

421094

421094



240

P.- 55.912

GT/nv-B/8872  
Case 1/Spain

F.C-26-9-75

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl. C12k
---------------

para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPANA por 20 años

a nombre de RECHERCHE ET INDUSTRIE THERAPEUTIQUES, R.I.T.

entidad belga

establecida en Rue du Tilleul, 13, B-1320 Genval, Bélgica.

por: "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA VACUNA PARA LA CLIBACILOSIS DE LECHONES"

(Clase International C12k)

15.12.73.

1421094



La presente invención se refiere a nuevas vacunas para la colibacilosis, más en particular a vacunas contra la colibacilosis de lechones.

5 La colibacilosis neonatal del cerdo es una causa importante de muerte de lechones, y se han hecho numerosos intentos de controlar esta enfermedad inmunizando activamente a la madre contra Escherichia coli (E. coli) ya sea mediante vacunas muertas o vivas, o dando a los cerdos antisuero de E. coli.

10 La inmunización activa de las cerdas ha sido efectuada por administración parenteral de vacunas de E. coli (véase, por ejemplo, M.R. Wilson y J. Svendsen, Amer. J. Vet. Res. 32, 1971, 891-898), pero estos intentos de profilaxis basados en inmunidad antibacteriana han dado resultados inconsistentes y generalmente no satisfactorios, debido a que la cepa o cepas de E. coli usadas para inmunización pueden generar solo anticuerpos específicos, mientras que puede haber varias y diferentes cepas asociadas con un brote dado. Incluso aunque se obtuviese en algunos casos una protección buena, estaba restringida a aquellos serotipos de E. coli presentes en la vacuna.

25 La administración de antisuero (véase, por ejemplo, O.P. Miniats, Can. Vet. J. 11, 1970, 52-56) no puede constituir un medio profiláctico práctico contra  
15.12.73.



421094



en administrar a las cerdas, y con un coadyuvante, una  
preparación de enterotoxina de E. coli térmicamente  
lábil (LT) aislada de un cultivo de un serotipo entero  
patógeno de E. coli. Tal serotipo enteropatógeno de E.  
5 coli ha sido depositado en la Colección Americana de  
Cultivos Tipo, Rockville, Maryland, EE.UU., donde reci  
bió el número de acceso 21.972.

Según la invención, se administra a cer  
das preñadas, por vía intramuscular o subcutánea, una  
10 cantidad eficaz de la preparación de enterotoxina de  
E. coli térmicamente lábil (LT) con el coadyuvante. La  
unidad de dosificación es al menos 5 mg, y preferible  
mente de 10 a 150 mg, de extracto liofilizado.

El coadyuvante, cuyo papel es asegurar  
15 una alta respuesta de inmunización, puede ser cualquier  
producto o composición conocidos en la técnica por te  
ner efecto de coadyuvante en vacunas. Son ejemplos de  
coadyuvantes adecuados los geles de compuestos de alu  
minio tales como hidróxido de aluminio, fosfato de alu  
20 minio y Alhydrogel (marca registrada de un gel de hidró  
xido de aluminio manufacturado y vendido por Superfos  
Export Co., Copenhague, Dinamarca), y las emulsiones  
agua en aceite tales como coadyuvante 65 (emulsión agua  
en aceite de antígeno en aceite de cacahuete, emulsifi  
25 cado por adición de monooleato de mannida y estabiliza  
15.12.73.

421094



do por adición de monoestearato de aluminio), y coadyu-  
vante de Freund completo (emulsión agua en aceite de  
aceite mineral ligero emulsificado con monooleato de  
mannida y suplementado con Mycobacterium tuberculosis  
5 muertos).

La dicha preparación de enterotoxina de  
E. coli térmicamente lábil (LT) puede ser aislada de  
cualquier serotipo de E. coli susceptible de provocar  
la colibacilosis de lechones, y que contenga necesaria-  
10 mente enterotoxina de E. coli térmicamente lábil (LT).  
Un ejemplo de tal serotipo de E. coli es la cepa de E.  
coli ATCC 21.972.

Es bien conocido el método para aislar  
la enterotoxina de E. coli térmicamente lábil (LT). Ha  
15 sido descrito por Gyles y Barnum (J. Infect. Dis. 120,  
1969, 419-462), y algunas variaciones de este método  
han sido descritas, por ejemplo, por H.W. Smith y G.L.  
Gyles (J. Med. Microbiol. 3, 1970, 387-401), H.W. Smith  
y S. Halls (J. Path. Bact. 93, 1967, 531-543), y M.R.  
20 Wilson, G. Gyles y J. Svendsen (Can. J. Comp. Med. 35,  
1971, 294-297).

Cualquiera de estos métodos, así como  
cualquier otro equivalente conocido por los expertos en  
la técnica, puede ser usado con el fin de preparar la  
enterotoxina de E. coli térmicamente lábil (LT) aislada  
25

15.12.73.

421094



que se emplea en la presente invención.

La invención no requiere que se obtenga enterotoxina de E. coli térmicamente lábil (IT) pura, que se podría obtener eventualmente, por ejemplo ya  
5      fuese por electroforesis o ultracentrifugación con gra-  
diente de densidades, o adsorción/elución con dextranos reticulados hidrófilos tales como Sephadex (producto manufacturado y vendido por Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala 1, Suecia).

10      Esencialmente, la invención solo requiere que la enterotoxina sea liberada y separada de las célu-  
las de E. coli, y esté sustancialmente exenta de lipopo-  
lisacáridos.

15      Los siguientes ejemplos ilustran la pre-  
sente invención; no deben ser considerados como limita-  
tivos de su ámbito.

EJEMPLO 1

Medio de producción (sólido)

20      Se añade agua (10 litros) a 130 g de cal-  
do de Bacto-Tryptose y 150 g de Bacto-Agar (Bacto-Tryptose y Bacto-Agar son marcas registradas de productos ma-  
nufacturados y vendidos por Difco Laboratories, Detroit  
1, Michigan, EE.UU.). La mezcla es calentada con agita-  
ción hasta 121°C durante 60 minutos. Se disuelven vein-  
25      te g de Bacto-Dextrose (marca registrada de un producto

15.12.73.

421094



manufacturado y vendido por Difco Laboratories) en 20 ml de agua destilada, y se pasa la solución a través de un filtro esterilizador Millipore de 0,45 micras (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, EE.UU.). Luego se mezclan ambas preparaciones y se distribuyen porciones de 110 ml en matraces Roux de 500 centímetros cuadrados.

Preparación de siembra

La cepa ATCC 21972 de E. coli es rehidratada con solución salina estéril e incubada durante 18 horas a 37°C en placas Petri que contienen, cada una, 20 ml de medio sólido de triptosa-agar preparado mezclando 26 g de caldo Tryptose, 30 g de Agar Difco (caldo Tryptose y Agar Difco son productos manufacturados y vendidos por Difco Laboratories), hasta un litro con agua, siendo calentada la mezcla durante 45 minutos a 115°C.

Luego se prepara como sigue un medio de cultivo líquido (llamado FP<sub>3</sub>): se disuelven en un litro de agua a 60°C proteosa peptona nº 3 (producto manufacturado y vendido por Difco Labs), 30 g; extracto de levadura (4 g) y dextrosa (5 g). Tras enfriar se le añaden NaCl (5 g), NaHPO<sub>4</sub> (5,05 g) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2 g). El medio, cuyo pH es 6,9-7,0, es filtrado sobre filtro Seitz EKS y distribuido en matraces de cultivo de 100

25  
15.12.73.

421094



ml.

Estos matraces de cultivo son inoculados con las colonias suaves obtenidas en placas Petri, usando una colonia por 20 ml de medio líquido PP<sub>3</sub>, y son incubados durante seis horas a 37°C con agitación en estantes con balanceo (22 a 24 balanceos por minuto).

Producción de E. coli

Porciones de cuatro mililitros del cultivo de E. coli obtenido en medio líquido PP<sub>3</sub> (es decir, aproximadamente  $4 \cdot 10^9$  bacterias) son inoculadas en cada uno de unos matraces Roux de 500 centímetros cuadrados que contienen el medio de producción, los cuales son incubados luego durante un día a 37°C, con agitación en estantes con balanceo (22 a 24 balanceos por minuto).

Cada cultivo de células es recogido en 25 ml de agua destilada, y lo recogido de 15 matraces Roux (una serie) es mezclado en matraces de un litro. Se toma una muestra (1 ml) de cada serie para ensayar la pureza.

Por tanto, se siembran 0,5 ml en caldo de agar-triptosa en placas Petri, y se incuba durante siete días a 34°C, y la otra fracción de 0,5 ml es sembrada en placas Petri que contienen 20 ml de agar de dextrosa de Sabouraud, preparado disolviendo 65 g de agar de dextrosa de Sabouraud Difco (producto manufacturado y vendido por Difco Laboratories) en un litro de agua

25  
15.12.73.

421094



destilada caliente y esterilizado adicionalmente, y los cultivos son incubados durante siete días a 22°C.

5 Las recolecciones son suplementadas con una solución estéril acuosa de sulfato de neomicina al uno por ciento (1,2 ml de solución de sulfato de neomicina por 100 ml de recolección), y las células son rotas sometiendo el medio a sonido durante 30 minutos en un aparato de sonidos Branson Europa modelo J 22 (Branson Europa N.V., Soest, Holanda), estando mantenido el medio  
10 en un baño de hielo en fusión.

Tras rotura de las células, la suspensión es centrifugada durante dos horas a 2550 r.p.m. a la temperatura de 5°C, para eliminar los residuos de células.

15 El fluido que sobrenada es pasado sucesivamente a través de un filtro clarificador y a través de un filtro esterilizador Millipore de 0,45 micras (Millipore es marca registrada de Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, EE.UU.).

20 Se añade al filtrado sulfato amónico previamente esterilizado por óxido de etileno, hasta alcanzar 50% de saturación (380 g de sulfato amónico por litro de filtrado), y se deja reposar la mezcla tres horas a temperatura ambiente. El precipitado obtenido es  
25 centrifugado durante dos horas a 2550 r.p.m. a una tem-

15.12.73.

421094



peratura de 5°C.

El sedimento es vertido en una bolsa de celofán y dializado contra agua corriente, hasta que la concentración de sulfato amónico disminuye entre 0,1 y 0,01%, siendo ensayado el contenido de sulfato amónico con el reactivo de Nessler.

La preparación de enterotoxina es esterilizada por paso a través de un filtro esterilizador Millipore de 0,45 micras (Millipore es marca registrada de Millipore Corporation), y liofilizada.

#### EJEMPLO 2

Una porción de un g de la preparación de enterotoxina liofilizada obtenida al final del ejemplo 1 es hidratada de nuevo añadiéndole 20 ml de una solución salina estéril de tampón fosfato (pH 7,4) consistente en NaCl (8 g), KCl (2 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (11,5 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (1,325 g), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1 g) y agua destilada (10 l).

La vacuna obtenida es mezclada a fondo en estado estéril con 20 ml de coadyuvante completo de Freund estéril (es decir, una emulsión agua en aceite de aceite mineral ligero emulsificado con monooleato de mannida y suplementado con Mycobacterium tuberculosis muertos), y la vacuna con coadyuvante así obtenida es distribuída en viales de cuatro ml que son cerrados her

25  
15.12.73.

421094



méticamente o tapados fuertemente, para obtener una cantidad de enterotoxina (LT) correspondiente a 100 mg de preparación liofilizada, por vial.

5 El contenido de cada vial corresponde a una unidad de dosificación de vacuna. La vacuna es administrada a cerdas preñadas por vía intramuscular o subcutánea, de tres a seis semanas antes de parir.

10 Alternativamente, la vacuna con coadyuvante es distribuida en viales mayores, con objeto de obtener números enteros de la cantidad de unidad de dosificación, para constituir las correspondientes preparaciones de vacuna en multidosis.

#### EJEMPLO 3

15 La técnica es la descrita en el ejemplo 1 hasta e incluyendo la incubación de E. coli ATCC 21.972 durante seis horas a 37°C en medio líquido PP<sub>3</sub>.

La producción de E. coli se efectúa luego en un medio de producción líquido como sigue:

20 Porciones de seis mililitros del E. coli así obtenido (es decir, aproximadamente  $6 \cdot 10^9$  bacterias) son inoculadas en matraces de producción que contienen 300 ml de medio líquido PP<sub>3</sub>, y los cultivos son incubados durante un día con agitación en estantes con balanceo (22 a 24 balanceos por minuto).

25  
15.12.73.

Las recolecciones de cinco matraces de

421094



5 producción (una serie) son mezcladas, y cada serie de recolecciones es centrifugada durante dos horas a 2550 r.p.m., el sedimento es suspendido de nuevo en 150 ml de agua destilada, y una muestra de la suspensión es en sayada para determinar la pureza, como se indica en el ejemplo 1.

10 La suspensión de células es sometida a sonido durante 30 minutos en un aparato de sonido Branson Europa modelo J 22, siendo mantenido el medio en un baño de hielo en fusión.

15 Tras rotura de las células, la suspensión es centrifugada durante dos horas a 2.550 r.p.m. a 5°C, para eliminar los residuos de células. Se hace pasar lo que sobrenada por un filtro esterilizador Millipore de 0,45 micras (Millipore es marca registrada de Millipore Corporation), produciendo 100 ml de filtrado cuyo pH es ajustado a 6,4 con ácido clorhídrico normal. Se añade tiomersal en concentración final de 0,02%.

EJEMPLO 4

20 Se mezclan a fondo cuarenta mililitros de una solución acuosa al 2% de Alhydrogel (producto manufacturado y vendido por Superfos Export Company) con 80 ml del filtrado obtenido al final del Ejemplo 3, comprobándose la adsorción de la enterotoxina sobre el Alhydrogel por ensayo de precipitación con ácido tricloroacéti  
25  
15.12.73.

421094



co.

Se desprecian veinte mililitros del fluido que sobrenada, y la mezcla resultante es distribuída en diez viales (10 ml) que son tapados.

5 El contenido de cada vial (9 ml) corresponde a una unidad de dosificación de vacuna de 100 mg (en base al peso seco) de enterotoxina de E. coli térmicamente lábil (LT).

10 La vacuna es administrada a cerdas preñadas por vía intramuscular o subcutánea, de tres a seis semanas antes de parir.

15 Alternativamente, la vacuna con coadyuvante es distribuída en viales mayores para obtener enteros de la cantidad de unidad de dosificación, constituyendo las correspondientes preparaciones de vacuna en multidosis.

#### EJEMPLO 5

20 La técnica es la del ejemplo 3, pero la mezcla es distribuída en 100 viales de vidrio que son tapados.

El contenido de cada vial (0,9 ml) corresponde a una unidad de dosificación de vacuna de 10 mg (en base al peso seco) de extracto de enterotoxina de E. coli térmicamente lábil (LT).

25  
15.12.73.

La vacuna es administrada a cerdas preña-

421094



das por vía intramuscular o subcutánea, de tres a seis semanas antes de parir.

EJEMPLO 6

5 La evitación de la colibacilosis de lechones por administración subcutánea de preparaciones de enterotoxina de E. coli térmicamente lábil (LT) según la invención ha sido demostrada por los siguientes ensayos I, II y III.

10 En cada uno de estos ensayos, las cerdas fueron vacunadas de tres a seis semanas antes de parir, y se usó una cerda como testigo. Veinticuatro horas tras el nacimiento se enfrentó a los lechones con 400 mg por kg de peso del cuerpo de enterotoxina de E. coli LT, preparada según el ejemplo 1, usando un tubo estomacal para la administración.

15 En el caso de tres camadas, según se indica en las Tablas siguientes, algunos lechones fueron enfrentados también con enterotoxina de E. coli térmicamente estable (ST), obtenida de la cepa ATCC 21.972, usando por tanto 660 mg de enterotoxina ST.

20 La evolución clínica de los lechones fue seguida regularmente en lo que respecta al aspecto de síntomas típicos de colibacilosis.

En las Tablas siguientes:

25 - Vacuna A representa la vacuna del ejemplo 2 a la uni-

15.12.73.

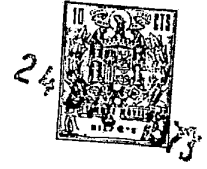
1421094



dad de dosificación de 100 mg (en base al peso seco);

- Vacuna B representa la vacuna del ejemplo 4 a la unidad de dosificación de 100 mg (en base al peso seco);
- 5 - Vacuna C representa la vacuna del ejemplo 5 a la unidad de dosificación de 10 mg (en base al peso seco).

15.12.73.



ENSAYO No. 1

Cerde		Lechón					Peso 24 hrs tras el enfrentamiento
No	Vacuna da con	No	Enfrentado con	Número de hrs entre enfrentamiento e iniciación	Duración (hrs)	Mortalidad	
2	A	2-10	LT	-	-	-	sin cambio
		2-11	LT	-	-	-	+ 3,5 %
		2-12	LT	-	-	-	+ 9,5 %
		2-13	LT	-	-	-	sin cambio
		2-14	ST	-	-	-	+ 3,6 %
		2-15	ST	-	-	-	sin cambio
2-16	ST	-	-	-	+ 2,8 %		
3	A	3-17	LT	-	-	-	+ 10,6 %
		3-18	LT	-	-	-	+ 11,8 %
		3-19	LT	-	-	-	+ 6,3 %
		3-20	LT	-	-	-	+ 5,8 %
		3-21	ST	-	-	-	+ 10 %
		3-22	ST	-	-	-	+ 11,9 %
		3-23	ST	-	-	-	+ 10,4 %
		3-24	ST	-	-	-	+ 7,5 %

(continúa)

421094



ENSAYO No 1 (continuación)

Cerde		Lechón					
No	Vacuna- da con	No	Enfrenta- do con	Número de hrs en tre enfrentamien- to e iniciación	Duración (hrs)	Mor- tali- dad	Peso 24 hrs tras el enfrentamien- to
		10-01	LT	6	24	-	- 10 %
		10-02	LT	6-12	24	-	- 10,9 %
		10-03	LT	6	12	-	- 5,3 %
		10-04	LT	6	96	+	- 14,7 %
10	-	10-05	LT	6-12	10	-	- 7,6 %
		10-06	ST	-	-	-	sin cambio
		10-07	ST	1	3	-	sin cambio
		10-08	ST	-	-	-	sin cambio
		10-09	ST	6	12	-	sin cambio

15.12.73.

421094

24



ENSAYO No 2

Cerde		Lechón					Peso 24 hrs tras el enfrentamiento
No	Vacuna da con	No	Enfrenta do con	Número de hrs en tre enfrentamien to e iniciación	Duración (hrs)	Mor- tali- dad	
47	A	47-12	LT	-	-	-	sin cambio
		47-13	LT	-	-	-	+ 9,2 %
		47-14	LT	-	-	-	sin cambio
		47-15	LT	-	-	-	+ 6,4 %
		47-16	LT	-	-	-	+ 6,6 %
48	B	48-08	LT	-	-	-	+ 5,2 %
		48-09	LT	-	-	-	+ 6,7 %
		48-10	LT	-	-	-	+ 3,7 %
		48-11	LT	-	-	-	+ 10,5 %
50 (con- trol)	-	50-01	LT	5	21	+	- 19,8 %
		50-02	LT	-	-	-	sin cambio
		50-03	LT	-	-	-	+ 2,6 %
		50-04	LT	6	14-21	-	- 22,1 %
		50-05	LT	14	48	+	- 18,8 %
		50-06	LT	21	10	-	- 3,2 %
		50-07	LT	6	21	+	- 28,5 %

15.12.73.

421094



ENSAYO N° 3

Cerde		Lechón					Peso 24 horas tras el enfrentamiento
N°	Vacuna da con	N°	Enfrenta do con	Número de hrs en Diarrea tre enfrentamien to e iniciación	Duración (hrs)	Mor-tali dad	
13	B	13-119	LT	-	-	-	+ 8,4 %
		13-120	LT	-	-	-	+ 11,4 %
		13-121	LT	-	-	-	+ 2 %
		13-122	LT	-	-	-	sin cambio
		13-123	LT	-	-	-	+ 7,1 %
		13-124	LT	4	-	2	+ 8,1 %
		13-125	LT	-	-	-	+ 8 %
		13-126	LT	-	-	-	+ 5,8 %
		13-127	LT	8	40	+	- 21 %
		13-128	LT	-	-	-	+ 8,4 %
21 x	C	21-110	LT	3	48	+	- 15 %
		21-111	LT	3	6-11	-	- 6,9 %
		21-112	LT	4	48	+	- 14,3 %
		21-114	LT	-	-	-	- 5,9 %
		21-115	LT	6	6	-	- 6,3 %
		21-116	LT	-	-	-	- 3,6 %
		21-117	LT	-	-	-	- 2 %
		21-118	LT	6	5	-	- 12,5 %

(continúa)

15.12.73.

421094



ENSAYO No 3 (continuación)

Cerde		Lechón				Mor- tali- dad	Peso 24 horas tras el enfren- tamiento
No	Vacuna da con	No	Enfrenta- do con	Diarrea Número de hrs en tre enfrentamien- to e iniciación	Duración (hrs)		
15	0	15-129	IT	-	-	-	+ 7,4 %
		15-130	IT	-	-	-	+ 4,9 %
		15-131	IT	-	-	-	+ 13,2 %
		15-132	IT	-	-	-	+ 16 %
		15-133	IT	-	-	-	sin cambio
20 (con- trol)	-	20-101	IT	5	6	-	- 3,6 %
		20-102	IT	6	6	-	- 16,5 %
		20-103	IT	25	4	-	- 4,5 % XX
		20-104	IT	19	6	-	- 5,3 %
		20-105	IT	6	6	-	- 4,7 %
		20-106	IT	3	4-9	-	sin cambio
		20-107	IT	-	-	-	- 3,2 %
		20-108	IT	6	6	-	- 5,7 %
		20-109	IT	6	6	-	- 4,2 %

15.12.73.

421094



- (x) Apareció mastitis 48 horas tras el parto
- (xx) Pérdida de peso 4 horas tras la aparición de diarrea

5 El resultado de los ensayos muestra que seis de las siete camadas de cerdas vacunadas estaban protegidas contra el enfrentamiento oral con enterotoxinas de E. coli. La protección proporcionada era del 90% para una camada y 100% para las otras cinco. Ninguna camada de las cerdas testigo presentó resistencia

10 al mismo enfrentamiento con enterotoxinas, mientras que la mortalidad y la morbilidad entre los lechones testigo estuvo comprendida entre 71,4 y 88,8%.

15 En cinco de siete camadas de cerdas vacunadas todos los lechones estuvieron completamente protegidos; en una camada estuvieron completamente protegidos ocho de diez lechones. En los lechones enfrentados con enterotoxina LT y derivados de cerdas testigo las cifras fueron como sigue: en una camada, cinco de cinco animales mostraron síntomas típicos; en otra camada cinco de siete, y en la tercera camada ocho de

20 nueve.

#### EJEMPLO 7

Una porción de 12 g de preparación de enterotoxina liofilizada obtenida según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 es suspendida en un litro de

25  
15.12.73.

421094



5 agua destilada exenta de pirógenos, y la suspensión es mezclada con una solución de 20 g de Alhydrogel (producto manufacturado y vendido por Superfos Export Company) en un litro de agua destilada exenta de pirógenos. Se ajusta el pH a 6 con ácido clorhídrico N, y se deja reposar la mezcla en la oscuridad a temperatura ambiente durante 40 horas con agitación intermitente, para permitir la adsorción de la enterotoxina en Alhydrogel. El pH final es 6,3.

10 Tras centrifugación se desprecia lo que sobrenada, y el sedimento es hidratado de nuevo por adición de 2,2 l. de una mezcla 50/50 de suero fisiológico y tampón (22 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (M/10) y 78 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (M/10) con 10 mg de tiomersal por 100 ml; pH 6,3).

15 Se agita la mezcla a 4°C durante dos horas; y se divide en dos tandas de 1100 ml, llamadas respectivamente A y B. La tanda A, que contiene 5,4 mg de preparación de enterotoxina y 9 mg de Alhydrogel por ml) es dividida en porciones de 5 ml (que por tanto contienen 27 mg de preparación de enterotoxina) que son distribuidas en viales de vidrio que luego son cerrados herméticamente. La tanda B es diluida por adición de 303 ml de una mezcla 50/50 de suero fisiológico y tampón (22 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (M/10) y 78 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (M/10) con 10 mg de tiomersal por 100 ml; pH 6,3) suplementada con

25  
15.12.73.

421094

24



2,7 g de Alhydrogel. La tanda B (que contiene 4,3 mg de  
preparación de enterotoxina y 9 mg de Alhydrogel por  
ml) es dividida en porciones de 2,5 ml (que por tanto  
contienen 10,75 mg de preparación de enterotoxina),  
5 que son distribuídas en viales de vidrio que luego son  
cerrados herméticamente.

La preparación de vacuna de las tandas A  
y B ha sido ensayada como sigue, en centros de cría de  
cerdas contaminados por diarrea colibacilar.

10 Así, las cerdas fueron inoculadas subcu-  
táneamente, entre 3 y 6 semanas antes de parir con una  
sola dosis de vacuna: 59 cerdas recibieron una dosis  
de vacuna tanda A, y 28 cerdas recibieron una dosis de  
vacuna tanda B. Se usaron cincuenta cerdas como testi-  
15 go, que recibieron los mismos volúmenes de la misma  
mezcla de Alhydrogel/tampón, sin extracto de enteroto-  
xina.

Todos los lechones fueron observados para  
determinar la aparición de diarrea.

20 El y después del segundo día de síntoma  
clínico de enfermedad, los lechones fueron tratados por  
administración diaria de cloramfenicol, ampicilina o  
sulfadoxín/trimetoprim.

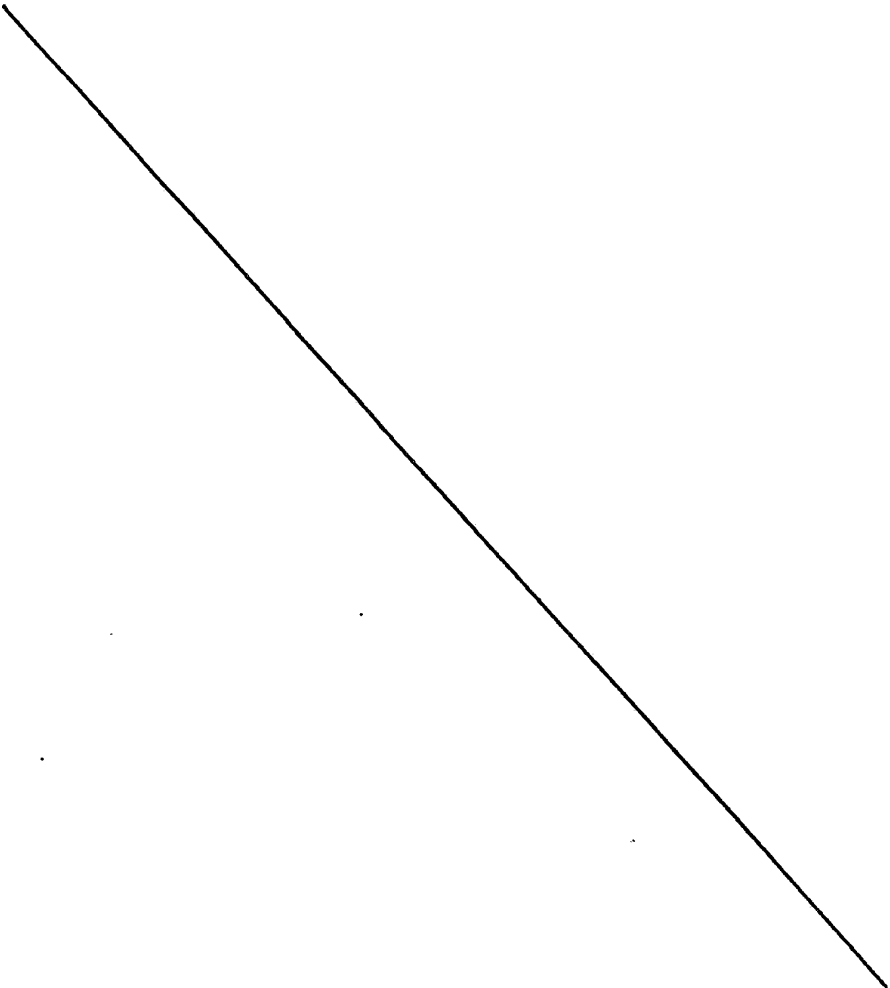
Los resultados se resumen en la siguiente  
25 Tabla I, teniendo en cuenta la consistencia de las heces,  
15.12.73.

421094



24 D

duración de la diarrea, número de administraciones de  
antibiótico y mortalidad por deshidratación.



15.12.73.

421094



TABLA I

Dosis de vacuna	Número total de camadas	Número de camadas que presentan diarrea severa (x)	Tanto por ciento de diarrea (x)	Número de camadas con mortalidad	Tanto por ciento de mortalidad
5 ml de tanda A	59	15	25,4	2	3,3
2,5 ml de tanda B	28	10	35,7	2	7,1
placebo (xx)	50	24	48	8	16

(x) es decir, heces líquidas durante más de dos días, varias administraciones de antibióticos, con y sin mortalidad

(xx) un grupo de 25 cerdas recibió 2,5 ml, y el otro grupo de 25 cerdas recibió 5 ml

15.12.73.

421094



Los resultados de la Tabla I indican que la administración de vacunas según la invención reduce considerablemente el tanto por ciento de enfermedad y mortalidad, obteniéndose mejor protección tras administración de la unidad de dosificación de enterotoxina de 27 mg a las cerdas.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 4 de Diciembre de 1972, bajo el Nº 311.998, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

#### REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1a.- Procedimiento para preparar una vacuna para la colibacilosis de lechones, para administración intramuscular o subcutánea a cerdas preñadas, que

15.12.73.



421094



5 comprende aislar enterotoxina de E. coli térmica-  
mente lábil (LT) a partir de células de una cepa de  
E. coli productora de enterotoxina térmicamente lá-  
bil, y mezclar la enterotoxina aislada con un coad-  
yuvante de vacunas.

2ª.- Procedimiento según la reivindica-  
ción 1ª, donde la cepa de E. coli es la ATCC 21972.

10 3ª.- Procedimiento según la reivindica-  
ción 1ª, donde la enterotoxina de E. coli térmicamen-  
te lábil (LT) es un extracto de E. coli exento de cé-  
lulas, sustancialmente exento de lipopolisacáridos.

15 4ª.- Procedimiento según cualquiera de  
las reivindicaciones 1ª y 2ª, donde la unidad de do-  
sificación de enterotoxina es de 10 a 150 mg de ex-  
tracto liofilizado.

5ª.- Procedimiento según cualquiera de las  
reivindicaciones 1ª a 4ª, donde el coadyuvante es  
un coadyuvante aceitoso o un coadyuvante de gel de  
compuesto de aluminio.

20 6ª.- Procedimiento para preparar una va-  
cuna para la colibacilosis de lechones.

Tal y como se ha descrito en la Memoria  
que antecede y para los fines que se han especifica-  
do.

25

26.2.74



421094



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

Madrid, 5 MAR. 1974

P.A. Alberto de Estraburo  
Por Poder

26.2.74  
MCM

- 28 -

