar el mismo tipo de respuesta.
- 20.
25. En uno de sus aspectos específicos, la presente invención se relaciona con lo siguiente: un método para obtener antígeno a partir de células de Neisseria gonorrhoeae desarrollado en un medio de cultivo líquido, siendo dicho antígeno obtenido ya sea a partir de células o el medio de cultivo en donde se desarrollaron las células; el antígeno así obtenido, un
- 30.

- método para preparar una preparación reactiva de antígeno específica para la detección de infección de Neisseria gonorrhoeae utilizando el antígeno así obtenido en combinación con un colorante y partículas de colesterol-lecitina; el reactivo de antígeno así preparado; un método para llevar a cabo un ensayo de aglutinación para la detección de infección de Neisseria gonorrhoeae utilizando el reactivo de antígeno así preparado y dicho método empleando una ficha de ensayo; y un conjunto para llevar a cabo un ensayo de aglutinación para la detección de infección de Neisseria gonorrhoeae que contiene el reactivo de ensayo antígeno así preparado junto con otros componentes del conjunto utilizados para llevar a cabo el ensayo; y el uso del antígeno así obtenido para producir una respuesta de anticuerpo y como un agente inmunizante contra infección de Neisseria gonorrhoeae en humanos.
- 5.
- 10.
- 15.

- La presente invención se relaciona específicamente con un método para obtener antígeno a partir de células enteras de Neisseria gonorrhoeae desarrollado en un medio de cultivo líquido que comprende las etapas de (a) separar las células del medio de cultivo; y (b) extraer antígeno a partir de las células separadas con una solución alcalina acuosa de pH regulado de una sal de metal alcalino que tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 11,0, en donde la concentración del regulador y la sal es por lo menos 0,01 molar. El antígeno obtenido aquí es un antígeno crudo que puede utilizarse para preparar el reactivo de antígeno de la presente invención. Sin embargo, un aspecto más preferido de la presente invención involucra un antígeno elaborado adicionalmente obtenido mediante las etapas adicionales de (c) concentración del antígeno extraído; (d) precipitación con ácido del antígeno concentra-
- 20.
- 25.
- 30.

- do con un ácido acuoso o una solución regulada con ácido que tiene un pH de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6,0, en donde la concentración del ácido o regulador es de por lo menos 0,01 molar; (e) solubilización del antígeno precipitado con ácido con una solución alcalina acuosa de pH regulado que tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 11,0, en donde la concentración del regulador es de por lo menos 0,01 molar, (f) digestión del antígeno solubilizado con una enzima proteolítica durante aproximadamente 1/4 a aproximadamente 4 hr desde 0°C a aproximadamente 45°C, y (g) detención de la digestión con enzima del antígeno.
5. 10.

- Un aspecto aún más preferido del método para obtener antígeno a partir de células de Neisseria gonorrhoeae desarrollado en un medio de cultivo líquido comprende las etapas de
15. (a) destruir y fijar células enteras de Neisseria gonorrhoeae; (b) separar dichas células de dicho medio de cultivo líquido; (c) extraer antígeno a partir de dichas células con una solución alcalina acuosa de pH regulado de sal de metal alcalino que tiene un pH de aproximadamente 8,2 a aproximadamente 8,8
20. en donde la concentración del regulador es de aproximadamente 0,1 molar; (d) precipitar con ácido el antígeno concentrado con un ácido acuoso o una solución de pH regulado con ácido que tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0 en donde la concentración de dicho ácido o regulador es de aproximadamente 0,1 molar; (e) solubilizar el antígeno precipitado con ácido con una solución alcalina acuosa de pH regulado que tiene un pH de aproximadamente 8,2 a aproximadamente 8,8, en donde la concentración del regulador es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,1 molar; (f) digerir el antígeno solubilizado con una enzima proteolítica durante aproximadamen-
25. 30.

5. te 1/4 a aproximadamente 4 hr a desde aproximadamente 0°C a aproximadamente 45°C; y (g) detener la digestión con enzima del antígeno. Mediante la fijación de las células con formaldehído se halló que el antígeno se volvió muy estable; podía mantenerse a 4°C; y permanecía totalmente activo durante periodos prolongados de tiempo.

10. En un aspecto de la realización de la presente invención, cepas de Neisseria gonorrhoeae se desarrollan en un medio de cultivo líquido atreado durante aproximadamente 4 a 72 hr. Las células luego se exterminan con un agente fijador. El agente fijador preferido es formalina. Otros agentes fijadores apropiados incluyen cualquiera de aquellos agentes conocidos y comúnmente utilizados para fijar células o tejidos para examen histológico y/o microscópico. Las células de N. gonorrhoeae

15. luego se retiran o se separan del medio de cultivo líquido por centrifugación, filtración, decantación, o cualquier otro medio conocido, y el medio de cultivo es retenido. Una forma preferida de separación involucra granulación mediante centrifugación.

20. La extracción del antígeno a partir de las células exterminadas y fijadas se logra con una solución de sal alcalina de pH regulado en donde la concentración puede variar de por lo menos 0,01 molar, o mayor, para tanto el regulador alcalino como la sal, opcionalmente 0,1 molar para el regulador

25. alcalino y 1,0 molar para la sal. Un regulador alcalino preferido es fosfato de sodio, sin embargo, otros reguladores alcalinos que pueden utilizarse incluyen, por ejemplo, tris(hidroximetil)aminometano, Hepes(N-2-hidroximetilpiperacina, ácido N-2-etanosulfónico), boratos, etc. La sal preferida es cloruro

30. de potasio, sin embargo, también se consideran apropiadas

otras sales de metales alcalinos que contienen potasio, sodio o litio. El pH de la solución de sal alcalina de pH regulado debe estar entre aproximadamente 6,0 a aproximadamente 11,0, optimamente, aproximadamente 8,2-8,8, especialmente 8,2-8,5.

5. Luego de la extracción del antígeno a partir de las células con la solución de sal alcalina acuosa de pH regulado, las células se separan del extractor y el extractor se concentra, por ejemplo, mediante ultrafiltración, secado y/o diálisis. El extractor concentrado luego se trata con un ácido acuoso o un regulador de ácido para precipitar el antígeno. El antígeno puede precipitarse con un ácido acuoso tal como ácido clorhídrico 1N o con un regulador de ácido acuoso a un pH de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6,0, óptimamente aproximadamente un pH de 2,0 a aproximadamente 4,0, especialmente un pH de aproximadamente 3,6. La concentración molar del regulador de ácido puede variar de aproximadamente 0,01 molar a aproximadamente 1,0 molar, óptimamente aproximadamente 0,1 molar. Reguladores de ácido apropiados incluyen por ejemplo, acetato, McIlvanine, barbitol-acetato, etc. El regulador de ácido preferido es regulador de acetato de sodio-ácido acético.
10. El antígeno precipitado con ácido luego se separa del ácido o regulador de ácido mediante, por ejemplo, centrifugación, se lava una o más veces con ácido o regulador de ácido y el antígeno precipitado con ácido se solubiliza en una solución alcalina acuosa de pH regulado que tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 11,0, opcionalmente un pH de 8,2-8,8, especialmente un pH de aproximadamente 8,2-8,5. La concentración molar de este regulador puede variar de aproximadamente 0,01 molar a aproximadamente 1,0 molar; óptimamente aproximadamente 0,05 molar a aproximadamente 0,1 molar. Como en la
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

etapa de extracción, reguladores alcalinos apropiados incluyen, por ejemplo, fosfato de sodio o potasio, tris(hidroximetil)aminometano, Hepes(N-2-hidroximetilpiperacina, ácido N-2-etanosulfónico), boratos, etc. El regulador preferido es una mezcla de ácido clorhídrico y tris(hidroximetil)aminometano tal como, por ejemplo, un regulador de clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano 0,05 molar a un pH de 8,2-8,5.

La digestión del antígeno se logra con las enzimas proteolíticas tales como las proteinasas, por ejemplo, pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína, quimopapaína, etc. La enzima preferida es pepsina. No hay ningún límite superior para la concentración de la enzima fuera de aquella dictada por la práctica. El límite inferior para la enzima debe ser aproximadamente 0,01 molar por unidades OD de antígeno a 280 nm. Las gamas de tiempo y temperatura para la digestión pueden variar de aproximadamente 1/4 a aproximadamente 4 hr a desde aproximadamente 0°C a aproximadamente 45°C. El tiempo y la temperatura preferidos para pepsina es de aproximadamente 1 1/4 hr a aproximadamente 37°C. Si es necesario y/o apropiado se regula el pH del antígeno solubilizado alcalino, para la enzima particular utilizada para la digestión. Por ejemplo, para digestión con pepsina, el antígeno solubilizado se regula en el lado ácido; es decir, entre aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6 de pH, preferiblemente aproximadamente un pH de 3,2. Para detener la digestión, el pH de la pepsina se devuelve al lado alcalino, es decir, a un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 11,0, particularmente un pH de 8,2 a 8,8. Con otras enzimas, la digestión a ser detenida es afectada por venenos de enzima tales como mercurio y cianuro, si la regulación del pH no es apropiada.

La presente invención también se relaciona específicamente con el aspecto de obtener antígeno de Neisseria gonorrhoeae a partir del medio de cultivo líquido en donde se desarrollaron células de N. gonorrhoeae que comprende las etapas de (a) separar las células del medio; y (b) concentrar el medio. El antígeno obtenido aquí es un antígeno crudo que puede utilizarse para preparar el reactivo de antígeno de la presente invención. Sin embargo, un aspecto más preferido de la presente invención involucra un antígeno adicionalmente elaborado obtenido mediante las etapas adicionales de (c) precipitar con ácido el antígeno a partir del medio con un ácido acuoso o una solución regulada con ácido que tiene un pH de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6,0, en donde la concentración del ácido o regulador es de por lo menos 0,01 molar; (d) solubilizar el antígeno precipitado con ácido con una solución alcalina acuosa de pH regulado que tiene un pH de aproximadamente 6,0 a 11,0, en donde la concentración del regulador es de por lo menos 0,01 molar; (e) digerir el antígeno solubilizado con una enzima proteolítica durante aproximadamente 1/4 a aproximadamente 4 hr a desde aproximadamente 0°C a aproximadamente 45°C; y (f) detener la digestión con enzima del antígeno.

Un aspecto aún más preferido del método para obtener antígeno a partir del medio de cultivo líquido en donde fueron desarrolladas células de Neisseria gonorrhoeae comprende las etapas de (a) separar las células del medio; (b) concentrar el medio; (c) precipitar con ácido el antígeno a partir del medio con un ácido acuoso o solución regulada con ácido que tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0 en donde la concentración del ácido o regulador es de aproximadamente 0,1 molar; (d) extraer el antígeno a partir del precipi-

- tado de ácido con una solución alcalina acuosa de pH regulado de sal de metal alcalino o una solución alcalina acuosa de pH regulado que tiene un pH de aproximadamente 8,2 a aproximadamente 8,8 en donde la concentración del regulador es de aproximadamente 0,1 molar y aquella de la sal es de aproximadamente 1,0 molar; (e) repetir la etapa (c); (f) solubilizar el antígeno precipitado con ácido con una solución alcalina acuosa de pH regulado que tiene un pH de aproximadamente 8,2 a aproximadamente 8,8 en donde la concentración del regulador es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,1 molar; (g) digerir el antígeno solubilizado con una enzima proteolítica durante aproximadamente 1/ hr a aproximadamente 4 hr a desde aproximadamente 0°C a aproximadamente 45°C; y (h) detener la digestión con enzima del antígeno.
5. Durante la obtención del antígeno de Neisseria gonorrhoeae a partir del medio de cultivo líquido en donde se desarrollaron las células, el medio se concentra tal como por ultrafiltración, secado o diálisis. Si se seca, el concentrado se rehidrata en un regulador de ácido acuoso que tiene un pH de aproximadamente 1,0 a 6,0, óptimamente aproximadamente un pH 2,0-4,0, preferiblemente un pH de aproximadamente 3,6. El antígeno obtenido aquí es utilizable o puede purificarse adicionalmente. Para hacerlo, el material insoluble se separa del líquido y se lava varias veces con el regulador de ácido, para eliminar material soluble. El sedimento se suspende en el regulador de ácido y el sedimento se elimina por centrifugación, filtración o por otros métodos aceptables. El sedimento se disuelve en un regulador alcalino, de pH de 11,0, preferiblemente de pH de 8,2-8,8. La digestión con enzima se efectúa como se describe aquí. Si no se seca, el material se dializa exhaustivamente.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

5. tivamente contra solución salina (0,001 a 3M, preferiblemente 0,15M). Este material puede utilizarse como el antígeno o puede purificarse adicionalmente. Para hacerlo, el pH se regula a 4,8-5,5 con un ácido, preferiblemente clorhídrico. El precipitado se descarta y el fluido sobrenadante se regula a un pH de 3,6. El precipitado se separa y se lava con un regulador de ácido, de un pH de aproximadamente 3,5. El precipitado se disuelve en un regulador alcalino de pH 6,0 a 11,0, preferiblemente pH de 8,2-8,8. La digestión con enzima se efectúa como se describe aquí. Reguladores alcalinos y de ácido apropiados son aquellos mencionados anteriormente aquí.

10. La presente invención contempla específicamente el antígeno extraído como se describió anteriormente aquí. Cualquiera de los antígenos obtenidos anteriormente aquí a partir de ya sea células o el medio de cultivo en donde se desarrollaron pueden utilizarse solos o recolectados para formar la preparación reactiva de antígeno de la presente invención.

15. En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona específicamente con un método para preparar un reactivo de antígeno que es específico para la detección de infección con Neisseria gonorrhoeae que comprende: (a) adsorber el antígeno(s) así obtenido anteriormente aquí en partículas de colesterol-lecitina; y (b) secar las partículas de antígeno-colesterol-lecitina así obtenidas con un colorante soluble en lípidos. La cantidad de antígeno empleada para formar el reactivo de antígeno puede variar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 14,0 O.D. (280 nm), la cantidad del colesterol de aproximadamente 0,7% a aproximadamente 1,4%, y la cantidad de lecitina de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2,0%. La cantidad de colorante soluble en lípidos utilizada para formar el

20.

25.

30.

reactivo de antígeno puede variar de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg por ciento. Colorantes representativos incluyen, por ejemplo, negro de Sudan B; castaño básico; violeta Amethyst; azul Nilo A; azocarmina G; y mezclas de los mismos. Los colorantes y sus mezclas se presentan en el novedoso reactivo de antígeno en combinación con solventes, reguladores de pH, etc., de una manera que ya es conocida en el arte. Estos solventes, reguladores de pH, etc., en sí no forman parte de la presente invención y son utilizados como se describe en sistemas conocidos de antígeno.

Los dos componentes del novedoso reactivo de antígeno, es decir, el complejo de antígeno-colesterol-lecitina y colorante, se emplean en concentraciones que varían de aproximadamente 0,1 mg por ciento a aproximadamente 1 mg por ciento, en peso del antígeno y de aproximadamente 1 mg por ciento a aproximadamente 100 mg por ciento, en peso, del colorante, incluyendo dichos pesos en base al peso total de la mezcla resultante solventes, por ejemplo, agua, alcohol, etc., y regulador de pH.

En la preparación de las partículas o mezclas de colesterol-lecitina, colesterol libre de cenizas comercialmente asequible se disuelve en alcohol absoluto (graduación de 200). Generalmente se disuelve suficiente colesterol libre de cenizas en alcohol absoluto para preparar una solución de 1,2%.

Se solubiliza en alcohol absoluto lecitina comercialmente asequible de huevo, carne o vegetales, tal como lecitina de soja. Los dos constituyentes luego se mezclan con alcohol absoluto en una relación para producir una concentración final de colesterol de aproximadamente 0,7 a 1,1%; preferiblemente aproximadamente 0,9%, y una concentración de lecitina de aproximada-

mente 0,10 a aproximadamente 2,0%, preferiblemente aproximadamente 0,22%.

5. La cantidad óptima de lecitina para la suspensión de antígeno se determina mediante incrementos sucesivos de lecitina en colesterol al 0,9%. Se preparan suspensiones de antígeno con cada una de las mezclas de colesterol-lecitina mediante el procedimiento descrito anteriormente. Para preparar el antígeno se utiliza la relación de lecitina a colesterol a 0,9% que proporciona reactividad óptima a sueros de individuos culturalmente positivos y de individuos presuntamente no infectados.

10. El antígeno extraído como se describió anteriormente aquí se coloca en un recipiente y se agregan las partículas de colesterol-lecitina preparadas como se indicó anteriormente aquí. La botella se agita y la mezcla se deja reposar durante por lo menos 5 min. La materia en partículas se separa por centrifugación y se vuelve a suspender en un medio de suspensión USR. La suspensión luego se colorea con colorantes solubles en lípidos deseados o mezclas de los mismos. La presente invención contempla específicamente el reactivo de antígeno preparado como se describió anteriormente aquí.

15. En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para llevar a cabo un ensayo de aglutinación para infecciones con N. gonorrhoeae que comprende mezclar un suero de ensayo con el reactivo de antígeno preparado anteriormente aquí. Y, en un aspecto aún más específico, la presente invención se relaciona con un método para llevar a cabo un ensayo de aglutinación para infecciones de Neisseria gonorrhoeae utilizando una ficha de ensayo que tiene sobre la misma una mancha de ensayo, tal como un área delineada por un círculo, adap-

5. tada para recibir una muestra de ensayo y el reactivo de antígeno preparado como se describió anteriormente aquí, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha mancha de ensayo con (a) un suero de ensayo y (b) un reactivo de antígeno preparado como se describió anteriormente aquí.

10. El ensayo que utiliza el reactivo de antígeno de la presente invención involucra preferiblemente el uso de una ficha de ensayo. La ficha de ensayo debe ser uniforme de manera de hacer fácilmente discernible los resultados del ensayo. Si bien se ha indicado previamente en el arte anterior que la superficie debe ser humedecible, se ha hallado que esto no es el caso y meramente se prefiere una superficie humedecible. La ficha puede estar compuesta de papel bien prensado o cartón y puede ser absorbible, sin embargo, sólo se prefieren pequeños

15. grados de absorbibilidad. Un aspecto del nuevo reactivo de antígeno es que el ensayo puede leerse si la mancha está ya sea húmeda o seca y por lo tanto los resultados pueden verificarse más rápidamente que cuando se utilizan otras técnicas. La

20. ficha también puede ser un laminado de papel o una base de cartón que tiene un material permeable al agua o impermeable al agua recubierto sobre el mismo, tal como polietileno. El papel en sí o el recubrimiento, sin embargo, debe ser de un color que contrasta con relación al color del colorante empleado en el ensayo. Básicamente, puede utilizarse cualquier ficha similar en construcción y composición a la que se dá a conocer en

25. la patente estadounidense Nº 3.074.853.

30. Al llevar a cabo el ensayo que utiliza la ficha de ensayo, se dispersa aproximadamente 0,05 ml de suero que ha sido calentado a aproximadamente 62-63°C durante aproximadamente 1/2 hr y aproximadamente 1/60 ml de reactivo de antígeno

dentro de los confines de un círculo (por ejemplo aproximadamente 18 mm) impreso sobre una ficha recubierta plástica comercialmente asequible. La ficha se hace girar en un rotator mecánico entre 4 y 20 min a 80-180 rpm. Sin embargo, puede ser efectiva una agitación manual. La ficha se examina con relación a la presencia o ausencia de aglutinación característica.

En otro aspecto específico, la presente invención se relaciona con un conjunto o unidad para llevar a cabo un ensayo de aglutinación para infección de Neisseria gonorrhoeae que comprende principalmente por lo menos una ficha de ensayo que tiene sobre la misma una pluralidad de manchas de ensayo, tal como áreas delineadas por un círculo, adaptada para recibir el reactivo de antígeno y los sueros de control; un recipiente de reactivo de antígeno preparado como se describió anteriormente aquí; un recipiente de suero reactivo; un recipiente de suero de control débilmente reactivo; y un recipiente de suero de control no reactivo. También pueden incluirse otros componentes en el conjunto tales como tubos de ensayo, bulbos de caucho, etc.

En un aspecto aún adicional, la presente invención se relaciona con el uso del antígeno extraído como un agente inmunizante. Como se indicó aquí, ensayos en animales de sangre caliente han demostrado que antígeno de Neisseria gonorrhoeae digerido con enzima obtenido como se describió aquí produce anticuerpos al antígeno en animales de sangre caliente y por lo tanto apunta hacia el uso potencial del antígeno como un agente inmunizante en humanos. Por lo tanto, la presente invención incluye un método para inmunizar un ser humano contra infección de Neisseria gonorrhoeae que comprende administrar a un ser humano una cantidad inmunológicamente efectiva de un

5. antígeno preparado como se describió aquí. La administración puede ser parenteral. La presente invención también se relaciona con un método para producir respuesta en animales de sangre caliente al antígeno preparado aquí mediante inoculación de un animal de sangre caliente con dicho antígeno.

Los siguientes ejemplos servirán para ilustrar la presente invención con más detalle.

Ejemplo 1

10. Preparación de antígeno de *Neisseria Gonorrhoeae* a partir de células y medio.

15. Un cultivo de semilla de cepa B370 de *Neisseria gonorrhoea* depositada en American Type Culture Collection, número de acceso 21824, se inicia a partir de una alícuota liofilizada. Luego de rehidratar con agua destilada estéril, el fluido se transforma en agar de eugon de chocolate y se incuba en un jarro de extracción a 36°C durante 24 hr. Se inocula en volumen de 2 lt de medio de peptona y se coloca en un agitador a 100 rpm en un ambiente caliente a 36°C. Se utilizan 1300 ml de medio de peptona líquido para inocular el fermentador (capacidad de 30 lt). Todos los ingredientes del medio se esterilizan en el fermentador excepto glucosa que se agrega separadamente. Luego de aproximadamente 24 hr el cultivo se destruye y se fija mediante la adición de formaldehído hasta una concentración final de 2% (v/v).

25. Las células se separan del fluido de cultivo mediante centrifugación y el fluido sobrenadante se salva. Las células se extraen con 10 volúmenes (p/v) de KCl 1,0 M en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 8,8, durante la noche a 4°C y las células se separan por centrifugación. El material extractor se reduce, aproximadamente 100 X mediante ultrafiltración, y luego hasta sequedad apa-
- 30.

rente por diálisis contra polietilenglicol 6000. Las bolsas de diálisis se lavan detenidamente y se colocan en un regulador de pH de acetato de sodio-ácido acético 0,1 molar, pH 3,6, para rehidratar y precipitar el antígeno. Luego de centrifugación el antígeno precipitado con ácido se solubiliza en regulador de tris(hidroximetil)aminometano 0,05 M, pH 8,5.

Luego de concentrar aproximadamente 70 X mediante ultrafiltración, el sobrenadante del cultivo se dializa hasta sequedad, utilizando polietilenglicol 6000. Los tubos de diálisis se colocan en varios cambios de regulador de acetato de sodio-ácido acético 0,1 M para parcialmente rehidratar los contenidos y para precipitar el antígeno. El sedimento se elimina por centrifugación y se extrae el gránulo con 10 volúmenes de KCl 1M que contiene  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M (pH 8,8). El sobrenadante se acidifica con HCl hasta un pH de 3,6 y el antígeno precipitado con ácido se separa por centrifugación. Solubilización del antígeno se logra utilizando regulador de tris(hidroximetil)aminometano 0,1 M, pH 8,5.

El antígeno(s) tris solubilizado extraído de las células y el sobrenadante del cultivo se combinan y se someten a digestión con pepsina. El pH de la solución de antígeno se reduce a pH 3,2 mediante la adición de HCl 12 N. Luego se agregan 10 mg de pepsina (en ácido acético 0,2 M a 1 mg/ml) a 56 ml de antígeno (36 unidades OD de 280 nm) y se incuba a 36° durante 1-1/4 hr. La reacción se termina por la adición de NaOH 10 N hasta que el pH es de 8,5. Siguiendo la inactivación de la pepsina, el antígeno(s) digerido se diluye 1:1 con regulador de tri(hidroximetil)aminometano 0,05 M, pH 8,5. El antígeno preparado como se describió está listo para ser usado en la preparación del reactivo de antígeno.

Ejemplo 2

Preparación de antígeno de Neisseria gonorrhoeae a partir del medio.

5. Las células fijadas con formalina se retiran del fluido del cultivo mediante centrifugación, 50 lt de sobrenadante se concentran 100 veces utilizando ultrafiltración. El concentrado se dializa contra solución salina al 0,85% y el volumen se restaura a 500 ml mediante ultrafiltración. El pH se regula a 5,2 y el precipitado se elimina por centrifugación. El sobrenadante se regula a pH 3,8 y el precipitado se elimina por centrifugación. El precipitado se resuspende en 100 ml de regulador de tris(hidroximetil)aminometano, pH 8,5.

Ejemplo 3

Preparación in vitro de reactivo de antígeno de Neisseria Gonorrhoeae

15. El antígeno extraído de célula y extraído del sobrenadante de cultivo preparado como en el Ejemplo 1 se recoge y el antígeno recolectado se adsorbe en partículas de colesterol-lecitina de la siguiente manera.
20. Una solución de 130 ml de etanol absoluto que contiene 0,9% de colesterol y 0,225% de lecitina de huevo se agrega gota a gota a 130 ml de antígeno solubilizado que gira a 160 rpm en un recipiente de fondo plano. La mezcla de reacción luego se incuba a temperatura ambiente durante 15 min. Siguiendo esto el conjunto se granula por centrifugación a 3.000 x g durante 1/2 hr a 4°. El conjunto se suspende en 1040 ml de regulador de pH USB y se agrega 4,55 ml de colorante de negro de Sudan B (10 mg/ml en etanol absoluto) mientras se agita en un agitador magnético. El conjunto de antígeno coloreado se almacena en una botella de vidrio taponada a 4°. El reactivo de

antígeno preparado precedentemente está listo para uso en el ensayo in vitro.

Ejemplo 4

Ensayo in vitro para la detección de anticuerpo a Neisseria Gohorrhoeae

5.

El ensayo se realiza en suero que ha sido calentado a 62-63°C durante 1/2 hr. Cinco centésimas (0,05 ml) de suero y 1/60 ml de reactivo de antígeno preparado como en el Ejemplo 2 se dispersa dentro de confines de un círculo de un diámetro de 18 mm en una ficha de ensayo blanca comercialmente asequible. La ficha se coloca en un rotator clínico durante 8 min a 130 rpm. En una reacción positiva, son visibles agregados de azul brillante bajo un haz incidente de luz cuando están presentes anticuerpos al antígeno en el suero. Una reacción negativa es una en que el reactivo no se agrega en partículas discretas sino que permanece como una suspensión homogénea.

10.

15.

Ejemplo 5

Lo siguiente ilustra la presente invención en forma de unidad para la detección in vitro de infección de Neisseria gonorrhoeae. La unidad contiene 500 determinaciones.

20.

Cada unidad contiene:

1 Reactivo de antígeno, 10 ml.

1 Suero de control reactivo, 1 ml.

1 Suero de control débilmente reactivo, 1 ml.

25.

1 Suero de control no reactivo, 1 ml.

35 Fichas de ensayo.

500 Tubos de muestra.

Materiales necesarios para realizar el ensayo se incluyen como elementos desechables en la unidad que está diseñada para utilizar un mínimo de espacio. Los elementos que requie-

30.

5. ren refrigeración pueden separarse de aquellos que pueden almacenarse a temperatura ambiente. Un rotator mecánico (regulable a 130 rpm) y una buena fuente de luz son piezas de equipo que deben ser suministradas por el laboratorio. La refrigeración del reactivo de antígeno es sugerida. Se halló una vida de almacenamiento de más de 6 meses cuando el antígeno se almacenó a 2-10°C. Exposición del antígeno a luz solar brillante debe evitarse. El antígeno debe dejarse calentarse a temperatura ambiente (22,2-25,6°C) antes de usarse. El antígeno utilizado inmediatamente después de su separación del refrigerador puede no ser tan sensible como un antígeno apropiadamente calentado. Al completarse los ensayos diarios, se coloca la tapa especial sobre el extremo de la aguja suministradora. Se coloca la botella taponada en el refrigerador.

15. Botella de reactivo de antígeno

- Para abrir la botella de reactivo de antígeno, se dobla la tapa en la dirección de la flecha. Esto libera una aguja cargada a resorte que perfora el diafragma. El sistema suministrador de antígeno está entonces listo para uso como se describió anteriormente aquí.

20. Fichas

- Las fichas utilizadas en el ensayo tienen un recubrimiento especial que permite que la mezcla de antígeno-suero sea fácilmente dispersada sobre el área de ensayo. Las fichas deben manipularse cerca de los bordes de manera que los dedos no toquen las áreas de ensayo dado que el aceite de los dedos puede provocar la dispersión inadecuada del ensayo dentro de esta área.

25. Tubos de muestra

30. Los tubos de muestra son utilizados para transferir

suero cuando se realiza el ensayo de clasificación. El tubo está diseñado para suministrar aproximadamente 0,05 ml de suero. Un tubo de muestra no utilizado debe emplearse para cada muestra de ensayo.

5. Rotator mecánico

Un rotator utilizado para el ensayo de platina VDRL es satisfactorio para uso en este ensayo si la velocidad puede regularse a 130 rpm (Requerimientos de operación: Plataforma para circunscribir un círculo de 19 mm de diámetro en un plano horizontal).

10.

Fuente de luz para ensayos de lectura

Es satisfactoria una luz, tal como una lámpara de escritorio fluorescente con dos lámparas de 15 watt o una luz de elevada intensidad. La mayoría de las reacciones son visibles con la luz disponible en un laboratorio adecuadamente iluminado. Sin embargo, pueden perderse reacciones marginales si no se utiliza una luz adecuada.

15.

Sueros de control

Se recomienda que los sueros de control se utilicen para ensayar la reactividad del antígeno. Los sueros son:

20.

Designación

Reactividad

NR

No reactivo

DR

Débilmente reactivo

FR

Fuertemente reactivo

25.

Suero

Se recoge sangre por perforación de vena en tubos limpios secos y se deja coagular. Si es necesario, se centrifuga las muestras con fuerza suficiente para sedimentar los elementos celulares. Se elimina el suero del coágulo y se coloca en un tubo limpio y seco. Justo antes de ensayar, se ca-

30.

lenta a 62-63°C durante 1/2 hr.

Procedimiento de ensayo

5. 1. Se mantiene el tubo de muestra plástico entre el dedo pulgar y el dedo índice cerca del extremo sellado. Se comprime el tubo y se inserta el extremo abierto en la muestra y se libera la presión de los dedos para extraer la muestra, siendo cuidadoso de no molestar el coágulo o los materiales sedimentados.
10. 2. Se mantiene el tubo de muestra plástico en una posición perpendicular sobre el círculo de ensayo. No se toca la superficie de la ficha. Se comprime el tubo de muestra y se deja caer una gota sobre el área de ensayo. Se descarga la muestra restante nuevamente al tubo de muestra.
15. 3. Se invierte el tubo de muestra plástico, y con el extremo agitado (extremo sellado) se dispersa la muestra dentro de los confines del círculo.
20. 4. Se agita suavemente la botella suministradora de antígeno antes de su uso. Se mantiene en una posición vertical y se suministran 3 gotas en una esquina de la ficha. Luego se coloca 1 gota de caída libre sobre cada área de ensayo. Se recoge el antígeno de la esquina de la ficha.
25. 5. Se coloca la muestra en un rotator mecánico bajo un recubrimiento de humedad y se hace girar a 130 rpm durante 8 min.
30. 6. Se examina la muestra bajo luz brillante. Sueros fuerte y moderadamente reactivos son obvios por la presencia de agregados de azul brillante. Sueros mínimamente reactivos son detectados moviendo la gota de la muestra hacia atrás y hacia adelante para observar el pequeño agregado.
7. Se registra como:  
Reactivo: Cualquier aglutinación característica de .

mínimo a fuertemente reactivo. (En comparación con sueros de control).

No reactivo: Sin aglutinación o rugosidad.

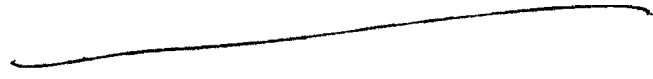
Ejemplo 6

5. Respuesta de anticuerpo in vivo a antígeno de *Neisseria gonorrhoeae*.

Se trataron dos conejos por inoculación subcutánea con antígeno de *N. gonorrhoeae* digerido con enzima. El inóculo había sido dializado contra NaCl al 0,85% antes de su uso. 1/2 ml de antígeno fué proporcionado subcutáneamente en dosis divididas en diversos sitios. El animal recibió una inoculación fortalecedora. 14 días después se ensayó la inoculación final de sueros de los animales utilizando un antígeno de *N. gonorrhoeae* digerido con enzima sobre partículas de colesterol-lecitina.

10. Las titulaciones variaron hasta 1:128. Este ejemplo ilustra la respuesta de anticuerpo in vivo al antígeno de la presente invención y su uso potencial como un agente inmunizante en seres humanos.

15. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.




REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la obtención de antígenos superficiales, o asociados a membranas, a partir de células enteras o medios de cultivo en donde se desarrollan, caracterizado porque comprende: (a) destruir y fijar dichas células;
5. (b) separar dichas células del medio; (c) extraer antígeno de dichas células o medio de cultivo con una solución alcalina acuosa de pH regulado de sal de metal alcalino que tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 11,0, en donde la concentración de dicho regulador de pH y sal es de por lo menos
10. 0,01 molas; (d) concentrar dicho antígeno; (e) precipitar con ácido dicho antígeno concentrado con un ácido acuoso o una solución de regulador de ácido que tiene un pH de aproximadamente
15. 1,0 a aproximadamente 6,0, en donde la concentración de dicho ácido o regulador es de por lo menos 0,01 molar; (f) solubilizar dicho antígeno precipitado con ácido con una solución alcalina acuosa de pH regulado que tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 11,0, en donde la concentración de dicho regulador es de por lo menos 0,01 molar y, si se desea, digerir el antígeno solubilizado con una enzima proteolítica durante aproximadamente 1/4 hr a aproximadamente 4 hr entre
20. aproximadamente 0°C y aproximadamente 45°C; y detener la digestión con enzima del antígeno.

- 2.- Procedimiento para la obtención de antígenos superficiales, a partir de Neisseria gonorrhoeae, caracterizado porque comprende las etapas de:
- 25.

- a) desarrollar células completas de Neisseria gonorrhoeae en un medio líquido durante un periodo que no exceda de 72 horas;
30. b) destruir y fijar dichas células;

- c) separar dichas células del medio;
- d) concentrar dicho medio que contiene el antígeno por ultrafiltración, secado o dialíxis;
- e) precipitar con ácido dicho antígeno concentrado a partir del medio con un ácido acuoso o una solución tampón ácida que tiene su pH comprendido entre 1,0 y 6,0 aproximadamente, donde la concentración del ácido o de la solución tampón es de 0,01 molar como mínimo;
5. f) solubilizar el antígeno a partir del precipitado con ácido, con solución acuosa de sal o metal alcalino, tamponada con alcalí que tiene un pH comprendido entre 6,0 y 11,0 aproximadamente, donde la concentración del tampón y de sal es de 0,01 molar como mínimo;
10. g) digerir el antígeno solubilizado con una enzima proteolítica durante aproximadamente un cuarto de hora a cuatro horas aproximadamente y a una temperatura comprendida entre 0°C y 45°C aproximadamente;
15. h) detener la digestión con enzima del antígeno.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque tras la destrucción y fijación de dichas células, pero antes de separar las células del medio, se agrega una solución acuosa de una sal de metal alcalino tamponada con alcalí que tiene un pH comprendido entre aproximadamente 6,0 y 11,0, siendo la concentración de dicho tampón y de dicha sal de 0,01 molar como mínimo, para eliminar cualquier antígeno superficial residual de las células completas.
20. 4.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque para preparar la detección de infección, comprende: (a) adsorber el antígeno de la reivindicación 1, en partículas de colesterol-lecitina; y (b) secar el comple-
25. 30.
- 

jo de antígeno-colesterol-lecitina con un colorante soluble en lípidos.

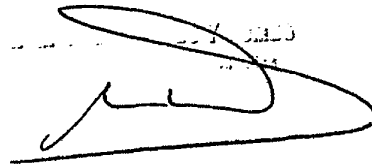
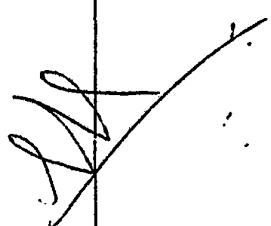
5. 5.- Procedimiento para la obtención de antígenos superficiales, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 28 hojas escritas a máquina por una sola cara.

15 FEB. 1978

Madrid,

AMERICAN CYANAMID COMPANY.

A large, stylized handwritten signature in black ink, appearing to be a cursive name, positioned below the typed name of the company.A smaller, less legible handwritten signature or mark in the bottom left corner of the page.