

PATENTE DE INVENCION

Le A 11 608

356968

Memoria Descriptiva

sobre:

X "Procedimiento para la obtención de una vacuna combinada contra la peste porcina y enfermedades bacterianas en los cerdos".

Solicitante: FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad alemana, residente en Leverkusen-Bayerwerk, Alemania.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una vacuna con la que los cerdos, de cualquier edad, lo más pronto, sin embargo una semana después del destete, así como cerdas gestantes, con excepción de la primera y la última

5.



semana de la gestación, se pueden inmunizar preventivamente contra la peste porcina clásica e infecciones por bacterias patógenos.

- Es sabido que muy frecuentemente como consecuencia de una infección de los cerdos con el virus de la peste porcina se presentan enfermedades secundarias por los gérmenes de la Salmonella y Pasteurella. Asimismo, se presenta muy frecuentemente una enfermedad por uno solo de estos patógenos, por ejemplo el paratífus de los cochinitos o la septicemia hemorrágica. Estas infecciones producen unos síntomas de enfermedad muy graves que en muchos casos conducen en breve tiempo a la muerte de los animales atacados. Con especial gravedad repercuten estas enfermedades en los animales jóvenes que también son atacados con relativamente más frecuencia por las mismas. Por esta razón es costumbre el inmunizar los cochinitos pocas semanas después de su nacimiento con vacunas contra estos agentes patógenos. La práctica hasta ahora empleada tiene, además de los costos más elevados, la desventaja de que entre las distintas inyecciones ha de transcurrir un periodo de varias semanas para que las vacunaciones puedan conducir a un desarrollo protector. En la mayoría de las bacterinas usuales (Vacunas contra los agentes patógenos bacteriales), no se efectúa una concentración de las bacterias, de manera que la vacunación por regla general se ha de repetir después de algunas semanas. Debido al contenido en proteínas del caldo de cultivo, que se necesita para el cultivo de las bacterias, se presentan bajo circunstancias reaccio
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



nes alérgicas. El transporte o envío de estas vacunas y su empleo se ha de efectuar, teniendo en consideración la inestabilidad de las soluciones a las altas temperaturas, en margenes de temperatura comprendidos entre $+4$ y $+8^{\circ}$.

5.

La invención se refiere a un procedimiento para la obtención de una vacuna combinada que elimina estas desventajas. El material inyectable se presenta en forma liofilizada, de manera que se logra una capacidad de almacenamiento de, como mínimo, 1 1/2 años, siendo para ello suficiente temperaturas de almacenamiento inferiores a $+18^{\circ}$. El sobre pasar ocasionalmente durante breve tiempo estas condiciones hasta unos 35° no perjudica. Después de disolver el

10.

material liofilizado en el disolvente que se suministra, que contiene una adyuvante para reforzar el efecto inmunizante del componente bacterial, se administran los antígenos en una inyección, de manera que en el inyectable se desarrolla simultáneamente la protección contra los distintos agentes patógenos. Mediante el procedimiento de obtención especial se puede ajustar la concentración del antígeno bacterial a un valor óptimo, de manera que en combinación con el adyuvante incluido en una sola inyección se logra un efecto protector muy bueno. La acetona empleada para la inactivación de las bacterias se retira de nuevo totalmente antes de la liofilización. De esta manera se suprimen todos los efectos secundarios del agente inactivador que produce una disminución lentamente progresiva de las propiedades inmunizantes.

15.

20.

25.

30.



La preparación de la vacuna según la presente invención se efectúa en tres etapas: 1) Preparación de los antígenos, 2) Mezcla de los antígenos y liofilización bajo adición de una solución de estabilizador, 3) Preparación del disolvente con un contenido en adyuvante.

1) Como antígeno para combatir la peste porcina clásica sirve una cepa de virus de la peste porcina especialmente atenuada cuya producción para su empleo como vacuna viviente esta protegida por las patentes españolas nº 347.294 y 347.295. Las cepas de bacterias son unos gérmenes patógenos especiales, aislados en los brotes de la enfermedad, que se multiplican en los caldos de cultivo usuales y que, después de alcanzar la concentración de bacterias óptima se precipitan con acetona a $+4^{\circ}$. Las bacterias se agitan hasta su total inactivación a $+4^{\circ}$ en la suspensión acetónica y a continuación se secan.

2). En las soluciones del virus de la peste porcina, que se obtuvieron en cultivos de células, se determina el contenido en virus mediante titulación del efecto protector en los cerdos y mezclandolas con una solución estabilizadora, que contiene carbohidratos y proteínas, se diluye de manera que en cada carga de producción por dosis de inyección de la vacuna terminada esté contenida la misma cantidad de virus de por ejemplo 800 UMP.

Un UMP (unidad minima protectora) es la cantidad de virus más pequeña que, al ser inyectada en los cerdos protege aún a todos los cerdos contra una infección de



ensayo con virus de la peste porcina virulente.

- En esta solución se reparte homogéneamente tanto polvo seco de bacterias de manera que en la vacuna terminada esté contenido el número deseado de bacterias por dosis inyectable, por ejemplo 20×10^9 bacterias por dosis inyectable. La proporción de las clases de bacterias entre sí, se puede graduar arbitrariamente, por ejemplo 60% de *Salmonella choleraesuis* y 40% de *Pasteurella multocida*. La mezcla se llena en las botellas de liofilización usuales y se liofiliza.
- 5.
- 10.

- 3) Como adyuvante se emplea, por ejemplo, alginato sódico, cuyo peso molecular se seleccionó de manera que una solución al 3% del mismo en agua destilada se pueda aspirar sin dificultad alguna en una jeringuilla de inyección con cánulo del nº 18, se disuelve al 3% junto con 0,4% de gluconato de calcio en agua destilada, el valor pH se ajusta mediante adición de solución tampón a un pH de 7,6 y mediante calentamiento en el autoclave se esteriliza.
- 15.
- 20.

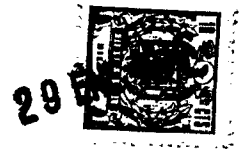
- La vacuna lista para su uso se prepara agregando, con una jeringuilla de inyección adecuada, la cantidad de disolvente que se acompaña en cada caso al material liofilizado. Agitando se obtiene una mezcla homogénea de las sustancias. De esta suspensión se inyectan por cerdo 2 cc de subcutánea o intramuscularmente.
- 25.

Los siguientes ejemplos explican la invención con más detalle:

30. La cepa de virus atenuada de la peste porci-



- na clásica se multiplica según el procedimiento de la patente española nº 347.294. El contenido en virus de la solución así obtenida se determina por titulación en el cerdo. En una dilución de 1:10.000 están aún protegidos todos los 4 cerdos que se vacunaron con esta
5. dilución. Debido a este resultado se diluye el virus en dos partes de solución de estabilizador. A 5 litros de esta suspensión se le agregan 1,0 de polvo seco de bacterias. Este producto se compone de 0,6 de *Salmonella choleraesuis* y 0,4 g de *Pastourella multocida*.
10. Las bacterias se mezclan homogencamente con la solución del virus, se reparte la mezcla en botellas de liofilización y después de congelar a -40° se seca en vacío. En 40 litros de agua destilada se disuelven 1.200 g de alginato sódico y 200 g de gluconato de calcio y mediante
15. adición de una solución tampón de fosfato 0,5 M se ajusta a un pH de 7,6. La mezcla se calienta durante 15 minutos a 115° en el autoclave. Después de enfriar la solución, se separa por centrifugación el precipitado y la parte superior débilmente opalescente se llena
20. en botellas con cada vez 10 cc según el disolvente para cinco dosis de inyectable y después de cerrar las botellas se esteriliza.
- El contenido de una botella con vacuna lio-
25. filizada, lo que corresponde a cinco dosis de inyectable, se mezcla con 10 cc de disolvente. De esta vacuna se inyectan intramuscularmente cada vez 2 cc sin diluir, 1:100 y 1:400 diluidas con solución de sal fisiológica, a cada vez 4 cerdos. Tres semanas más tarde reciben los
30. cerdos una inyección de 2 cc de la sangre de cerdos que



- habían sido desangrados 5 días después de la infección con una cepa de virus de la peste porcina altamente patógena. Los animales vacunados con la inyección sin diluir y diluida en un 1:100 se mantuvieron
- 5 totalmente sanos. Los animales vacunados con 1:400 mostraron del 4º al 7º día después de la inyección una subida de la temperatura hasta 40,9º sin ulteriores reacciones. Otra parte de la vacuna se inyecta intraperitonealmente cada vez con 0,2 cc a 2 x 10 ratones. 21 días más tarde reciben 10 de los ratones
10. una inyección intraperitoneal de 5×10^8 de Salmonella, los otros 10 una inyección de 5×10^8 de Pasteurella. Con el mismo número de bacterias se inyectan por cc. a de bacterias 10 ratones que no estaban vacunados. Todos los animales no vacunados se murieron en
15. el plazo de 3 días con los síntomas típicos de la Salmonellosis o bien Pasteurellosis, de los animales vacunados sobrevivieron después de 7 días 9 de 10 la infección con Salmonella y 3 de 10 la infección con Pasteurella.
- 20.

N O T A

- 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
25. de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Alemania con el nº
- de 4 de julio de 1.968, accogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los
- 30.

29 ENE 1970

Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento, y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA VACUNA COMBINADA CONTRA LA PESTE PORCINA Y ENFERMEDADES BACTERIANAS EN LOS CERDOS", caracterizándose por lo siguiente:

5. 1.- Procedimiento para la obtención de una vacuna combinada contra la peste porcina y enfermedades bacterianas en los cerdos, caracterizado porque una solución del virus de la peste porcina que se hizo adecuada mediante atenuación para la vacunación de cerdos, se mezcla con una solución de estabilizador y con un polvo seco de bacterias inactivadas que se precipitan del caldo de cultivo, la mezcla se estabiliza mediante secado por congelación y antes de su aplicación por inyección, se diluye en un disolvente que contiene un adyuvante para reforzar el efecto inmunizante.

10. 2.- Procedimiento para la obtención de una vacuna combinada contra la peste porcina y enfermedades bacterianas en los cerdos", tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

15. Esta memoria consta de ocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

20. Madrid, 29 ENE. 1970

FABRIK FÜR ANTIKONGESAMLSCHAFT,

A. GOMEZ ACEBO Y MODEI
Firmado: F. Hernández Ruiz