

324624

P- 31.640

ES/A 283



324624

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

PATENTE D E INVENCION

formulada el 24 de Marzo de 1960, con el Nº 324.624

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, entidad británica, establecida en 183-193, Euston Road, Londres, Inglaterra, por:

"UN METODO PARA PREPARAR UNA COMPOSICIÓN DE VACUNA INYECTABLE"

Este invento se refiere a material biologicamente activo y especialmente a vacunas y a su preparación.

muchos animales son susceptibles de enfermedades que proceden de infecciones de miembros patógenos del género Clostridina. Los corderos y ovejas adultos son particularmente susceptibles a muchas de estas enfermedades y en particular a las causadas por cepas de la especie "Clostridium perfringens". Estos organismos proliferan en el intestino y producen toxinas que dan lugar a los síntomas y cambios patológicos sintomáticos de la enfermedad, y pueden conducir a la muerte del animal



Así las beta- y epsilon-toxinas de "Cl. Perfringens" tipo B dan lugar a la disentería del cordero y la epsilon-toxina de "Cl. perfringens" tipo D dan lugar a la enfermedad de -
5 ríñon pulposo en los corderos. Similarmente la enterotoxemia, tal como se denomina frecuentemente en el cordero adulto, es causada por la beta-toxina de "Cl. perfringens" tipo C.

Además de ser susceptibles a las enfermedades antes descritas, las ovejas y otros animales, por ejemplo el -
10 ganado vacuno, son también susceptibles a otras enfermedades clostridianas. Así, las ovejas y el ganado vacuno son susceptibles de infección por el "Cl. septicum" que da lugar a la enfermedad de fiebre carbuncular en las ovejas y -
algunas veces la morriña negra en el ganado vacuno, y es -
15 también en parte responsable de síntomas similares a los de la gangrena gaseosa. Otra infección clostridiana común es la peste Negra que aparece en las ovejas y ocasionalmente -
en el ganado vacuno y está causada por "Cl. oedematiens" tipo B. El mismo organismo puede infectar también heridas en
20 el cuerpo conduciendo a una infección de gangrena gaseosa. La enfermedad bien conocida, el tétano, en ovejas y ganado vacuno está causado también por un organismo clostridiano, el "Cl. tetani" y una nueva enfermedad de extendida aparición en el ganado vacuno y de menos frecuencia en las ovejas es -
25 la morriña negra causada por "Cl. chauvoei".

Un método de proteger contra estas enfermedades -
consiste en vacunar a los animales con un toxóide derivado de los organismos causantes, y en el caso de "Cl. chauvoei" vacunar con un anacultivo del organismo. La inyección subcu-
30 tánea con un toxóide o anacultivo apropiado produce la res -

324624



puesta anticuerpo deseada que protege al animal contra la enfermedad. La respuesta evocada o buscada después de la inyección de un simple toxoide o anacultivo puede ser aumentada substancialmente incluyendo coadyuvantes en la vacuna que, por un mecanismo todavía no enteramente comprendido, producen una mayor respuesta anticuerpo y por ello un mayor grado de protección. Los coadyuvantes que han encontrado amplia aceptación son los adsorbentes de aluminio, y éstos deben al menos algo de su eficacia a su capacidad de adsorber y a retener el antígeno en el lugar de inyección.

La utilización común de coadyuvantes de aluminio ha reducido materialmente el número de inyecciones necesarias para proteger contra las enfermedades clostridianas acrecentando la respuesta anticuerpo en tal grado que las vacunas pueden ser combinadas entre sí en una única vacuna. La preparación de dichas vacunas múltiples o multicomponentes no era factible hasta que el valor inmunógeno de cada constituyente puede ser aumentado suficientemente para permitir su dilución por los otros componentes. Cuando es necesario vacunar un gran número de animales se produce una considerable disminución en el gasto y en el trabajo administrando una vacuna multicomponente en lugar de inyecciones separadas de las vacunas constituyentes individuales. Esto se verifica particularmente cuando un gran número de animales extendidos sobre largas áreas han de ser buscados o rodeados para su vacunación.

No obstante, la utilización de vacunas clostridianas coadyuvadas con aluminio tiene sus desventajas. La inyección subcutánea de las vacunas conduce frecuentemente a una reacción local en el lugar de inyección y la alta respuesta

de inmunidad no dispensa al granjero de proporcionar nuevas dosis reforzadoras de la vacuna. Así, después que las ovejas han sido vacunadas contra estas enfermedades, una nueva inyección de la misma vacuna coadyuvada es requerida aproximadamente 4 a 6 semanas más tarde y subsiguientemente a intervalos de aproximadamente 6 meses para mantener el nivel requerido de inmunidad. La vacunación antes del parto de corderos se necesita de forma que la oveja preñada pueda transferir pasivamente a los corderos a través del calostro los anticuerpos maternos para proteger a los corderos contra la enfermedad del riñón pulposo, el tétano y la disentería de cordero en los días que siguen al nacimiento.

En intentos de obtener un grado todavía mayor y una mayor duración de la inmunidad han sido investigados en los últimos años de forma extensa otros medios de acrecentar la antigenicidad de las vacunas en emulsiones de agua en aceite para activar la respuesta anticuerpo.

En una emulsión de agua en aceite clásica del tipo Freund, el antígeno está presente en una fase acuosa dispersada en una fase de aceite continua que contiene un emulsificador lipófilo o soluble en aceite para activar la emulsificación. Utilizando dicho sistema emulsificador ha sido posible obtener un alto grado de inmunidad. Sin embargo, este tipo de emulsión no ha encontrado aceptación a causa de una variedad de razones incluyendo la inestabilidad de la emulsión y las reacciones locales extensas producidas frecuentemente en la inyección subcutánea en el animal.

De acuerdo con el presente invento, se crea una preparación de vacuna inyectable que comprende un material

324624



antígeno acuoso derivado de al menos una especie de clostridium patógena, un aceite, un emulsificador lipófilo y un emulsificador hidrófilo, siendo la preparación una emulsión estable parenteralmente aceptable de una fase acuosa
5 antígena dispersada en una fase de aceite continua.

Las vacunas del presente invento han resultado - proporcionar una respuesta anticuerpo considerablemente mayor, por administración a corderos, cerdos de guinea y conejos, que la respuesta antigénica obtenida de una vacuna
10 comparable que contiene sólo un emulsificador lipófilo. La inmunidad obtenida de una vacuna del presente invento se extiende también durante un periodo más largo que la inmunidad proporcionada por vacunas en emulsión de agua en aceite comparables hasta ahora conocidas, de manera que se disminuye sustancialmente la necesidad de nuevas dosis para
15 mantener un nivel adecuado de inmunidad. Por ejemplo, una oveja inmunizada con una vacuna del presente invento no requiere una nueva inyección hasta 6 ó 9 meses más tarde, y después de esto una inyección cada uno o dos años es suficiente para mantener un adecuado nivel anticuerpo. El nivel
20 anticuerpo en el calostro es también sustancialmente mayor que el nivel obtenido con vacunas de aluminio. Las vacunas del presente invento son también sustancialmente más estables que las vacunas comparables del tipo Freund, y las
25 emulsiones no se "invierten" o "rompen" incluso después de un almacenamiento a entre 2 y 5°C durante largos periodos hasta de dos años. Las vacunas del presente invento son también menos viscosas que las vacunas comparables que contienen solo un emulsificador lipófilo, y por ello son más
30 fácilmente susceptibles de ser inyectadas. Se ha encontrado



también que las vacunas del presente invento inyectadas en ovejas de forma intraperitoneal producen una respuesta inmune y una protección satisfactorias contra las enfermedades apropiadas, de forma que la administración de las vacunas de esta manera pone fin enteramente al problema existente desde largo tiempo atrás de la reacción en el lugar de la inyección que aparece con la administración subcutánea.

Este invento proporciona también un método para la profilaxis de enfermedades clostridianas en ovejas y ganado vacuno que comprende la administración por inyección intraperitoneal de una vacuna del presente invento.

El material antigéno para incorporar en la vacuna puede ser cualquier antigéno o mezcla de antígenos derivados de la especie *Clostridium* y utilizados para inmunizar vertebrados. La preparación de un material antigéno apropiado está descrita enteramente en la bibliografía y particularmente en monografías tales como "British Pharmacopoeia", "Pharmacopoeia of the United States of America", "British Veterinary Codex" y el "Dispensatory of the United States of America". El material antigéno puede derivarse por ésto de una o más bacterias que son organismos causantes de enfermedades clostridianas, e incluyen "Clostridium perfringens" tipo B, "Cl. perfringens" tipo C, "Cl. perfringens" tipo D, "Cl. Chauvoei", "Cl. Septicum", "Cl. oedematiens" y "Cl. tetani". El material antigéno obtenido de estos organismos puede ser combinado para proporcionar vacunas multicomponentes para la profilaxis de más de una enfermedad, y el invento puede ser aplicado también a estas vacunas multicomponentes, por ejemplo una vacuna para tratar la fiebre

324624

6 MAY



carbuncular y la morriña negra que contiene material anti-
geno derivado de "Cl. septicum" y "Cl. chauvoei", una vacu-
na para tratar las enfermedades de fiebre carbuncular, mo-
rriña negra y peste negra derivadas de "Cl. septicum", "Cl.
5 Chauvoei" y "Cl. oedematiens", una vacuna para tratar la -
fiebre carbuncular, el riñón pulposo y la morriña negra y
las enfermedades de tétano derivados de "Cl. septicum",
"Cl. chauvoei", "Cl. perfringens" tipo D, y "Cl. tetani",
y una vacuna para tratar el tétano, la fiebre carbuncular,
10 la morriña negra, el riñón pulposo, la disentería de cor-
dero, la enterotoxemia y la peste negra derivadas de "Cl.
perfringens" tipos B,C y D, "Cl. tetani", "Cl. chauvoei",
"Cl. septicum" y "Cl. oedematiens", tipo B.

Naturalmente, los emulsificadores para su inclu-
15 sión en las vacunas del invento deben ser no tóxicos y com-
patibles con los componentes antígenos de la vacuna. Son -
preferiblemente del tipo no iónico de manera que hay menos
tendencia a que éstos sean precipitados por componentes de
la preparación antigénica que cuando se utiliza un emulsifi-
20 cador catiónico o aniónico. También hay menos peligro de -
desnaturalización de la proteína del antígeno si se utili-
za un emulsificador no iónico. La combinación, las canti -
dades y las proporciones de emulsificadores escogidos de -
berán ser también tales que cuando están incluidos en la va-
25 cuna producen el máximo grado de acrecentamiento de la an -
tigenicidad y estabilidad de la emulsión.

Los emulsificadores lipófilos son preferiblemen-
te agentes tensioactivos no iónicos que tienen un bajo equi-
librio de hidrófilo-lipófilo de aproximadamente entre 8 y
30 2. (William C. Griffin, "Calculation of HLB values of non-



ionic surfactants", Journal of the Society of Cosmetic Chemists (1.954) volumen 5, pags. 249-256; Osipow, "Surface Chemistry, ACS Monograph 153", pags. 295-314, Reinhold, 1.962). Este es el límite exterior del margen de valores de EHL de emulsificadores más apropiados para incorporar en la fase de aceite y un límite óptimo de valores de EHL es de 2 a 6. Entre los emulsificadores lipófilos apropiados están los di- y tri-ésteres de alcoholes polivalentes y ácidos grasos, ácidos grasos oxidados, y ésteres parciales de ácidos grasos comunes, por ejemplo los ácidos palmítico, láurico, esteárico y oléico con anhídridos de hexitol derivados del sorbitol o del manitol. Ejemplos de emulsificadores específicos son los ésteres de ácidos grasos de manitano y sorbitano tales como monooleato de manida (Arlacel A, EHL 4,3), monooleato de sorbitano (Arlacel 80, EHL 4,3), monopalmitato de sorbitano (Arlacel 40, EHL 6,7), monoestearato de sorbitano (Arlacel 60, EHL 4,7), y sesquileato de sorbitano (Arlacel C, EHL 3,7).

El emulsificador hidrófilo para su utilización en estas vacunas deberá tener preferiblemente un valor de EHL entre aproximadamente 9 y 20 y de forma óptima entre 11 y 18. Clases apropiadas son los ésteres de poliglicol de ácidos grasos, los ésteres de ácidos grasos modificados con polioxietileno, los ésteres de polioxietileno-poliol de ácidos grasos, los éteres de polioxipropileno y de alcohol graso, y los ésteres de polipropileno glicol de ácidos grasos. Una clase particularmente útil son los derivados de polioxialcoholeno de ésteres de alcoholes polivalentes de ácidos grasos tales como derivados de polioxietileno de ésteres parciales de los ácidos láurico, palmítico, esteárico y oléico y los anhídri-

324624



dos de hexitol. Ejemplos de emulsificadores son el mono-
laurato de poliexietilen (20) sorbitano (Tween 20, EHL
16,7), monopalmitato de polioxietilen (20) sorbitano -
(Tween 40, EHL 15,6), monoestearato de polioxietilen (20)
5 sorbitano (Tween 60, EHL 14,9), monooleato de polioxieti-
len (20) sorbitano (Tween 80, EHL 15), trioleato de poli-
oxietilen (20) sorbitano (Tween 85, EHL 11,0) y laurato -
de polioxietileno (8) (G, 2.127, EHL 12,8).

Cualquier aceite no tóxico de origen vegetal o
10 mineral compatible con el material antigeno puede ser uti-
lizado en las vacunas de este invento. Los aceites minera-
les de una calidad farmacéutica son especialmente preferi-
dos ya que en general producen una emulsión sustancialmente
más estable y menos irritación de los tejidos. Los aceites
15 de parafina líquidos ligeros (Bayol F y Drakeol nº 6 R) -
han producido emulsiones y vacunas satisfactorias.

Las vacunas del invento pueden ser preparadas -
por cualquiera de las técnicas conocidas en el género pa-
ra la preparación de emulsiones de materiales biológicos
20 y pueden ser preparadas en efecto por simple mezcla y -
agitación del antigeno acuoso, del aceite y de los emul-
sificadores. Esto se efectúa preferiblemente mezclando el
aceite con el emulsificador lipófilo, el antigeno acuoso
con el emulsificador hidrófilo, y combinando las fases -
25 de agua y de aceite. Se prefiere añadir la fase acuosa -
lentamente a la fase de aceite con agitación con el fin -
de hacer mínima cualquier tendencia a la formación de una
emulsión de aceite en agua. Una dispersión más fina de la
fase acuosa puede ser obtenida por homogeneización o mo-
30 lienda en un molino de coloides y esto se puede continuar
hasta que no aparece una nueva disminución en el tamaño de



las partículas. La inversión de la emulsión a una emulsión de aceite en agua o la rotura de la emulsión puede tener lugar si la agitación es prolongada o demasiado violenta.

5 La vacuna final debe ser estéril y no debe con-
tener ningún organismo indeseable que pueda contaminar el
material. Por esto es necesario esterilizar la vacuna des-
pués de la emulsificación o esterilizar los componentes
individuales previamente y emulsificar bajo condiciones
10 estériles. Se ha encontrado que las vacunas del presente
invento pueden ser esterilizadas por radiación gamma sin
ninguna pérdida de potencia o estabilidad. La esterili-
zación del producto final de esta manera evita la utili-
zación alternativa, bastante molesta, de calor y de fil-
15 tración para esterilizar los componentes. Si se utiliza
el último método, entonces el aceite puede ser esterili-
zado por calentamiento a 150°C durante 1 hora aproxima-
mente, o el aceite con emulsificador lipófilo añadido pue-
den ser hechos pasar a través de una bujía o filtro de -
20 porcelana de tamaño apropiado de poros. El emulsificador
hidrófilo puede ser esterilizado similarmente por calen-
tamiento en un autoclave durante aproximadamente 30 mi-
nutos a 1,05 kg de presión, y el antígeno acuoso por fil-
25 tración. Después de la esterilización, los componentes -
deberán ser dejados enfriar, cuando es necesario, y la -
mezcla de aceite y emulsificador lipófilo deberá ser in-
tróducida en un depósito esterilizado por vapor de agua.
El antígeno acuoso y el emulsificador hidrófilo son mez-
30 clados y lentamente introducidos en el depósito y la mez-
cla es agitada mecánicamente. Después de que se completa

324624



6 MAY 1966

la adición, toda la mezcla es hecha pasar a través de un emulsificador sónico y desde allí a un segundo depósito esterilizado. La vacuna final es entonces envasada en depósitos estériles y cerrados. Un agente preservador, por ejemplo thiomersal 1/10.000 es incluido inicialmente en la fase acuosa.

La proporción óptima de fase aceite a fase agua en una vacuna dependerá de una variedad de factores tales como la concentración de antígeno en la fase acuosa, la viscosidad deseada de la vacuna, y la antigenicidad del antígeno. La fase acuosa no pasa preferiblemente del 40% y no cae por debajo del 10% del volumen total de la emulsión. Una mayor proporción de agua es indeseable a causa del aumento en viscosidad y de inestabilidad de la emulsión, y una proporción de menos de 10% hace difícil incorporar suficiente antígeno sin tener un volumen de dosis inaceptablemente grande. Se ha encontrado que se obtienen vacunas satisfactorias cuando la fase acuosa comprende de 20 a 40% en volumen de toda la vacuna. Si se requiere una mayor proporción de agua, por ejemplo por encima de 40%, entonces se deben adoptar precauciones para evitar la formación de una emulsión de aceite en agua y la inestabilidad de la emulsión. Se ha encontrado que tales emulsiones que contienen trioleato de polioxietileno (20) sorbitano, pueden ser estabilizadas por la adición de Falba -un estabilizador que contiene aceites de parafina de cera de abejas de diversas viscosidades y oxico-lesterinas extraídas de la lanolina.

La cantidad de emulsificador necesitado en las respectivas fases dependerá de una variedad de factores



y particularmente de los valores de EHL de los emulsificadores y de la elección del aceite, y se estima que de 2,5 a 15% de un emulsificador lipófilo y de 1,0 a 10,0% de un emulsificador hidrófilo en las fases respectivas proporcionarán vacunas de las propiedades aquí descritas. Se ha obtenido un acrecentamiento considerable de la antigenicidad de los antígenos "Clostridiales" utilizando de 5 al 12% en volumen de la fase de aceite y de 3 a 7% en volumen de la fase de agua, como los respectivos emulsificadores.

10 La estabilidad en emulsión de las vacunas del presente invento fue ensayada manteniéndolas a la temperatura ambiente (aproximadamente 16°), 37° y 50°C. Las vacunas mantenidas a la temperatura ambiente no mostraron signos de estroperarse o de inestabilidad de la emulsión después de un almacenamiento durante 2 años. Las mantenidas a 37°C mantenían generalmente una emulsión estable durante aproximadamente 3 ó 4 meses, pero algunas "se rompieron" después de dos meses de almacenamiento. Las emulsiones de vacunas mantenidas a 50°C se "rompen" generalmente después de un mes de almacenamiento.

25 Ejemplos de la preparación de vacunas preparadas de acuerdo con el presente invento están descritos al final de esta memoria. La antigenicidad de estas vacunas fue comparada con vacunas que contenían una emulsión del tipo Freund de los mismos antígenos.

30 La vacuna contra "el riñón pulposo" descrita en el ejemplo 1 fue comparada con una vacuna contra el riñón pulposo preparada emulsificando 70 ml de fase de aceite (consistente en 10% v/v de Arlacel A en Bayol F) con 30

324624

6 MAY



ml de filtrado con toxóides "Clostridium perfringens" tipo D, diluído de forma que la concentración en epsilon-toxóides en la emulsión final era de 30 unidades internacionales/ml. Cada una de estas vacunas fue utilizada para inmunizar grupos de conejos, recibiendo cada animal una única dosis subcutánea de 1 ml de una vacuna. Después de un mes, los conejos fueron desangrados y los sueros fueron reunidos o mezclados. La concentración de epsilon-antitoxina de la vacuna del ejemplo 1 era de 15 unidades internacionales/ml y la de la vacuna del tipo Freund era de 3,8 unidades internacionales/ml.

Las vacunas multicomponentes concentradas descritas en los ejemplos 5 a 8 fueron comparadas con una vacuna del tipo Freund que contenía la misma concentración de los mismos antígenos y preparada emulsificando 80 partes de una fase de aceite (consistente en 15% v/v de Arlacel A y 5% v/v de Falba en Bayol R) con 20 partes de una mezcla de toxóides concentrados de "Clostridium perfringens" tipos B, C y D, "Clostridium septicum", "Clostridium oedematiens" tipo B, y "Clostridium tetani", y un anacultivo concentrado de "Clostridium chauvoei". Estas vacunas fueron inyectadas en conejos y cobayas, recibiendo cada animal dos dosis subcutáneas de 1 ml separando 28 días la segunda inyección de la primera. Se obtuvieron concentraciones de anticuerpos - ensayando muestras mezcladas de sueros obtenidos de los animales 12 a 14 días después de la segunda inyección. La antigenicidad del componente de "Clostridium chauvoei" fue medida inmunizando grupos de cobayas inmunizados, con un cultivo virulento de "Clostridium chauvoei" 14 días después de la segunda inyección. Los resultados se muestran en la tabla I

324624

6 MAY



en la cual se observa que se obtuvo una respuesta anticuerpo mucho mayor o una mayor protección con las vacunas del presente invento que con la vacuna del tipo Freund.

5 Las vacunas multicomponentes no concentradas descritas en los ejemplos 9 a 11 fueron comparadas también con una vacuna del tipo Freund que contenía la misma concentración de los mismos antígenos y preparada emulsificando 70 partes de fase de aceite (consistente en 10% v/v de Arlacel A en Bayol F) con 30 partes de filtrados no concentrados de
10 toxoides de "Clostridium perfringens" tipo D y "Clostridium septicum" anacultivos no concentrados de "Clostridium perfringens" tipos B y C, "Clostridium oedematiens" tipo E y "Clostridium chauvoei", y toxoides de tétanos concentrados. La antigenicidad de la anterior vacuna y de las descritas -
15 en los ejemplos 9 a 11 fueron ensayadas de la manera descrita anteriormente para las vacunas concentradas multicomponentes. Los resultados dados en la tabla II muestran que cada una de las vacunas preparadas de acuerdo con el presente invento estimuló una mayor concentración de anticuerpos o
20 proporcionó una mayor protección que la vacuna del tipo Freund.



324624

T A B I A I

La respuesta de conejos y cobayas a vacunas clostridiales multicomponentes concentradas

Concentraciones de suero en unidades internacionales por ml

Vacuna	Clostridium perfringens		Clostridium tetani		Clostridium oedematiens		Clostridium septicum		Número total de supervivientes de 6 cobayas inmunizados con "Cl. Clostridiales"		
	beta antitoxina	epsilon antitoxina	beta antitoxina	epsilon antitoxina	Tipo B alfa antitoxina	conejos cobayas	conejos cobayas	conejos cobayas			
Tipo Freund	21	63	30-45	20-30	20	45-70	10-20	100-200	2-5	2,3	2
Ejemplo 5	85	210	45-70	45-70	70-100	150	50-100	200-500	42,5	7,5	5
Ejemplo 6	95	135	70-100	30	45-70	100-150	100	200-500	28,5	4,5	6
Ejemplo 7	127	190	100-150	15-20	70	100	100	100-200	38	2,9	6
Ejemplo 8	48	142	45-70	20-30	70	100-150	10-20	200-500	14,3	6,9	6

T A B I A II

La respuesta de conejos y cobayas a vacunas clostridiales multicomponentes no concentradas

Concentraciones de suero en unidades internacionales por ml

Vacuna	Clostridium perfringens		Clostridium tetani		Clostridium oedematiens		Clostridium septicum		Número total de supervivientes de 6 cobayas inmunizados con "Cl. Clostridiales"		
	Beta antitoxina	epsilon antitoxina	Beta antitoxina	epsilon antitoxina	Tipo B alfa antitoxina	conejos cobayas	conejos cobayas	conejos cobayas			
Tipo Freund	9,5	31,5	30-45	4,5	30	150	2	20-50	4,0	0,63	5
Ejemplo 9	32	58	70-100	15-20	45	70-100	10-20	100	9,5	1,7	6
Ejemplo 10	34,5	57,5	45-70	10-15	45	100-150	10-20	100	15,8	1,3	6
Ejemplo 11	34,5	53	30-45	20-30	20-30	45	5-10	20-50	7,5	1,7	6

15 Bis

1

T A B L A I

La respuesta de conejos y cobayas a vacunas clostridiales m

Concentraciones de suero en unidades internac

Vacuna	<u>Clostridium perfringens</u>				<u>Clostridium tetani</u>		Clos
	beta		epsilon		antitoxina		
	antitoxina	antitoxina	antitoxina	antitoxina	antitoxina	antitoxina	
	conejos	cobayas	conejos	cobayas	conejos	cobay	
Tipo Freund	21	63	30-45	20-30	20	45-70	1
Ejemplo 5	85	210	45-70	45-70	70-100	150	5
Ejemplo 6	95	135	70-100	30n	45-70	100-150	
Ejemplo 7	127	190	100-150	15-20	70	100	
Ejemplo 8	48	142	45-70	20-30	70	100-150	1

T A B L A II

La respuesta de conejos y cobayas a vacunas clostridiales

Concentraciones de suero en unidades internac

Vacuna	<u>Clostridium perfringens</u>				<u>Clostridium tetani</u>		Clostrid Tipo
	Beta		epsilon		antitoxina		
	antitoxina	antitoxina	antitoxina	antitoxina	antitoxina	antitoxina	
	Conejos	cobayas	conejos	cobayas	conejos	cobayas	conej
Tipo Freund	9,5	31,5	30-45	4,5	30	150	2
Ejemplo 9	32	58	70-100	15-20	45	70-100	10-2
Ejemplo 10	34,5	57,5	45-70	10-15	45	100-150	10-2
Ejemplo 11	34,5	53	30-45	20-30	20-30	45	5-1

324624



A I

estrídianes multicomponentes concentradas

Unidades internacionales por ml

Dosis	<u>Clostridium oedematiens</u>		<u>Clostridium septicum</u>		Número total de supervivientes de 6 cobayas inmunizados con "Cl. Chauvoei"
	Tipo B alfa anti-toxina		antitoxina		
	conejos	cobayas	conejos	cobayas	
5-70	10-20	100-200	2-5	2,3	2
150	50-100	200-500	42,5	7,5	5
0-150	100	200-500	28,5	4,5	6
100	100	100-200	38	2,9	6
0-150	10-20	200-500	14,3	6,9	6

A II

lostridiales multicomponentes no concentradas

Unidades internacionales por ml

Dosis	<u>Clostridium oedematiens</u>		<u>Clostridium septicum</u>		Número total de supervivientes de 6 cobayas inmunizados con "Cl. Chauvoei"
	Tipo B alfa-anti-toxina		antitoxina		
	conejos	cobayas	conejos	cobayas	
150	2	20-50	4,0	0,63	5
0-100	10-20	100	9,5	1,7	6
0-150	10-20	100	15,8	1,3	6
5	5-10	20-50	7,5	1,7	6

15 Bis

324624



Los siguientes son ejemplos del invento en los que todas las partes están en volumen. Se incluyó etilmercuritiosalicilato sódico (Thiomeral) en una concentración de 1/10.000 en la fase acuosa de cada una de las siguientes preparaciones de vacuna, como agente conservador.

Ejemplo 1 - Vacuna contra el riñón pulposo. Una cepa toxigénica de "Clostridium perfringens" tipo D fue cultivada en un medio líquido bajo condiciones para asegurar una producción adecuada de epsilon-toxina y/o de prototoxina. El cultivo fue tratado con formaldehído para convertir la epsilon toxina y la prototoxina en epsilon-toxóides y hacer al producto no tóxico para los ratones. Las bacterias fueron separadas y el filtrado fue entonces diluido para proporcionar una preparación de antígeno acuosa que contenía epsilon-toxóide de "Clostridium perfringens".

A una mezcla de 63 partes de Bayol F y 7 partes de Arlacel A se añadió lentamente con agitación constante una mezcla de 30 partes de filtrado con toxóides "Cl. perfringens" anterior y 1,5 partes de Tween 80. Se continuó la agitación durante otros 2 minutos después que se completó el mezclado. La emulsión contenía 20 unidades de epsilon-toxoide por ml. Esta preparación satisfacía las exigencias del "British Veterinary Codex" en lo que se refiere a la seguridad, esterilidad y exención de toxicidad anormal.

Ejemplo 2 - Vacuna contra la disentería de corderos/riñón pulposo. Una cepa toxigénica de "clostridium perfringens" tipo B fue cultivada en un medio líquido para asegurar una producción adecuada de beta-toxina y epsilon-toxina y/o pro



totoxina. El cultivo fue tratado con formaldehído hasta -
que el producto era estéril y no tóxico para los ratones.
Las bacterias fueron retiradas para proporcionar una pre-
paración acuosa que contenía beta- y epsilon-toxoides de
5 "Clostridium perfringens" (vacuna contra la disentería de
cordero).

Una cepa toxigénica de "Clostridium perfringens"
tipo C fue cultivada en un medio líquido para asegurar la
producción adecuada de beta-toxina. El cultivo fue tratado
10 con formaldehído hasta que el producto era estéril y no -
tóxico para los ratones. Las bacterias fueron retiradas pa-
ra proporcionar una preparación acuosa que contenía beta-
toxóides de "Clostridium perfringens" (vacuna contra la
enterotoxemia).

15 Cada una de estas preparaciones acuosas, y también
una preparación acuosa de epsilon-toxoide de "Cl. perfringens
preparada de la manera descrita en el ejemplo 1, fue concen-
trada por precipitación con sulfato amónico, dispersando el
precipitado así formado en agua y dializando para separar
20 al sulfato amónico.

Una mezcla, 19 partes, de estas preparaciones con-
centradas derivadas de "Clostridium perfringens" de los ti -
pos B, C y D fue mezclada entonces con 1 parte de Tween 80,
y la mezcla fue añadida lentamente a una mezcla de 72 partes
25 de Bayol F y 8 partes de Arlacel A, con una agitación cons -
tante para producir una emulsión.

La potencia de esta vacuna fue ensayada por el mé-
todo prescrito por el "British Veterinary Codex" para las -
vacunas contra la disentería del cordero y el riñón pulposo.
30 Las concentraciones fueron de 75 unidades internacionales/ml

324624

6 MAY



de beta-antitoxina y de 85 unidades internacionales/ml de epsilon-antitoxina. La vacuna satisfizo las exigencias del "British Veterinary Codex" con referencia a la inocuidad - esterilidad y exención de toxicidad anormal.

5 Ejemplo 3 - Vacuna contra las fiebres carbunculares y la morriña negra. Una cepa toxigénica de "Clostridium septicum" fue cultivada en un medio líquido bajo condiciones para asegurar una producción adecuada de toxinas. El cultivo fue tratado entonces con formaldehído hasta que el producto era estéril y no tóxico para los ratones. Las bacterias fueron retiradas y el filtrado fue concentrado de la manera descrita en el ejemplo 2 para dar una preparación concentrada acuosa de toxóide de "Clostridium septicum" (vacuna contra la fiebre carbuncular).

15 Una cepa toxigénica de "Clostridium chauvoei" fue cultivada en un medio líquido bajo condiciones para asegurar una producción adecuada de toxinas. El cultivo fue tratado entonces con formaldehído hasta que el producto era estéril y no tóxico para los ratones, con el fin de proporcionar un anacultivo acuoso de "Clostridium chauvoei" (vacuna contra la morriña negra).

Una mezcla, 19 partes, de estas dos preparaciones antígenas acuosas que contenía una parte de Tween 80 fue mezclada con una mezcla de 72 partes de Bayol F y 8 partes de Arlacel A, con agitación constante para producir una emulsión. La potencia de esta vacuna fue ensayada por el procedimiento del "British Veterinary Codex". Tenía 75 unidades internacionales/ml de antitoxina de "Clostridium Septicum" y satisfizo las exigencias para la potencia de "Clostridium chauvoei". La vacuna satisfizo las exigencias



del "British Veterinary Codex" con referencia a la inocuidad, esterilidad y exención de toxicidad anormal.

Ejemplo 4 - Vacuna contra el riñón pulposo / las fiebres carbunculares / la morriña negra / el tétano. Un filtrado

5 estéril de un cultivo de "Clostridium tetani" que contenía toxina de tétanos fue tratado con formaldehído a 37°C durante varias semanas y fue purificado entonces por ultrafiltración y precipitación con fosfato potásico para proporcionar una preparación acuosa de toxóides de tétanos.

10 Esta preparación acuosa fue mezclada con filtrados con toxóides concentrados acuosos preparados a partir de "Clostridium perfringens" tipo D y "Clostridium septicum" y un anacultivo de "Clostridium chauvoei", preparados cada uno de la manera antes descrita.

15 Esta preparación antigéna, 19 partes, con una parte de Tween 80 fue añadida a una mezcla de 72 partes de Bayol F y 8 partes de Arlacel A, con agitación constante para producir una emulsión.

20 La potencia de esta vacuna fue ensayada por el método prescrito por el "British Veterinary Codex" con respecto a todos los componentes excepto el tétanos. El ensayo de tétanos se llevó a cabo tal como se prescribe en la "British Pharmacopoeia" ya que no se especifica un procedimiento separado en el "British Veterinary Codex". Las concentraciones
25 fueron de 250 unidades internacionales/ml de epsilon antitoxina de "Clostridium perfringens", 19 unidades internacionales/ml de antitoxina "Clostridium septicum", y 200 unidades internacionales/ml de antitoxina de tétanos. El componente de "Clostridium chauvoei" pasó el ensayo establecido
30 para la vacuna de la morriña negra.

324624



Ejemplos 5 a 8 - Vacunas multicomponentes concentradas.

Una cepa toxigéna de "Clostridium oedematiens" tipo B fue cultivada en un medio líquido. El cultivo fue tratado entonces con formaldehído hasta que el producto era estéril y no tóxico. Las bacterias fueron retiradas por filtración y el filtrado fue concentrado por precipitación con sulfato amónico, dispersando el precipitado en agua y dializando para separar el sulfato amónico, para producir una preparación antigéna acuosa de alfa-toxóide de "Clostridium oedematiens". Esta preparación fue mezclada con toxóides acuosos concentrados derivados de "Clostridium perfringens" tipos B, C y D, "Clostridium septicum" y "Clostridium tetani" junto con un "clostridium chauvoei"; no concentrado, preparado cada uno de la precedente manera. Esta mezcla fue dividida en 4 porciones siendo mezclada cada porción de 19 partes con 1 parte de un emulsificador hidrófilo más abajo indicado para proporcionar una fase acuosa. Cada una de las cuatro fases acuosa fue emulsificada entonces de la manera indicada en los precedentes ejemplos con una fase de aceite que comprendía Bayol F (72 partes) y un emulsificador lipófilo (8 partes) abajo indicado.

Ejemplo	Emulsificador lipófilo en fase de aceite	Emulsificador hidrófilo en fase de agua
25 5	Arlacel A	Tween 80
6	Arlacel 80	Tween 80
7	Arlacel A	Tween 85
8	Arlacel 80	Tween 85.



Estas vacunas satisficieron las exigencias del "British Veterinary Codex" (y del "British Pharmacopoeia" con respecto al componente de tétanos) en lo que se refiere a la inocuidad, esterilidad y exención de toxicidad -
5 anormal.

Ejemplos 9 a 11 - Vacunas multicomponentes no concentradas.
Anacultivos no concentrados de "Clostridium perfringens" tipos B y C fueron preparados de la manera descrita en el ejemplo 2 excepto en que el cultivo no fue filtrado. Toxóides no concentrados de "Clostridium septicum" fueron pre-
10 parados de la manera descrita en el ejemplo 3 excepto en que el cultivo no fue concentrado. Un anacultivo no concentrado de "Clostridium oedematiens" fue preparado por el procedimiento descrito en los ejemplos 5 a 8 excepto en que
15 el cultivo no fue filtrado ni concentrado.

Una mezcla (28,5 partes) de toxóide de tétanos - concentrado (tal como se prepara en el ejemplo 4), de toxóides filtrados no concentrados de "Clostridium perfringens" tipo D (preparados como en el ejemplo 1), de toxóides fil-
20 trados no concentrados de "Clostridium septicum", y anacultivos no concentrados de "Clostridium perfringens" tipos B y C y de "Clostridium oedematiens" tipo B, fue mezclada con 1,5 partes de un emulsificador hidrófilo abajo indicado, y el total de esta fase acuosa fue dividido en tres
25 porciones. Cada porción fue mezclada entonces de la manera descrita en los precedentes ejemplos con una fase de aceite que comprendía 63 partes de Bayol F y 7 partes de Arla-cel A para producir una emulsión.

324624



<u>Ejemplo</u>	<u>Emulsificador en fase acuosa</u>
9	Tween 80
10	Tween 85
11	Tween 20.

5 Estas vacunas satisficieron las exigencias del "British Veterinary Codex" (y del "British Pharmacopoeia" con respecto al componente de tétanos) en lo que se refiere a la inocuidad, esterilidad y exención de toxicidad anormal.

10 Ejemplos 12 y 13 - Vacunas multicomponentes no concentradas.
Anacultivos no concentrados de "Clostridium perfringens" tipos B y C fueron preparados de la manera descrita en el ejemplo 2 excepto en que el cultivo no fue filtrado. Un toxóide no concentrado de "Clostridium septicum" fue preparado de -
15 la manera descrita en el ejemplo 3 excepto en que el cultivo no fue concentrado. Un anacultivo no concentrado de "Clostridium oedematiens" fue preparado por el procedimiento descrito en los ejemplos 5 a 8 excepto en que el cultivo
20 no fue filtrado ni concentrado.

Una mezcla (x partes) de toxóides de tétanos concentrados (tal como se preparan en el ejemplo 4), de toxóides filtrados no concentrados de "Clostridium perfringens" tipo D (tal como se prepara en el ejemplo 1), de toxóides
25 filtrados no concentrados de "Clostridium septicum", y de anacultivos no concentrados de "Clostridium perfringens" tipos B y C y de "Clostridium oedematiens" tipo B, fue mezclada con y partes de un emulsificador hidrófilo abajo indicado, y el total de esta fase acuosa fue dividido en 2
30 porciones. Cada porción fue mezclada entonces de la manera

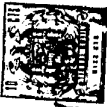
6 MAY 1954

descrita en los precedentes ejemplos, con una fase de aceite que comprendía 63 partes de Bayol F y 7 partes de Arlacel A.

	<u>Ejemplo</u>	<u>Emulsificador hidrófilo</u> (y partes)	<u>Mezcla antigéna</u> (x partes)
5	12	1,5 partes de G 2127	28,5 partes
	13	0,3 partes de Tween 80	29,7 partes.

Cada una de estas vacunas fue inyectada en conejos y cobayas recibiendo cada animal 2 dosis subcutáneas de 2 ml a intervalos de 3 semanas. Los valores de anticuerpos fueron obtenidos ensayando muestras reunidas de suero obtenidas de los animales 21 días después de la segunda inyección. La antigenicidad del componente de "Clostridium chauvoei" fue medida inmunizando grupos de cobayas inmunizados con un cultivo virulento de "Clostridium chauvoei" 14 días después de la segunda inyección. Los resultados se muestran en la Tabla III .

Estas vacunas satisficieron las exigencias del "British Veterinary Codex" (y del "Britixh Pharmacopoeia" con respecto al componente de tétanos) en lo que se refiere a la inocuidad, esterilidad y exención de toxicidad anormal.



6 MAY

324624

T A B L A III

La respuesta de conejos y cobayas a vacunas clostridianas multicomponentes no concentradas.

Concentraciones de suero en unidades internacionales por ml.

Vacuna	<u>Clostridium perfringens</u>		<u>Clostridium tetani</u>		<u>Clostridium edematiens</u>		<u>Clostridium septicum</u>		Número total de super- viviotes de 6 cobayas inmunizados con "Cl. C. auvoei".		
	beta antitoxina	epsilon antitoxina	antitoxina	antitoxina	Tipo B alfa anti- toxina	Antitoxina	Antitoxina	Antitoxina			
	Conejos	cobayas	conejos	cobayas	conejos	cobayas	conejos	cobayas			
Ejemplo 12	7,5	28,5	45	20-30	20-30	100-150	5-10	1-2	348	< 0,45	6
Ejemplo 13	27	-	45-70	-	-	70-100	-	50-100	6,25	-	6

24 B-2

T A B L A III

La respuesta de conejos y cabayas a vacunas crostric

Concentraciones de suero en unidades internacio

Vacuna	<u>Clostridium perfringens</u>		<u>Clostridium tetani</u>		<u>Clo:</u> 5 cc	
	beta		epsilon			
	antitoxina	antitoxina	antitoxina	antitoxina		
	Conejos	cobayas	conejos	cobayas	conejos	cobayas
Ejemplo 12	7,5	28,5	45	20-30	20-30	100-150
Ejemplo 13	27	-	45-70	-	-	70-100



6 MAY

III

324624

mas crostridianas multicomponentes no concentradas.

s internacionales por ml.

<u>si</u>	<u>Clostridium eedematiens</u>		<u>Clostridium septicum</u>		Número total de super- vivientes de 6 cobayas inmunizados con "Cl. Chauvoei".
	Tipo B alfa anti- toxina		Antitoxina		
<u>cobayas</u>	<u>conejos</u>	<u>cobayas</u>	<u>conejos</u>	<u>cobayas</u>	
-150	5-10	1-2	3,8	< 0,45	6
-100	-	50-100	6,25	-	6

24 Pts

324624 24



La presente solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, con fecha 25 de Marzo de 1965, bajo el Nº 12726/65, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

- 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:

10

1.- Un método para preparar una composición de vacuna inyectable, que comprende material antigénico acuoso derivado de al menos una especie patógena de clostridio, un aceite, un emulsificante lipófilo, y un emulsificante hidrófilo, caracterizado porque se emulsionan un material antigénico acuoso, un aceite, un emulsificante lipófilo y un emulsificante hidrófilo para suministrar una emulsión agua en aceite.

15

2.- Un método como se reivindica en el punto 1, caracterizado porque el emulsificante lipófilo se mezcla con el aceite, y el emulsificante hidrófilo se mezcla con el material antigénico acuoso, antes de la emulsificación.

20

3.- Un método como se reivindica en el punto 2, caracterizado porque la mezcla antigénico acuoso/emulsificante hidrófilo es añadida a la mezcla aceite/emulsificante lipófilo y la preparación total es emulsificada.

25

4.- Un método para preparar una composición de vacuna inyectable que comprende material antigénico acuoso

15.11.66

- 25 -

324624



derivado de al menos una especie patógena de clostridio,
un aceite, un emulsificante lipófilo y un emulsificante
hidrófilo, siendo la preparación una emulsión estable,
aceptable parenteralmente de una fase antigénica acuosa -
5 dispersa en una fase de aceite continua.

5.- Un método para preparar una composición de
vacuna como se reivindica en el punto 4, en el cual el
aceite es un aceite mineral.

6.- Un método para preparar una composición de
10 vacuna como se reivindica en el punto 4, en el cual la
fase acuosa comprende desde 10 a 40% del volumen de la
preparación.

7.- Un método para preparar una composición de
vacuna como se reivindica en el punto 4 en el cual los -
15 emulsificantes hidrófilos y lipófilos son no iónicos.

8.- Un método para preparar una composición de
vacuna como se reivindica en el punto 4, en el cual el -
emulsificante hidrófilo tiene un valor EHL de 11 a 18 y
constituye de 3 a 7% en volumen de la fase acuosa, y el
20 emulsificante lipófilo tiene un valor EHL de 2 a 6 y cons-
tituye 5 a 12% en volumen de la fase de aceite.

9.- Un método para preparar una composición de
vacuna como se reivindica en el punto 4, en el cual el
emulsificante hidrófilo es un derivado de polioxietileno
25 de un ácido graso de hexitol y el emulsificante lipófilo
es un éster de un ácido graso con un anhídrido de hexitol.

10.- Un método para preparar una composición de
vacuna como se reivindica en el punto 4, en el cual el -
emulsificante hidrófilo es elegido de la clase que con -
30 siste en monooleato de polioxietileno (20) sorbitan y tri-

324624 24



oleato de polioxietilen (20) sorbitán y el emulsificante lipófilo es elegido de la clase que consiste en monooleato de mannida y monooleato de sorbitán.

5 11.- Un método para preparar una composición de vacuna como se reivindica en el punto 4, en el cual el material antigénico se deriva de al menos una especie de la clase que consiste en Cl. oedematiens, Cl. septicum, Cl. chauvoei, Cl. tetani, Cl. perfringens, tipo B, Cl. perfringens Tipo C, y Cl. perfringens Tipo D.

10 12.- Un método para preparar una composición de vacuna inyectable.

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

15 La presente Memoria consta de veintisiete hojas, escritas a máquina por una sola cara.

24 NOV. 1966

Madrid,

Alberto de Elzaburu
Por Poderes