

442242

PATENTE DE INVENCION

Case 900-9112

3700/RA/HP

Int. Cl.:	A61K
-----------	------

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE
ENTEROTOXINA DE E. COLI.

Solicitante: SANDOZ, A.G., entidad suiza, residente en Basilea,
Suiza.

Esta invención se relaciona con
la purificación de enterotoxina de E. Coli y con el
empleo de enterotoxina de E. Coli termo-lábil puri-
ficada en vacunas para la inmunización activa y
para la producción de sueros para la protección

5

pasiva contra infecciones de E. Coli y para la inmunoprolifera-
laxis contra el cólera. 442242

5 Ya han sido consideradas las enterotoxinas de E. Coli como factores significativos en las infecciones de E. Coli, en particular con respecto a las pérdidas severas de agua y electrólitos que ocurren en las enfermedades dia-
10 rreicas causadas por bacterias Coli. La capacidad de sintetizar estas enterotoxinas no es específica a las cepas sino que se controla por un plasmide transmisible que puede transferirse por conjugación desde una cepa patogénica de E. Coli a cepas no patogénicas; de este modo, se puede explicar la aparición de nuevos serotipos enteropatogénicos.

15 Las infecciones de Coli han sido tratadas hasta el presente con vacunas Coli o quemoterapéuticamente, en particular con antibióticos. Sin embargo, el empleo de vacunas Coli está dirigido en general contra serotipos particulares de E. Coli y no contra sus exotoxinas, en particular enterotoxinas. Este método proporciona así una protección antibacterial pero no una protección antitóxica. El mecanismo
20 de síntesis controlado por plasmoides explica también la frecuente aparición de resistencia a los antibióticos entre cepas enteropatogénicas de E. Coli, puesto que se transfieren factores R por el mismo mecanismo que los plasmoides de enterotoxina.

25 La síntesis controlada por plasmoides de dos formas de enterotoxina de E. Coli, especialmente enterotoxina termo-lábil (LT) y enterotoxina termo-estable (ST), han sido descritas en la literatura [Por ejemplo, Smith, H.W. y Gyles, Cl.L., J. Med. Microbiol. 3, 387 (1970)].
30 Estas formas difieren principalmente en su labilidad para

los ácidos, termo-labilidad y antigenicidad, como se indica, por ejemplo, en la siguiente tabla, la cual muestra también diversas propiedades comunes observadas:

	Propiedad	LT	ST
5	Termo-labilidad (65°C, 15 minutos)	+	-
	Labilidad a los ácidos (pH 6)	+	-
	Antigenicidad	+	-
	Dialisabilidad	-	-
10	Peso molecular elevado	+	+
	Actividad en el modelo de lazo intestinal en el conejo	+	+
	Actividad en el modelo de lazo intestinal en el cerdo	+	+
	Producción controlada por un plasmóide	+	+
15	Capacidad para inducir diarrea en cerdos	+	+

No obstante, los intentos para investigar adicionalmente sobre enterotoxinas de Coli y su papel en las infecciones de Coli, han estado impedidas por la incapacidad de obtener las enterotoxinas en un grado de pureza suficientemente alto. Un requisito previo para la obtención de la pureza necesaria consiste en un sistema de ensayo reproducible y exacto para la localización y cuantificación de la actividad de la enterotoxina, por ejemplo después de la separación cromatográfica, pero los métodos utilizados hasta el presente, por ejemplo los modelos de lazo intestinal antes mencionados, no han resultado ser adecuados a estos respectos, habiéndose encontrado que las enterotoxinas identificadas por tales métodos, tienen, por ejemplo, una amplia variedad de pesos moleculares. Estos sistemas de ensayo conocidos consumen

tambien tiempo y solamente se pueden utilizar para investigaciones a pequeña escala.

Un ensayo más exacto y simple para la actividad de la enterotoxina se utiliza en conexión con la presente invención, estando basado en el hecho de que la estimulación de actividad de ciclase de adenilato, tal y como se refleja por una acumulación de monofosfato de 3',5'-adenosina cíclico (CAMP), en preparaciones miocárdiales de gatos de ciclase de adenilato, constituye una medida exacta de la actividad y concentración de la enterotoxina.

Este método para la detección y/o determinación de la actividad de la enterotoxina de E. Coli, comprende incubar un preparado de ciclase de adenilato miocárdial de gatos durante tiempo predeterminado, en presencia de un material a ensayar con respecto a la actividad de la enterotoxina de E. Coli, y medir el incremento en la actividad de ciclase de adenilato en el producto resultante, con respecto a un control.

Más particularmente, la incubación se puede efectuar en presencia de un sustrato cuya conversión a monofosfato de 3',5'-adenosina cíclico se cataliza por ciclase de adenilato, determinándose el incremento en la actividad de ciclase de adenilato midiendo el incremento en concentración de monofosfato de 3',5'-adenosina cíclico en el producto resultante, en relación a un control.

El preparado de ciclase de adenilato miocárdial de gatos se puede obtener a partir del tejido miocárdial de gatos, de forma conocida, por ejemplo como describe Levey et al. [G.S. Levey y E. Epstein, Biochem. Biophys. Res. Commun. 23. 990-995 (1968), y 38, 86-92 (1970)]. El

preparado puede estar en forma particulada o en forma solubili-
zada obtenida por tratamiento con un detergente no iónico,
en particular Lubrol-PX [ICI America Inc.] como describe
Levey (supra) y absorbido, por ejemplo, en un tampón de su-
crosa. En el caso de preparados solubilizados es necesario,
sin embargo, restaurar la actividad de ciclasa de adenilato
la cual se destruye aparentemente por el detergente. Puede
conseguirse esto fácilmente por la adición de fosfolípidos,
por ejemplo fosfatidilserina.

La conversión de sustratos, catalizada
con ciclasa de adenilato, a monofosfato de 3', 5'-adenosina
cíclico, ya es bien conocida. Sustratos adecuados incluyen
trifosfato de adenosina (ATP) o, preferiblemente, 5'-adenil-
imidodifosfato (AMP-PNP). La incubación se puede efectuar
de forma convencional, por ejemplo como se ha descrito en
las referencias de Levey antes citadas. El medio de reacción
comprende adecuadamente iones magnesio, por ejemplo en forma
de cloruro de magnesio, así como otros materiales que se
sabe facilitan la conversión de ATP a cAMP y en el ensayo
ulterior de cAMP por ejemplo albumina de suero bovino y
teofilina mas tampón, por ejemplo tampón Tris-HCl, así como
el sustrato, por ejemplo AMP-PNP, encima y material de ensayo
de control. La incubación se inicia adecuadamente por adición
de la encima, en forma particulada o solubilizada como an-
tes se ha descrito, al medio de reacción restante, y se pue-
de efectuar convenientemente a 37°C y durante un periodo de
3 a 45 minutos, preferiblemente 5 a 30 minutos. La conversión
se puede detener de forma conocida, por ejemplo por adición
de ácido tricloroacético y manteniendo la mezcla a 4°C, por
ejemplo durante 10 minutos e mas. El cAMP en el producto

resultante se puede aislar de forma convencional. Por ejemplo, el precipitado se puede separar por centrifugación y extraerse la parte sobrenadante varias veces con eterdietílico/ agua y evaporarse las capas acuosas hasta sequedad. El residuo se puede recibir adecuadamente en un tampón, por ejemplo tampón acetato de pH 4 y utilizarse partes alicuotas para el ulterior ensayo CAMP.

Antes de la elaboración del CAMP, se añade adecuadamente una cantidad conocida de CAMP tritiado a la mezcla (o al menos una muestra de la misma) con el fin de determinar la corrección para la recuperación por extracción mediante determinación de la cantidad de CAMP tritiado en el producto aislado.

El CAMP se puede ensayar según cualquiera de los métodos conocidos para lo mismo, siendo el método preferido el sistema de ensayo de dilución con radioisotopos tal y como describe Gilman A.G., Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 305.312 (1970) y modificado como anteriormente se ha descrito, pudiendose disponer comercialmente de este sistema en forma de un kit (Boehringer, Mannheim, Alemania).

Este método de ensayo permite la separación de fracciones de material a partir del cual ha de aislarse la enterotoxina y el ensayo fácil de la actividad de la enterotoxina. Si es necesario, y con el fin de conseguir una pureza mayor, se pueden efectuar otras separaciones sobre las fracciones activas, convenientemente después de su concentración, e identificarse de nuevo las fracciones activas. Las etapas de separación e identificación se pueden realizar así hasta que se obtiene un producto homogéneo o suficientemente puro. El empleo del ensayo de la enterotoxina descrito

ha facilitado, mas particularmente, el desarrollo, según la invención, de métodos de obtención de enterotoxina de E. Coli en un elevado grado de pureza. En particular, se ha encontrado que se puede aislar enterotoxina de E. Coli y purificarse altamente mediante isotacoforesis o cromatografía de afinidad.

La presente invención proporciona un método para el aislamiento y purificación de enterotoxina de E. Coli a partir de un filtrado de cultivo libre de células, en bruto o prepurificado, de un cultivo de fermentador de una cepa enteropatogénica de E. Coli, que comprende someter dicho filtrado de cultivo a una separación isotacoforética o cromatográfica de afinidad.

Las fracciones separadas resultantes, o al menos aquellas que contienen proteína, se pueden ensayar entonces con respecto a la actividad de enterotoxina, particularmente por el método descrito, y someterse a dicha separación adicional tal y como sea necesario para conseguir el grado requerido de pureza. Naturalmente, podrá apreciarse que las fracciones activas pueden haber sido predeterminadas, por ejemplo en separaciones previas efectuadas bajo condiciones idénticas, de tal modo que la etapa de ensayo no sería entonces necesaria.

El filtrado de cultivo, libre de células, que contiene enterotoxina, se puede obtener de forma conocida. Por ejemplo, la cepa enteropatogénica E. Coli cuya enterotoxina ha de aislarse, se puede cultivar, por ejemplo durante tres generaciones y a 37°C, en un medio adecuado, por ejemplo caldo de soja de tripticasa \angle -BBL, Lockeyville, Maryland, USA, o, preferiblemente, un caldo de soja de tripticasa modificada obtenido por ultrafiltración de caldo de soja de tripticasa,

por ejemplo una solución al 30% (peso/volumen) del mismo. La primera etapa del cultivo se efectua convenientemente durante un periodo de tiempo relativamente corto, por ejemplo 4 a 6 horas, efectuándose la segunda etapa, por ejemplo hasta que el cultivo alcanza la mitad de la fase logaritmica, y realizándose la etapa final, por ejemplo, durante 8 a 10 horas.

Las células se pueden recoger entonces de forma convencional, por ejemplo mediante centrifugación, y la parte sobrenadante se puede filtrar y comprobar con respecto a su esterilidad. El filtrado de caldo esteri. en bruto se concentra entonces adecuadamente mediante ultrafiltración, por ejemplo a través de membranas Diaflo PM-30, se desalifica por tratamiento con una resina intercambiadora de iones en lecho mezclado, por ejemplo AG 501-X8, se liofiliza y se almacena para su uso ulterior, por ejemplo a -20 hasta -70°C. Durante este procedimiento de concentración inicial, los productos bacteriales se protegen convenientemente contra la degradación proteolítica, mediante adición de un inhibidor de proteasas, por ejemplo isotionato de pentamidina.

El filtrado de células, esteri, liofilizado, inicialmente concentrado, se puede prepurificar adecuadamente mediante una o mas etapas de filtración de gel antes de la etapa de separación principal, particularmente cuando esta ha de ser por isotacofóresis.

La etapa o etapas de filtración de gel se pueden efectuar de forma convencional, determinándose los geles y eluyentes adecuados, por ejemplo en experimentos previos que ayudan a establecer los pesos moleculares aproximados con los cuales está asociada la actividad de la entero-

torina. A este respecto, se ha encontrado conveniente efectuar una primera separación de filtración con gel empleando Bio-Gel A-5m como soporte (gama de separación, 5.000.000-80.000) y un tampón de bicarbonato amónico, pH 7,9-8, como eluyente. Después de la determinación de las fracciones de actividad de enterotoxina, por ejemplo, por el método de ensayo descrito, las fracciones deseadas se pueden concentrar entonces y efectuarse una ulterior separación de filtración con gel, adecuadamente en una columna Sephadex G-75 (gama de separación 70.000-3.000) utilizando el mismo tampón o un tampón de tris-HCl (pH 8). Las fracciones activas se pueden determinar entonces de nuevo y concentrarse.

Las fracciones reunidas son entonces concentradas convenientemente por dialisis, por ejemplo contra tampón tris L- amino-caproato 0,1 M (pH 8,9) para facilitar la preparación durante la separación ulterior preferida por isotacoforesis.

La separación isotacoforética se puede efectuar por el método de Svendsen y Rose, Science Tools 17, 13- (1970), utilizando de gel de poliacrilamida como medio soporte y anfólitos de vehículo Ampholine como sustancias tampón y separadoras. La separación se efectúa preferiblemente en columnas simples de gel tamponadas, mezclándose los anfólitos vehículos Ampholine con la muestra y el electrolito de terminación, el cual adecuadamente es tampón tris-aminocaproato (pH 8,9). El electrolito de terminación se deposita en capa sobre la parte superior del gel y el tampón tris-sulfato (pH 7,1) se utiliza convenientemente como electrolito de elución. La muestra a separar, en particular el producto de filtración con gel Sephadex G-75 concentrado, se mezcla convenientemente con sucrosa para incrementar su vis-

mezcla con los anfolitos vehículos, introduciéndose, por vía de un capilar, a través de la capa superior de electrolito de terminación para formar una capa sobre la parte superior del gel. El gel se prepara adecuadamente a partir de soluciones de stock según Davis, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1.964), empleando, preferiblemente, tris-fosfato pH 8,1 como tampón de gel, polimerizado solamente por fotopolimerización.

Las fracciones eluidas se pueden ensayar entonces con respecto a la actividad de enterotoxina, por ejemplo por el método descrito, y las fracciones deseadas se pueden reunir y concentrarse de nuevo por dialisis contra tampón tris ζ -aminocaproato pH 8,9.

Si se desea, se puede efectuar una separación isotacoforética adicional para conseguir una pureza incluso mayor, utilizándose esta vez una relación diferente de las molalidades de ión y contra-ión o, preferiblemente, un electrolito de elución diferente, por ejemplo ácido tris-2-(N-morfolino)etanosulfónico de pH 6,2.

De nuevo, las fracciones activas se pueden reunir y concentrar, adecuadamente por dialisis como antes se ha descrito. El producto final se somete entonces adecuadamente a filtración con gel sobre Sephadex G-50 para separar los anfolitos vehículo de Ampholine de bajo peso molecular de la proteína isotacoforéticamente fraccionada.

Otro método para aislar la enterotoxina del filtrado de células, esteril, inicialmente concentrado, o del filtrado de células prepurificado por filtración con gel, consiste en la cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad es una técnica conocida para la separación

de, por ejemplo, proteínas, que explota la propiedad biológica de estas materiales para ligar ligandos específicamente y reversiblemente. Una solución, que contiene el material a purificar, se pasa a través de una columna que contiene un polímero insoluble o gel al cual se ha unido covalentemente un inhibidor específico u otro ligando. Las proteínas que no tienen afinidad apreciable alguna con respecto al ligando pasarán sin detenerse a través de la columna, mientras aquellas que reconozcan al inhibidor se detendrán en una proporción con respecto a su afinidad. La proteína específicamente adsorbida se puede eluir entonces alterando la composición del disolvente, de modo que se presente la disociación.

La separación según la invención se puede efectuar de forma convencional como ya se conoce en la separación cromatográfica por afinidad, por ejemplo como describe Cuatrecasas et al., *Methods of Enzymology* XXII, 345- (1971). Para los fines de la presente invención, ligandos ligadores adecuados incluyen sustancias anfipáticas, tales como fosfolípidos o glicolípidos, que tienen grupos carboxílicos libres, en particular gangliosidos. Estos ligandos pueden ser ligados a una matriz insoluble, la cual es convenientemente un derivado de agarosa, tal como un derivado producido por unión de un copolímero amínico, por ejemplo poli-L-lisil-DL-alanina a agarosa activada con cianobromuro de forma conocida (por ejemplo Cuatrecasas P., *J. Biol. Chem.* 245, 3059 (1970) y Sica V. et al., *Nature (Londres)*, *New Biology* 244, 36 (1973)) o agarosa de albúmina. El ligando puede ser ligado a la matriz de forma convencional. En el caso de gangliosidos, por ejemplo, el grupo carboxílico del ácido siálico terminal se enlaza a los grupos amino de los derivados de agarosa mencionados

anteriormente, en presencia de un reactivo carbodiimida soluble en agua, por ejemplo 1-etil-3-dimetil-3-(3-dimetilamino propil)carbodiimida, o dicitclohexilcarbodiimida. Para el enlace o acoplamiento, los gangliosidos se utilizan convenientemente en forma de sus ésteres de N-hidroxisuccinimida o de sus anhídridos mixtos activados. La reacción se efectúa convenientemente en un disolvente o mezcla disolvente, por ejemplo un éter cíclico, por ejemplo dioxano o una mezcla de agua/dioxano.

Otros sistemas ligando-matriz adecuados para utilizarse como resinas de afinidad en la separación, incluyen los complejos ácido graso-aminoalquilamino-agarosa. Estos se pueden preparar de forma convencional, por ejemplo como se describe en la primera referencia de Cuatrecasas antes mencionada. Alquilendiaminas adecuadas para la formación de los derivados aminoalquilaminoagarosa, incluyen hexanodiamina, decanodiamina y etilendiamina. Ácidos grasos adecuados incluye al ácido palmítico.

Las resinas de afinidad descritas anteriormente se colocan adecuadamente en una columna de afinidad y el filtrado de células, esteril, liofilizado, inicialmente concentrado, se recibe preferiblemente en un tampón, por ejemplo bicarbonato Krebs-Ringer pH 7,4, se transfiere a la columna y se desarrolla, adecuadamente bajo enfriamiento a 4°C. La elución de las enterotoxinas se puede efectuar por ejemplo, con dodecil sulfato de sodio. La ulterior separación del dodecil sulfato de sodio y la renaturalización necesaria de la enterotoxina de Coli eluida se pueden efectuar de forma conocida (por ejemplo, K. Weber et al., J. Biol. Chem. 246, 4504 (1971)).

5

10

15

20

25

30

Para la producción de enterotoxinas según la invención, se puede emplear cualquier cepa enteropatógena de E. Coli o cualquier cepa no patógena que se ha hecho patógena mediante transferencia de plasmido. Cepas preferidas incluyen las cepas patógenas porcinas de E. Coli P 263, serotipo 08:K87, K88ab:H19; P 155, serotipo 0149:K91:88a,c; y P 307, serotipo 08:K87,k88ab; cepas patógenas humanas H 10407, serotipo 078K? y H 19, serotipo 026:K60:H11; así como una cepa de E. Coli K12 Ent⁺ y Ent⁻, a la cual se ha transferido el plasmido Ent a partir de la cepa humana H 19.

Mediante el proceso de aislamiento de la invención, es posible obtener enterotoxina de E. Coli en una pureza de por lo menos 99%. El procedimiento permite también el aislamiento de formas particulares de enterotoxina, es decir la forma termo-lábil (LT) y la forma termo-estable (ST) puesto que, mientras estas formas muestran ambas una actividad enteroxigénica en el ensayo descrito, las mismas difieren en cuanto a propiedades físicas, por ejemplo peso molecular, y de este modo aparecen en diferentes fracciones después de la etapa de separación, por ejemplo las separaciones de filtración con gel o cromatográfica de afinidad.

La invención proporciona también una enterotoxina de E. Coli termo-lábil (LT) que tiene un peso molecular de 102.000 ± 3.000 que ha sido aislada por el proceso de la invención, en particular a partir de cultivos de cepa de E. Coli P263 y que con anterioridad no había sido registrada.

Se sabe que las cepas de E. Coli promueven

Las enfermedades diarreicas en hombres y animales, particularmente en animales juvenes tales como marranos, corderos y terneros. Las infecciones de Coli son en particular responsables de la enteritis infantil, de la mayoría de las formas de enfermedades del viajero y de la diarrea tropical aguda. En animales domésticos, particularmente en animales juvenes, como se ha indicado, las infecciones de Coli se encuentran entre las enfermedades mas significativas. En los cerdos, las infecciones de Coli ocurren principalmente en conexión con perturbaciones de las paredes del tracto gastrointestinal, particularmente en cerdos recién nacidos y en cerdos destetados. Surge entonces una multiplicación masiva de ciertos serotipos de bacterias Colihemolizantes.

Las enterotoxinas de E. Coli termo-lábiles (LT) purificadas de la invención, en particular aquellas que tienen un peso molecular de 102.000 ± 3.000 son útiles en la protección contra infecciones de E. Coli, tal y como se indica por su actividad en el ensayo del lazo intestinal del conejo y cerdo (W. Burrows, G.H. Musteikis, J. Infect. Dis. 116, 183 (1966) y H.W. Smith, C.L. Gyles, J. Med. Microbiol 3, 403 (1970)), en el ensayo de la piel del conejo (J.O. Craig, Proc. Cholera Res. Symp. Honolulu 24, U.S. Government Printing Office (1965)) y en el ensayo de lipasa de células grasas (P. Cuatrecasas, Biochem. 12, 3567 (1973)) y en el ensayo de estimulación con ciclasa de adenilato de la invención.

Las enterotoxinas termo-lábiles (LT) purificadas de la invención son también útiles en la protección contra el cólera, tal y como se indica por el hecho de que existe una íntima relación serológica o inmunidad

transversal entre la enterotoxina E. Coli (LT) y la enterotoxina del cólera, que previamente ha sido producida en forma pura y caracterizada comprensivamente por las características físico-químicas.

5

Por consiguiente, la invención se relaciona también con el empleo de las enterotoxinas de E. Coli termolábiles (LT) purificadas de la invención, en vacunas para la protección activa y en la producción de sueros para la protección pasiva contra infecciones de E. Coli y la inmunoprofilaxis contra el cólera. A este respecto, se ha encontrado que las enterotoxinas de varias cepas E. Coli son inmunológicamente idénticas o estrechamente relacionadas con las existentes de inmunidad transversal, lo cual es un requisito para ciertos usos inmunológicos, por ejemplo para la obtención pasiva de antisueros, obtenidos en una especie animal diferente.

10

15

20

25

30

Para ciertas finalidades, en particular para su aplicación oral y para la producción de suero, es necesario que la enterotoxina de E. Coli termolábil (LT) se encuentre en forma de un toxoide estable, es decir, un preparado que retenga la antigenicidad de la enterotoxina pero cuya toxicidad se disminuya o elimine. Dichos toxoides se pueden producir de forma convencional (por ejemplo R.S. Rappaport, *et al.*, Inf. Imm. 2, 304 (1974)). Por ejemplo, se pueden añadir agentes reticulantes convencionales, tal como formaldehído o, preferiblemente, glutaraldehído, tomándose las debidas precauciones de que las propiedades inmunológicas se retengan durante el tratamiento. Por ejemplo, la enterotoxina termolábil (LT) purificada de la invención se puede incubar con formaldehído a una temperatura elevada,

por ejemplo 35 a 40°C, durante un periodo largo, por ejemplo dos a seis semanas, o con glutaraldehido a una temperatura que oscila entre la ambiente y 40°C, empleando una concentración de glutaraldehido de 0,001 a 0,05 M.

5

10

La invención proporciona en consecuencia una vacuna que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de una enterotoxina de E. Coli termo-lábil (LT) purificada de la invención o un toxoide estable de la misma, así como un método de inmunización contra infecciones de E. Coli o cólera, que comprende administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de una enterotoxina de E. Coli termo-lábil (LT) purificada de la invención o un toxoide estable de la misma.

15

20

La invención proporciona también un suero que comprende anticuerpos inducidos por la administración de una enterotoxina de E. Coli termo-lábil (LT) purificada de la invención o un toxoide estable de la misma, así como un método de inmunización contra infecciones de E. Coli o cólera, que comprende administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de dicho suero.

25

30

Para su empleo en vacunas, la dosis de la enterotoxina de E. Coli termo-lábil (LT) purificada de la invención, o un toxoide estable de la misma, variará desde luego en función del modo de administración, del anfitrión y del tratamiento deseado. Sin embargo, se obtienen en general resultados satisfactorios cuando se emplea una dosis de 0,015 a 10 µg aproximadamente por Kg de peso corporal del animal. Para los mamíferos mayores, la dosis diaria total es del orden de 1 µg a 1 ml aproximadamente y las formas de dosificación adecuadas para su aplicación oral comprenden

de 100 µg a 1 mg aproximadamente del toxoide estable. La toxina o toxoide se liofiliza adecuadamente.

La cantidad de suero a administrar para la inmunización pasiva, será desde luego la equivalente a la dosis eficaz de toxina y toxoide indicada anteriormente y dependerá, naturalmente, del contenido en anticuerpos del suero.

Este puede determinarse midiendo la cantidad de suero necesario para neutralizar las cantidades adecuadas de toxina, determinándose la actividad residual en los ensayos del lazo intestinal mencionados anteriormente, ensayo de estimulación con ciclasa de adenilato, microensayo de emaglutinación pasiva (S.V. Boyden, J. Exp. Med. 23, 107 (1951)) y A.B. Stavitski, J. Immunol. 72, 368 (1954)) y microensayo de floculación de bentonita (H.C. Goodman, J. Bozicdvich, Immunochemical Methods, 1964, 43).

Las vacunas de la invención se pueden formular de forma convencional, por ejemplo con o sin adyuvantes. Sin embargo, cuando se emplean adyuvantes, estos incluyen adecuadamente, compuestos de aluminio, por ejemplo hidróxido de aluminio o fosfato o "Alhidrogel" y emulsiones de agua-en-aceite, tal como Adjuvant 65 (una emulsión de aceite-agua de antígeno en aceite de nuez triturada, que está emulsionado con mono-oleato de manitol y estabilizado en estearato de aluminio) y, para su empleo en animales, adyuvante de Freund.

Las vacunas y sueros de la invención se pueden utilizar para la protección de infecciones E. Coli y cólera en forma convencional. Por ejemplo, la protección de niños y adultos contra la diarrea inducida con Coli, se puede conseguir, para los niños, mediante vacunación maternal

en combinación con un programa de vacuna para los niños antes del final de la protección pasiva, o generalmente mediante inmunización activa con toxoide.

5 La protección de animales contra infecciones Coli es particularmente importante en los animales juvenes. Debido a que los animales recién nacidos, agrícola-mente importantes, pueden tomar anticuerpos con el colostro de la madre sólo en las primeras horas o días después del nacimiento, es importante, para su protección, que este colostro tenga un elevado contenido de anticuerpos específico. 10 Esto se puede conseguir por inmunización repetida de la madre con la enterotoxina adecuada. Inmediatamente, en las primeras semanas de vida, esta protección por anticuerpos maternos es necesaria, debido en este momento a que las infecciones en animales juvenes por cepas de E. Coli productoras de enterotoxinas ocurren muy frecuentemente y pueden ser fatales. Otra posibilidad para proteger los animales juvenes, 15 consiste en la administración de anticuerpos heterólogos específicos, por ejemplo en forma de un suero, obtenidos a partir de animales inmunizados con enterotoxina de Coli. 20

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

EJEMPLO 1: Producción de enterotoxina de Coli

a) Medio

25 Como medio se utiliza "caldo de soja de tripticasa". El medio de peptona-agua contiene, por litro, 17 g de peptona de tripticasa, 3 g de peptona de fiton, 5 g de cloruro sódico, 2,5 g de dex rosa y 2,5 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ y tiene un pH de 7,3.

30 Alternativamente, un "caldo de soja de

tripticasa modificada" que tiene la misma composición que la descrita anteriormente, pero habiendo sido previamente ultrafiltrada la peptona a través de membranas Diaflo PM-10 (Amicon), se puede utilizar como medio. Una solución al 30% (peso/volumen) del "caldo de soja de tripticasa" se ultrafiltra, se desecha el residuo y el filtrado se utiliza adicionalmente. Es conveniente emplear estas moléculas de peptona relativamente pequeñas en lugar del producto sin tratar, para facilitar la ulterior separación del medio sin alterar de los productos bacteriales en la parte sobrenadante en bruto de los cultivos de E. Coli.

b) Cultivo.

La cepa E. Coli liofilizada P.263, serotipo O8:K87, K88ab:H19, se recibe en agua, se raya sobre placas de agar sanguíneo y se cultiva a 37°C durante 12 horas. Las células del crecimiento superficial se transfieren, por medio de un lazo de platino, a matraces Erlenmeyer de un litro que contienen 200 ml del medio, "caldo de soja de tripticasa modificado o sin modificar", en un sacudidor rotativo.

Las bacterias se cultivan a 37°C durante 4 horas y se utilizan entonces como inóculo para un cultivo en sacudidor de 2 litros. Cuando este cultivo alcanza la mitad de la fase logarítmica, se utiliza como inóculo para un fermentador de 20 litros en el cual el medio se agita a 500 revoluciones/minuto y se airea (10 litro/minuto). Para evitar el espumado, se añade un ml de una solución al 25% (peso/volumen) de un agente antiespumante (Glanapon 2000, Gross-Buseti, Viena). El fermentador se incuba a 37°C durante 2 horas y las células se recogen por centrifugación

en una ultracentrifuga enfriada a 4°C. El fluido sobrenadante se filtra a través de un filtro de membrana de 0,45 µm y se comprueba con respecto a la esterilidad (mediante rayado sobre placas de agar sanguíneo). El filtrado estéril se desalifica por tratamiento con una resina intercambiadora de iones en lecho mezclado (por ejemplo AG-501-X8), se liofiliza y se almacena para su uso posterior a una temperatura de +20 a -70°C.

5

10

15

De forma analoga a la descrita anteriormente, se obtienen filtrados de cultivo libres de células de otras cepas E. Coli, por ejemplo cepas patogénicas porcinas P.155, serotipo O149:K91:88a,c y P307, serotipo O8:K87K88a, b, así como las cepas patogénicas humanas H 10407, serotipo O78K? y H19, serotipo O26 :K60 :H11; y también una cepa de E. Coli K12 Ent⁺ y Ent⁻, que ha recibido el plasmido Ent desde la cepa patogénica humana H19.

EJEMPLO 2: Purificación de la enterotoxina de Coli por filtración con gel

20

25

30

El liofilizado obtenido en el ejemplo 1 (a partir de cualquiera de las cepas mencionadas) se recibe en tampón NH₄HCO₃ 0,1 M (pH 7,9) (eluyente) y se efectúa la separación cromatográfica sobre una columna Bio Gel A-5m (gama de separación 5.000.000 - 80.000). Mediante el empleo de esta columna (2,5 x 100 cm) con un volumen total de 500 ml y un volumen aproximado en vacío de 190 ml, una cresta de sustancia se eluye en aproximadamente 220 ml, lo cual corresponde a un peso molecular teórico de aproximadamente 10⁶ daltons sobre la base de Ev/Eo = 1,15. Otra cresta de sustancia con un hombro distinto, se eluye en 420-480 ml, lo cual corresponde, sobre la misma base, a un peso molecular

aproximado de 9×10^4 - $1,2 \times 10^5$ daltons. La actividad termolábil puede encontrarse claramente, por ejemplo mediante el ensayo de ciclasa de adelinato, en el hombro de esta cresta.

Las fracciones activas liofilizadas se pueden reunir y recibir en tampón NH_4HCO_3 0,1 M (pH 7,9) y efectuarse una filtración con gel adicional utilizando una columna Sphadex G-75 (gama de separación 70.000 - 3.000). El material eluido en el volumen vacío se separa claramente de las otras proteínas y muestra actividad biológica. Las fracciones activas (identificadas, por ejemplo, por el ensayo con ciclasa de adelinato) se reúnen y liofilizan.

EJEMPLO 3 : Purificación de la enterotoxina de Coli por isotacoforesis

El filtrado de células (del ejemplo 1) o el preparado de enterotoxina de Coli (LT) obtenido en el ejemplo 2, se puede someter entonces a isotacoforesis preparativa. Para la separación isotacoforética, se puede emplear como medio soporte un aparato de electroforesis vertical con 3,3% de gel de poli(acrilamida (por ejemplo según P.J. Svendsen y Carsten Rose, Science Tools 17 (1), 13 (1970)). Se utiliza adecuadamente una sola columna de gel-tampón, mezclándose los anfolitos de vehículo Ampholine con la muestra de proteína así como con el electrolito de terminación (tampón tris-(aminocaproato, pH 8,9). El electrolito de terminación, que conecta el sistema con el electrodo superior (cátodo), se deposita en capa por encima del gel. En el compartimiento inferior del electrodo de la columna (ánodo), se utiliza como electrolito de elución el tampón tris-sulfato (pH 7,1). La solución tampón se incluye en un recipiente externo y se mantiene en circulación con una bomba

diferencial eléctrica. La muestra, mezclada con el tampón tris- ξ -aminocaproato, se introduce en la columna por encima del gel con ayuda de un capilar que penetra a través de la capa superior de tampón tris- ξ -aminocaproato. Con el fin de facilitar la introducción de la muestra, la viscosidad de la misma se incrementa por adición de 3% de sucrosa. El gel se prepara a partir de una solución stock según el método de B.J. Davies (Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964)) utilizando tris-fosfato (pH 8,1) como tampón de gel, y se polimeriza solo mediante fotopolimerización. El material activo se eluye en el sistema anfólito vehículo Ampholyte, poco tiempo antes, o con el electrolito de terminación.

El eluido se transfiere, por vía de un absorptionometro UV, a un recogedor de fracciones, para proporcionar una estimación inicial de la separación (fracciones que contienen proteínas). Las fracciones activas se determinan finalmente por el ensayo con ciclasa de adenilato.

EJEMPLO 4 : Purificación de enterotoxina de Coli por cromatografía de afinidad.

La columna (10 ml de gel en una columna de cristal [1 x 20 cm₇]) se lava a temperatura ambiente, primeramente durante 2 días con metanol al 50% (V/V), luego durante 6 horas con 200 ml de hidrocloreuro de guanidina 6 M y a continuación durante 3 horas con 100 ml de tampón bicarbonato Krebs-Ringer pH 7,4. Se reciben 50 g de filtrado de cultivo liofilizado en 150 ml de tampón bicarbonato Krebs-Ringer y se dializa exhaustivamente a 4°C contra el tampón. La muestra se aplica a la columna la cual se desarrolla con una velocidad de flujo de 5 ml/hora a 4°C. Se lava con 500 ml de tampón NH₄HCO₃ 0,1 M, pH 8. La elución de la actividad

biológica se efectúa a temperatura ambiente con tampón NH_4HCO_3 0,1 M, pH 8, 0,1% de dodecil sulfato sódico (SDS). El material eluido con SDS se somete por separado al siguiente tratamiento, para la separación del SDS y la renaturalización, con una solución de urea (K. Weber, D.J. Kuter, J. Biol.Chem. 246 4504 [1971_7]).

La solución de proteína se pone en contacto con urea 6 M por adición de urea sólida, se incuba 30 minutos y se dializa contra la solución tampón A (tris-acetato 0,05 M, pH 7,8, urea 6 M). El SDS se separa en una columna Dowex 1 x 2, equilibrada con tampón A. El desarrollo de la columna se efectúa luego con el mismo tampón. La recuperación de la proteína de la solución de urea se efectúa a temperatura ambiente por dilución gota a gota en un tampón tris-acetato 0,05 M, pH 7,8, de modo que la dilución final sea al menos de 10 veces. La solución se concentra luego sobre un filtro Diaflo UM 10 a 4°C en una célula Amicon y se dializa a 4°C contra tampón tris-acetato 0,05 M pH 7,8, para separar el resto de la urea. El gel de la columna se puede obtener del siguiente modo:

A) Acoplamiento de gangliosido.

Se lava agarosa de albumina (25 ml) con agua y se suspende en una solución acuosa al 50% (V/V) de dioxano. A esta suspensión se añaden 50 mg del gangliosido deseado, por ejemplo monosialosil-gangliosido GM_1 (GGNSLC) ó G_{Gtet}^3 [SGGNSLC_7], y la mezcla se sacude durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la adición de 100 ml de 1-etil-3-dimetil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida, la suspensión se sacude durante 6 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se añaden 100 mg de la carbodiimida. Después

de sacudir durante 12 horas, el gel se lava con 500 ml de agua, 500 ml de metanol acuoso al 75% (V/V), 250 ml de hidrocloreuro de guanidina 6 M y 500 ml mas de agua. El contenido en gangliosido, determinado a partir de la diferencia entre el gangliosido añadido y el gangliosido sin reaccionar recuperado, es de forma grosera 0,5 mg/ml de gel. El acoplamiento se puede efectuar también haciendo reaccionar 20 mg de gangliosido y 5 mg de dicitclohexilcarboddimida en 10 ml de dioxano, durante 30 minutos a 15 °C. La mezcla se añade luego a 20 ml de agarosa de albúmina suspendido en dioxano a un volumen total de 40 ml. Después de 15 horas a temperatura ambiente, el gel se lava con 500 ml de dioxano, 500 ml de metanol al 90% (V/V) y, finalmente, con 250 ml de hidrocloreuro de guanidina 6M.

B) Acoplamiento de éster de N-hidroxisuccinimida de gangliosido.

Se hacen reaccionar 20 mg de gangliosido, por ejemplo como el de A), anterior, con 2,5 mg de N-hidroxisuccinimida y 2,5 mg de dicitclohexil carbodiimida, en 10 ml de dioxano, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se añade luego a 20 ml de agarosa de albúmina suspendidos en dioxano a un volumen final de 40 ml. Después de 15 horas de sacudir a 4°C, el gel se lava con 500 ml de dioxano, 500 ml de metanol al 90% (V/V) y con 250 ml de hidrocloreuro de guanidina 6 M.

C) Empleando anhídrido mixto de gangliosido.

Se añaden 100 µl de N-metilmorfolina 0,1 M en tetrahidrofurano a una solución de 20 mg del gangliosido, por ejemplo como en A) anterior, en tetrahidrofurano anhidro. La mezcla se agita durante 10 minutos a 10°C y se añaden

100 μ l de cloroformato de isobutilo 0,1 M en tetrahidrofurano. La mezcla se mantiene a 0°C durante 20 minutos y se añade luego a 20 ml de agarosa de albúmina suspendidos en dioxano a un volumen final de 40 ml. La mezcla se mantiene entonces a temperatura ambiente durante 15 horas y el gel resultante se lava en la forma descrita en A) anterior.

De forma análoga a los ejemplos A), B) y C) anteriores, se pueden preparar geles utilizando un copolímero de poli-L-lisil-DL-alanina y agarosa activada con cianobromuro en lugar de la agarosa de albúmina.

D) Preparación de un complejo de ácido graso-derivado de agarosa.

Se pueden producir derivados de aminoetilamino-, aminohexilamino- y aminodecilaminoagarosa de acuerdo con el método de Cuatrecasas y Anfinsen en Enzymology 22, 345 [1971], mediante activación de Sepharose 4B con 200 mg de CNBr/ml de resina a pH 11-11,5, y agitando a pH 10 y 3°C durante 15 horas con la correspondiente diamina. La proporción molar de hexano- o decano-diamina a CNBr es 1, mientras que la de etilendiamina a CNBr es de 5. El derivado de aminoalquilamino-agarosa se envejece durante 5 días y se hace reaccionar con 2-aminoetanol 1 M a temperatura ambiente, con el fin de saturar cualquier grupo activo remanente de Sepharose. El derivado resultante contiene aproximadamente 20 moles de grupos amino libres por ml de agarosa. El ácido graso deseado (por ejemplo, ácido palmítico), se acopla, mediante agitación, durante 3 días, de una mezcla del derivado de agarosa en 1,5 veces su volumen de una solución 0,1 M del jabón sódico del ácido graso a pH 10 y a 37°C, en presencia de 50 mg de etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbo-

diimida por ml de Sepharose. Se añade etanol al 25% para elevar la solubilidad del jabón. El producto se lava a 37°C con etanol al 50% (V/V), etanol-fosfato sódico 0,075 M (1:1), pH 2,4, y con etanol-NaOH 0,05 N. Los grupos sin reaccionar resultantes son saturados por acetilación con anhídrido acético.

EJEMPLO 5: Determinación del peso molecular por filtración con gel

Para la determinación del peso molecular de enterotoxina de E. Coli P263 (LT), se puede utilizar el método de filtración con gel. Se calibra una columna Sephadex G 150 por el método de P. Andrews (Biochem. J. 96, 595 [1965]) utilizando citocromo C de corazón de caballo (peso molecular $1,3 \times 10^4$), quimotripsinogeno A de páncreas bovino ($2,4 \times 10^4$), albúmina de pollo ($4,5 \times 10^4$), albúmina de suero bovino ($6,8 \times 10^4$), adolasa de músculo de conejo ($1,47 \times 10^5$) y catalasa de hígado bovino ($2,2 \times 10^5$) como proteínas comparativas (marcadores). Las proteínas son monitorizadas por su transmisión a 280 mμ.

Por otra parte, y para la preparación de la curva standard, se monitoriza agua tritiada ($1,11 \cdot 10^4$ dpm) por escintilación líquida y se utiliza una solución saturada de dextrano azul, empleándose su densidad óptica a 620 mμ en su detección.

La columna Sephadex se equilibra con 50 mM de tris-cloruro, pH 7,5, 100 mM de KCl y 2-mercaptoetanol 0,01 M. Todos estos materiales, en un volumen total de 0,7 ml, se transfieren a la columna y se eluyen en fracciones de 0,9 ml. El experimento se efectúa a 4°C. El peso molecular de la enterotoxina de E. Coli P263 (LT) se determina como 102.000 ± 3.000 (los límites de error experimental).

EJEMPLO 6: Determinación del peso molecular por electroforesis de gel de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio.

La electroforesis de gel de poliacrilamida en 0,1% de dodecil sulfato de sodio, se efectua a un pH de 7,2 en 7,5% de acrilamida, por el método de A.L. Shapiro, E. Vinuela, J. Maizel (Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 215 [1967]), y J. Weber, M. Osborn (J.B.C. 244, 4006 [1969]). Como standards se utilizan las siguientes proteínas: tripsinogeno de páncreas bovino (peso molecular de la cadena polipeptida = $2,4 \times 10^4$), dehidrogenasa de lactato de corazón bovino ($3,6 \times 10^4$), albúmina de suero bovino ($6,8 \times 10^4$), fosforifasa de músculo de conejo ($9,4 \times 10^4$) y β -galactosidasa de E. Coli ($1,3 \times 10^5$).

Para eliminar la posibilidad de una degradación proteolítica, se hierve durante 3 minutos una solución al 1% de la muestra (enterotoxina de E. Coli P263 (LT)) en dodecil sulfato de sodio y 2-mercaptoetanol. La muestra se dializa entonces contra una solución que consiste en 0,1% de dodecil sulfato de sodio y 2-mercaptoetanol, fosfato sódico 0,01 M, pH 7,1. Del mismo modo, se tratan las proteínas comparativas.

Según este método, el peso molecular de la enterotoxina E. Coli (LT) es de 102.000 ± 3.000 (límites de error experimental).

EJEMPLO 7 : Determinación del punto isoelectrico por focalización isoelectrica en gradiente de densidad de sucrosa.

Para determinar el punto isoelectrico de la enterotoxina purificada, la focalización isoelectrica

se efectua en una columna de cristal (tipo 8.100, 110 ml) según el método de O. Vesterberg y H. Svensson (Chem. Scand. 20, 820 [1966]). El electrolito anódico (ácido fosfórico) se localiza en el fondo del aparato. Los anfólitos vehículo Ampholine cubren una gama pH de 3 a 10. La densidad óptica se mide en 280 nm vaciando la columna a través de la célula de medición de un absortiómetro UV Uvicord II. El punto isoeléctrico de la proteína se determina a 4°C midiendo el pH de las fracciones eluidas con un microelectrodo combinado.

Según este método, el punto isoeléctrico de la enterotoxina E. Coli P263 (LT) es de 6,95.

EJEMPLO 8 : Determinación del punto isoeléctrico por focalización isoeléctrica en gel de poliacrilamida de capa delgada.

La enterotoxina se isofocaliza sobre una placa de gel de poliacrilamida al 5% según Z.L. Awdeh et.al. (Nature [London] 219, 66 [1966] y modificado por J. Bours y W.J. van Doorenmaalen (Science Tools 17, 36 [1970]). Se produce un gel de poliacrilamida de 26 x 12,5 cm y 1 mm de espesor con una concentración extrema de 2% de "anfólitos vehículos Ampholine" con una gama pH de 3-5, 5-7 y 7-10, en la proporción de 1:1:1. El gel se polimeriza durante 2 horas con riboflavina como fotocatalizador. De 10 a 25 ml de una solución al 0,1% de la muestra en 2% de Ampholine, pH 3-10, se colocan sobre tiras de papel Whatman 3 MM de 10 x 5 mm que se encuentran depositadas sobre el gel. La fotocalización isoeléctrica se efectua a 10°C en un aparato de electroforesis. Antes de fijar las placas de gel a los electrodos, estos últimos se cubren con tiras de papel de filtro de 0,5 x 25 cm, las cuales están humedecidas con

una solución de etilendiamina al 0,1% (V/V) (cátodo). La potencia inicial es de 50 mA (y se disminuye a 28 mA) durante 2,5 horas, a 210 voltios (cuya tensión se eleva a 1080 voltios). El gradiente de pH se establece con un electrodo de microsuperficie combinado. Después de la isofocalización, las proteínas se precipitan con ácido tricloroacético al 14% a 60°C. El gel se lava luego a temperatura ambiente con ácido tricloroacético al 10%, 5% y 3% durante 24 horas, con el fin de separar los anfólitos vehículo. El gel se mancha entonces con una solución al 0,05% de Coomassie Brilliant Blue R-250 (disuelto en metanol/ácido acético/agua-45/9/46), en 2 horas, seguido por lavado en el mismo disolvente. Para el re-hinchamiento, el gel se coloca en ácido acético/agua (9:91) y se fotografía a continuación. Según este método, el punto isoeléctrico de la enterotoxina de E. Coli P263 (LT) es de 6,95.

EJEMPLO 9 : Influencia del pH

En 6 tubos de ensayo, se colocan cantidades de 6 mg de enterotoxina Coli (en particular enterotoxina de E. Coli P263 (LT)) en 24 ml de solución tiroidea. El contenido de los tubos se lleva a pH 1, 3, 5, 6, 7 y 9 respectivamente, con HCl concentrado o NaOH 6N. Los tubos de ensayo se incuban a 4°C y cada tubo se lleva entonces a pH 7. El contenido de cada tubo se ensaya a continuación según los ensayos del lazo intestinal del conejo y cerdo en 2 ml (0,05 mg) por lazo intestinal.

La actividad enterotoxigénica de la enterotoxina E. Coli P263 (LT) es altamente labil a los ácidos. La actividad se destruye totalmente a pH 4 o menos y ya es influenciada a pH 6.

EJEMPLO 10: Influencia de la temperatura

Cantidades de 5 mg de la enterotoxina purificada (en particular enterotoxina P263 (LT)), se reciben, cada una, en 20 ml de solución tiroidea y se calienta a 40, 50, 60, 65, 70 y 100°C respectivamente, durante 30 minutos. Las soluciones calentadas son ensayadas según los ensayos del lazo intestinal en el conejo y cerdo con una solución sin tratar como control. Se administran 2 ml (0,05 mg) por lazo intestinal.

La actividad biológica de la enterotoxina se destruye totalmente por calentamiento durante 30 minutos a 65°C. El termo-labilidad es ya evidente a 50°C y la destrucción completa de la actividad se presenta principalmente ya a unos 60°C.

EJEMPLO 11: Evidencia de identidad inmunológica o inmunidad transversal.

La cepa E. Coli liofilizada P. 155, serotipo O149:K01, K88a, c o cepa patogénica humana E. Coli H 10407 o la cepa E. Coli K 12 Ent⁺ y la cepa E. Coli K 12 Ent⁻, se emplean para producir un filtrado de cultivo libre de células como anteriormente se ha descrito para la cepa P263. El filtrado de células sirve como muestra con una composición desconocida de antígeno Ag-X.

La identificación y cuantificación se efectúan empleando un antígeno de referencia, Ref-Ag (la enterotoxina Coli pura de la cepa P 263 o H 19) y un antisuero de referencia Ref-Ab (antisuero monovalente contra enterotoxina Coli).

Las dos cuestiones, si Ag-X contiene o no un antígeno que es "idéntico" a Ref-Ag, y, si es así,

5 como comparar la concentración de este antígeno con la concentración conocida de antígeno Ref-Ag, pueden resolverse mediante "crossed immunoelectrophoresis" [H.G.M. Clarke y T. Freeman, Clin. Sci. 35, 403 (1968)] y "tandem crossed electrophoresis" [Kroll J., A manual de Quantitative Immunoelectrophoresis, edt. N.H. Axelsen et al. Universitetsforlaget, Oslo, pag. 57 (1973), Suppl. 1/1973, Scandinavian J. Immun 7.

10 Con referencia a los dibujos adjuntos, el dibujo Abb. 1 muestra un esquema de "inmunoelectroforesis cruzada" de Ref-Ag, desarrollado contra Ref-Ab. Solamente ocurre un precipitado.

15 En el dibujo Abb. 2, se utiliza Ag-X en lugar de Ref-Ag. Sobre la base de la posición del precipitado en Abb. 2, puede decirse que Ag-X contiene un antígeno que es idéntico a Ref-Ag. Esta conclusión se puede reforzar por la reacción de la "identidad" utilizando "precipitados fusibles". Este experimento se puede efectuar con la ayuda de la "inmunoelectroforesis cruzada en tandem" (Abb. 3).
20 Comparando Abb. 3 con Abb. 1, puede observarse que Ag-X contiene Ref-Ag y que la concentración de este último en Ag-X es inferior que en Ref-Ag. La cuantificación de las crestas fusionadas se pueden efectuar por métodos standard (J. Kroll, J. Clin. Lab. Invest 22, 112 [1968]).

25 Si en este ensayo se utiliza la cepa E. Coli K 12 Ent⁻ de filtrado de cultivo en lugar Ag-X, no se presenta ningún precipitado en Abb. 2. Esto confirma que el precipitado que se presenta en Abb. 2 está asociado con las enterotoxinas de cepas patogénicas E. Coli.

30 La misma experimentación se puede llevar

a cabo para establecer la identidad inmunológica o inmunidad
cruzada de enterotoxina E. Coli patogénicas, humanas y por-
cinas. En este ensayo, la enterotoxina E. Coli P 263 (LT)
pura sirve como Ref-Ag y el antisuero monovalente contra la
5 enterotoxina P 263 sirve como Ref-Ab. La enterotoxina patogé-
nica humana H 19 sirve como muestra con composición descono-
cida de Ag-X. Como se ha descrito para Abb. 2, ocurre también
un sólo precipitado en el esquema de "inmunolectroforesis
10 cruzada" de Ag-X desarrollada contra Ref-Ab en la misma posi-
ción que en Abb. 1. Sobre la base de la posición de precipi-
tado, puede establecerse que Ag-X contiene un antígeno que
es idéntico a Ref-Ag. La reacción de la "identidad" utilizan-
do precipitados fusibles en la "inmunolectroforesis cruza-
da en tandem" muestra (como en Abb. 3) que Ag-X y Ref-Ag son
15 serológicamente idénticos.

A la vista de estos hallazgos, se pueden
utilizar las enterotoxinas Coli patogénicas, humanas o
porcinas, como antígenos para la inmunización o para propa-
rar toxoides.

20 Empleando la misma experimentación, se
puede investigar la cuestión de si existe o no entre enteroto-
xina E. Coli y enterotoxina V. cholerae, una identidad
inmunológica parcial o completa. La enterotoxina E. Coli
P 263 (LT) sirve como Ref-Ag, mientras que la antitoxina E.
25 Coli P 263 se utiliza como Ref-Ab y la toxina pura V. cholerae
sirve como muestra de antígeno Ag-X.

Los resultados se muestran en los dibujos
Abb. 4, 5 y 6. En la figura Abb. 4, ocurre, igual que antes,
un solo precipitado. En Abb. 5 ocurre de nuevo un solo pre-
30 cipitado, pero en una posición diferente y con una forma diferente

a la del precipitado de Abb. 4.

A partir de Abb. 6 ("inmunolectrofore-
sis cruzada en tandem") es evidente que existe una identidad
distinta y al menos parcial entre Ref-Ag y Ag-X (enterotoxina
de E. Coli y enterotoxina de V. Cholerae).

EJEMPLO 12 : Inmunización activa.

Cerdas de crianza son inseminadas artifi-
cialmente e inmunizadas por primera vez un mes antes del
momento de parir estimado: Se administra i.m. 0,95 mg de
enterotoxina de E. Coli purificada (en particular enteroto-
xina P 263 (LT)) junto con 15 ml de adyuvante completo de
Freund (7,5 ml de adyuvante + 7,5 ml de tampón NaCl 0,05 M,
 β -mercaptoetanol 10^{-2} M). Después de 2 semanas, se suministra
i.v. 0,35 mg mas de enterotoxina en 5 ml de solución de
cloruro sódico al 0,9%.

Debido a la identidad serológica entre
las enterotoxinas Coli patogénicas, porcinas y humanas, la
enterotoxina (LT) purificada de la cepa H 19 puede, por ejem-
plo, utilizarse alternativamente.

Trascurridas 6, 12 y 24 horas del parto
de las cerdas de crianza, se extrae el colostro y se reúne.
Trascurridas 56 horas desde el parto, se toma sangre para
la obtención de suero.

La determinación del título de anticuer-
pos puede efectuarse por el microensayo de floculación con
bentonita (ensayo SBF). Se obtienen los siguientes resulta-
dos:

	Tiempo	Título
Colostro	6 h	1:512
	12 h	1:512
	24 h	1: 64
Suero		1: 64

En los estudios de neutralización en el ensayo del lazo intestinal en el conejo, se puede usar suero de cerdo diluido 1:2. Tras el uso de una dosis de toxina de 0,25 mg/lazo (es decir, 3 unidades de toxina), se obtiene una inhibición de mas del 60%. Los correspondientes ensayos con colostro (6 horas post-parto) demuestran, en el modelo del conejo, una neutralización completa de la actividad de toxina.

(Una unidad de toxina se define como el valor ED_{50} en el ensayo del lazo intestinal o en el sistema de ciclasa de adenilato).

EJEMPLO 13 : Preparaciones de toxoide

Con el fin de conseguir las condiciones óptimas para la inactivación, sobre la base de un peso molecular de 102.000 para la molécula de toxina, las concentraciones de glutaraldehido se varían inicialmente desde 50 a 1.000 moles/mol de toxina. La reacción se efectúa usando una gama de concentración de toxina de 100 a 1.000 $\mu\text{g/ml}$, a 30°C, en un tampón PBS 0,065M pH 7,8 y durante varios tiempos de incubación. Las reacciones se detienen por dialisis dos veces contra 100 veces el volumen de tampón PBS pH 7,8. A una concentración de toxina superior a 600 $\mu\text{g/ml}$, el producto de reacción, al incrementar la concentración de glutaraldehido, comienza a ser insoluble. Si la concentración de toxina se mantiene entre 100 y 600 $\mu\text{g/ml}$ y la concentración de glutaraldehido varía entre 50 y 400 moles/mol de toxina, el producto de reacción permanece en forma soluble.

El ensayo con ciclasa de adenilato demuestra que la destoxificación óptima se consigue en la gama pH de 7,8 a 8,2. Si se elige una concentración de toxina de

400 a 600 mg/ml, la toxicidad residual (medida después de la incubación durante 72 horas a 30°C) disminuye 10 veces por cada incremento de 2 veces de la concentración de glutaraldehído entre 50 y 200 moles/mol de toxina. Si la concentración de glutaraldehído se eleva de 200 a 400 moles/mol de toxina, la actividad residual no es detectable incluso con los métodos mas sensibles (ensayo de ciclasa de adenilato).

Al objeto de detectar preparaciones de enterotoxina coli inactivada (toxóide) cuantitativamente, se determinan las unidades de toxina por el método de Craig (J.P. Craig, 1971, Cholera toxins, páginas 189-254 en S. Kadis et.al (edit), Microbial Toxins 2, Academic Press Inc. New York). Esta determinación está basada en la capacidad de las toxinas para reaccionar in vitro con la antitoxina.

El ensayo determina la disminución en la capacidad de neutralización de una cantidad conocida de antitoxina, después de la incubación con toxóide. Una serie de tubos de ensayo, conteniendo cada uno de ellos la misma cantidad de antitoxina (2AU/ml) y una dilución correspondiente de toxóide, se incuban cada uno a 37°C durante 30 minutos. Otra serie de tubos de ensayo sirve como control, conteniendo cada tubo la misma cantidad de antitoxina (2AU/ml) a la cual se ha añadido también, e incubándose bajo las mismas condiciones. Después de la incubación, se añaden, a los tubos de ensayo, volúmenes iguales de una dilución en serie 0,15 log de la toxina y se lleva a cabo la determinación con el ensayo de ciclasa de adenilato.

El desplazamiento de los valores del 50% en la curva dosis-actividad, se emplea entonces para determinar la cantidad de antitoxinas libres y ligadas en la mez-

cla antitoxina.toxoide. Un TU es la cantidad de toxoide que liga un AU de la antitoxina (AU = unidad de antitoxina).

EJEMPLO 14: Ensayo de ciclasa de adenilato

5 La producción de la preparación de ciclasa de adenilato en forma particulada se efectua por el método de Levey [G.S. Levey y E. Epstein, Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 990-995 (1968) y 28, 86-92 (1970)] usando tejidosmiocardial del gato. La activación de la ciclasa de adenilato por la enterotoxina coli, se determina por el ensayo de dilución con radiosotopos (A.G. Gilman. Proc. Nat. Acad. Sic. 67, 305-312 (1970)) usando 5-adenilimidodifosfato (AMP-PNP) como sustrato en lugar de ATP. El AMP-PNP se purifica antes de su uso mediante su paso a través de una columna de Dowex 10 50 x 2 en la forma H.

15 El medio de reacción comprende 50 mM de tampón tris-HCl (pH 7,4), 5 mM de MgCl₂, 10 mM de teofilina, 0,1% de albúmina de suero bovino y 2 mM de AMP-PNP. El volumen de incubación asciende a 0,1 ml en total y la concentración de enzima es de 0,15 mg de proteína por ensayo. La incubación se inicia por adición de la enzima y se efectua durante 30 minutos a 37°C. Para determinar la reacción, se añaden 500 µl de ácido tricloroacético al 7,5% y la mezcla se mantiene a 4°C durante 10 minutos. El precipitado se separa por centrifugación y la parte sobrenadante se añade a 5 ml de éter dietílico saturado con agua. Las capas se separan por centrifugación y se retira la fase éter. Después de un total de 3 extracciones con éter, la solución acuosa se reduce hasta sequedad a 60-70°C en un baño de agua con una corriente de aire. El residuo se disuelve en 1 ml de tampón 0,2M (pH 4).
25 La cantidad formada de cAMP, una medida directa del grado de
30

activación de ciclasa de adecilato por enterotoxina coli, se determina por medio del ensayo antes citado (disponible como un kit a partir de Boehringer Mannheim, Alemania Occidental).

EJEMPLO 15: Producción de una vacuna

5 Una solución de enterotoxoides (en particular enterotoxoides de E. Coli P 263 (LT) (1 mg/ml) se dializa exhaustivamente contra una solución de Na_2HPO_4 (0,07M) y se filtra sobre un filtro Seitz de esterilización. Se añade entonces el mismo volumen de una solución estéril de
10 CaCl_2 0,07M, para producir una vacuna absorbida sobre fosfato cálcico con un pH de 6,8 a 7. Para la inoculación, la vacuna se diluye y se administra en una dosis de 1 a 100 μg , por ejemplo.

EJEMPLO 16: Forma de aplicación oral

15 Cantidades liofilizadas de enterotoxoides (en particular, enterotoxoides P 263 (LT)) (por ejemplo, 100 μg -1 mg), se prensan en un núcleo de gragea con un filtro adecuado (que puede servir también como adyuvante) y se reviste con un polímero aniónico de ácido metacrílico y ésteres
20 de ácido metacrílico (por ejemplo, Eudragit L y S), con el cual se ha mezclado un agente de reblandecimiento. Los revestimientos de este tipo, protegen contra la acción de los jugos gástricos a causa de que los mismos son insolubles en la gama
25 ácida de pH e impermeables al agua; de este modo, los revestimientos son resistentes a los jugos gástricos. Después de pasar a través del estómago, los revestimientos se disuelven. Por ejemplo, las películas de Eudragit G se disuelven a la
30 gama neutra de pH a partir de pH 6 (jugos duodenales), mientras que las películas de Eudragit S son primeramente solubles en las regiones más bajas del intestino pequeño (a partir de pH 7).

NOTA .-

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; también se hace constar, que el invento corresponde a solicitudes de patentes, presentadas en Suiza, bajo los nos. 14671/74, de 1 de noviembre de 1.974; 16458/74, de 11 de diciembre de 1.974; 16459/74, de 11 de diciembre de 1.974 y 06040/75, de 12 de mayo de 1975, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los 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 EL AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ENTEROTOXINA DE E. COLI, caracterizándose por lo siguiente:

1ª.- Procedimiento para el aislamiento y purificación de enterotoxina de E. Coli, a partir de un filtrado de cultivo, libre de células, en bruto o pre-purificado, de un cultivo de fermentador de una cepa enterotopogénica de E. Coli, caracterizado porque comprende someter dicho filtrado de cultivo a separación isotacoforética.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque comprende someter el filtrado de cultivo a separación isotacoféretica empleando gel de poli-acrilamida como medio soporte y anfólitos vehículos ampholine como sustancias tampón y separadora.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, caracterizado porque el electrolito de terminación es tampón tris- ϵ -aminocaproato de pH 8,9 y el electrolito de

elución es tampón tris-sulfato de pH 7,1.

5 4*.- Procedimiento según la reivindicación 1*, 2* ó 3*, caracterizado porque las fracciones separadas resultantes se ensayan con respecto a la actividad de enterotoxina de E. Coli, sometiéndose entonces una o mas - fracciones que tienen la actividad deseada a una separación isotacoforética adicional.

10 5*.- Procedimiento según la reivindicación 4*, caracterizado porque la separación isotacoforética adicional se efectua utilizando gel de poliacrilamida como medio soporte, anfólitos vehiculos Ampholine como sustancias tampón y separadora, tampón tris- ϵ -aminocaproato de pH 8,9 como electrolito de terminación y ácido tris-2-(N-morfolino) etano-sulfónico de pH 6,2 como electrolito de elución.

15 6*.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las fracciones resultantes que contienen enterotoxina E. Coli se filtran con gel para separar los anfólitos vehiculo Ampholine.

20 7*.- Procedimiento según la reivindicación 6*, caracterizado porque las fracciones se filtran con gel sobre Sephadex G-50.

25 8*.- Procedimiento para el aislamiento y purificación de enterotoxina de E. Coli a partir de un filtrado de cultivo, libre de células, en bruto o pre-purificado, de un cultivo de fermentador de una cepa enteropatogénica de E. Coli, caracterizado porque comprende someter dicho filtrado de cultivo a separación cromatográfica de afinidad.

30 9*.- Procedimiento según la reivindicación 8*, caracterizado porque el ligando de afinidad es un fosfolípido o glicolípido que contiene grupos carboxílico

libres.

10*.- Procedimiento según la reivindicación 9*, caracterizado porque el ligando de afinidad es un gangliosido.

5 11*.- Procedimiento según la reivindicación 10*, caracterizado porque el gangliosido es gangliosido GM₁ [GGNSLC] o G_{tet}³ [SGGNSSLC].

10 12*.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8* a 11*, caracterizado porque la matriz insoluble a la cual se liga el ligando de afinidad, para formar la resina de afinidad, es agarosa de albúmina, o un derivado de agarosa producido por acoplamiento de una poli-L-lisil-DL-alanina a agarosa activada con cianobromuro.

15 13*.- Procedimiento según la reivindicación 8*, caracterizado porque la resina de afinidad es un complejo de ácido graso-aminoalquilaminoagarosa.

20 14*.- Procedimiento según la reivindicación 13*, caracterizado porque la resina de afinidad es un complejo de ácido palmítico y un derivado de aminoalquilamino agarosa formado a partir de Sepharose y etilendiamina, hexanodiamina o decanodiamina.

25 15*.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8* a 14*, caracterizado porque la elución se efectúa con dodecil sulfato de sodio, renaturalizándose a continuación la enterotoxina eluida resultante.

30 16*.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el filtrado de cultivo, libre de células, en bruto, se pre-purifica por filtración con gel.

17*.- Procedimiento según la reivindicación

ción 16^a, caracterizado porque el filtrado libre de células, en bruto, se pre-purifica mediante filtración con gel sobre Bio-Gel A-5m.

5 18^a.- Procedimiento según la reivindicación 17^a, caracterizado porque la filtración con gel sobre Bio-Gel A-5m se efectúa utilizando un tampón alcalino.

19^a.- Procedimiento según la reivindicación 18^a, caracterizado porque el tampón es bicarbonato amónico de pH 7,9 a 8.

10 20^a.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 17^a a 19^a; caracterizado porque las fracciones resultantes se ensayan con respecto a la actividad de enterotoxina, sometiéndose una o más fracciones que contienen la actividad deseada a una pre-purificación adicional mediante filtración con gel.

15 21^a.- Procedimiento según la reivindicación 20^a, caracterizado porque la pre-purificación adicional por filtración con gel se efectúa sobre Sephadex G-75 utilizando un tampón alcalino.

20 22^a.- Procedimiento según la reivindicación 21^a, caracterizado porque el tampón alcalino es tampón tris-HCl de pH 8.

25 23^a.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el filtrado de cultivo, libre de células, que contiene enterotoxina, se obtiene cultivando durante tres generaciones la cepa enteropatógena E. Coli en un caldo de soja tripticasa o en un caldo de soja de tripticasa ultrafiltrado como medio.

30 24^a.- Procedimiento según la reivindicación 23^a, caracterizado porque la primera etapa del cultivo

se efectua durante 4 a 6 horas, la segunda hasta que el cultivo alcanza la mitad de la fase logarítmica y la tercera durante 8 a 10 horas.

5 25*.- Procedimiento según la reivindicación 23* ó 24*, caracterizado porque el filtrado de caldo en bruto, resultante, se ultrafiltra, en presencia de isotionato de pentamidina y a continuación se desalifica.

10 26*.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las fracciones separadas se ensayan con respecto a la actividad de enterotoxina de E. Coli mediante incubación de un preparado de ciclasa de adenilato miocardial de gato durante un tiempo predeterminado, en presencia de la muestra a ensayar, y midiendo el incremento en la actividad de ciclasa de adenilato en el producto resultante con respecto a un control.

15 27*.- Procedimiento según la reivindicación 26*, caracterizado porque la incubación se efectua en presencia de un sustrato cuya conversión a monofosfato cíclico de 3', 5'-adenosina se cataliza por ciclasa de adenilato, determinándose el incremento en actividad de ciclasa de adenilato midiendo el incremento en la cantidad de monofosfato cíclico de 3', 5'-adenosina en el producto resultante, con respecto a un control.

20 28*.- Procedimiento según la reivindicación 27*, caracterizado porque el sustrato es trifosfato de adenosina o 5'-adenilimidodifosfato.

25 29*.- Procedimiento según la reivindicación 27*, ó 28*, caracterizado porque la incubación se efectua en un medio de reacción que comprende tampón tris-HCl de pH 7,4, cloruro de magnesio, albúmina de suero bovina y teo-

30

filina.

30*.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 26* a 29*, caracterizado porque la incubación se efectúa a 37°C y durante 5 a 30 minutos

5

31*.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 26* a 30*, caracterizado porque la preparación de ciclasa de adenilato miocárdial de gato, se obtiene en forma particulada a partir del tejido miocárdial del gato.

10

32*.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cepa enteropatógena E. Coli es P 263, P 155, P 307, H 10407, H 19 o Ent⁺ o Ent⁻K12, habiendo sido transferido el plasmóide Ent a partir de H 19.

15

33*.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cepa enteropatógena E. Coli es P263.

20

34*.- Procedimiento para el aislamiento y purificación de enterotoxina de E. Coli; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

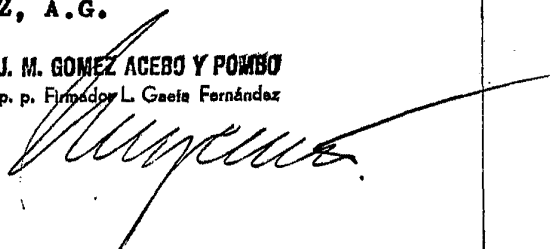
Esta Memoria consta de 43 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

14 ABR. 1977

SANDOZ, A.G.

J. M. GOMEZ ACEBO Y POMBO
p. p. Firmado por L. Caseta Fernández



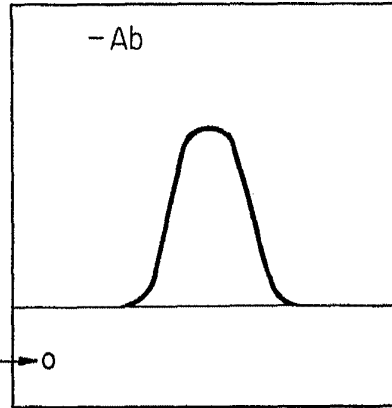


FIG. 1.

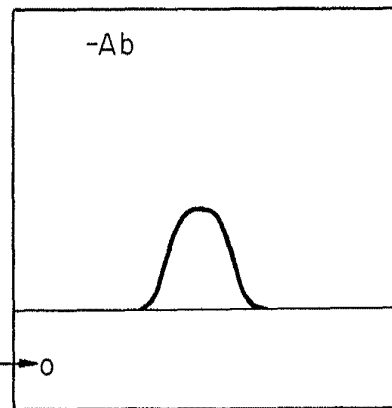


FIG. 2.

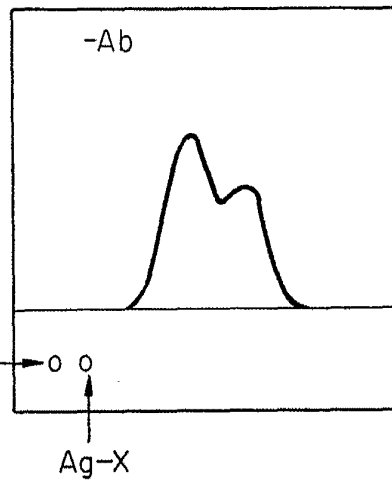


FIG. 3.

ESCALA VARIABLE

1957

Madrid
J. M. GOMEZ AGOSTO
Firmado: L. Ceala Ferrnandez

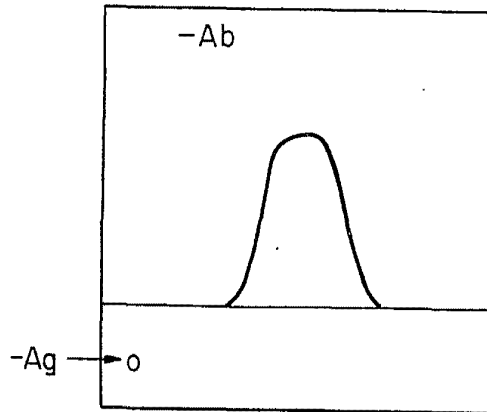


FIG. 4.

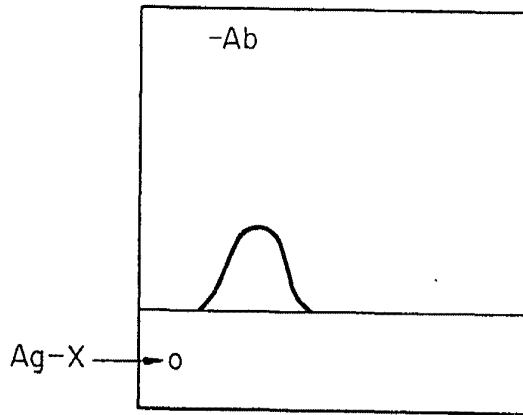


FIG. 5.

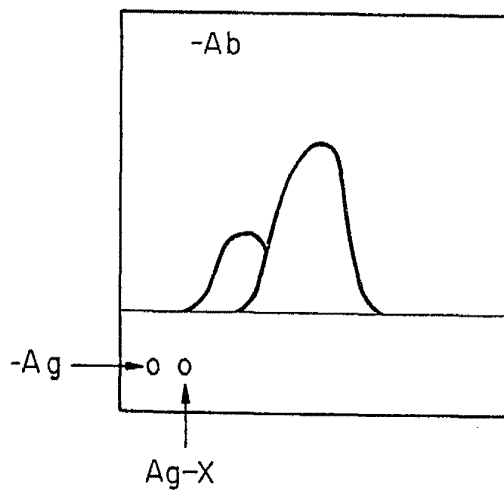


FIG. 6.

ESCALA
VARIABLE

Madrid

J. M. GÓMEZ ACEBO Y PARRAS
p. p. Firmado: L. G. Fernández