

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

10	ES	11	NUMERO	448827	A1
		21			
		22	FECHA DE PRESENTACION	11 junio 1.976	



PATENTE DE INVENCION

60 PRIORIDADES:		
61 NUMERO	62 FECHA	63 PAIS
25221/75	12 junio 1.975	INGLATERRA
67 FECHA DE PUBLICIDAD	64 CLASIFICACION INTERNACIONAL	68 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	AG1K	
69 TITULO DE LA INVENCION		
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA COMPOSICION ANTIGENICA		
71 SOLICITANTE (S)		
UNILEVER N.V.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Burgmeester s'Jacobplein 1, Rotterdam, Holanda.		
72 INVENTOR (ES)		
STEPHEN HOWELL PARRY y PHILIP PORTER, ambos británicos.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU.		



1

Esta invención se refiere a composiciones antigénicas.

5

La invención proporciona una composición antigénica que comprende un antígeno en especial un factor de adhesión bacteriana enteropatógeno, selectivamente adsorbido sobre eritrocitos no modificados (glóbulos rojos) y es el resultado de nuestro descubrimiento de que ciertos eritrocitos no modificados poseen centros receptores selectivos en sus superficies y con ello son capaces de formar complejos con proteínas particulares. Por "eritrocitos no modificados" entendemos los eritrocitos que poseen características superficiales naturales para distinguirlos de los eritrocitos modificados, por ejemplo los eritrocitos cuyas superficies han sido químicamente modificadas por contacto con materiales como formaldehído, ácido tánico o glutaraldehído y por ello han perdido su capacidad natural para formar selectivamente complejos con las proteínas. Para cualquier antígeno dado, puede haber muy pocos tipos de eritrocitos - quizá solamente uno - que sean capaces de adsorber selectivamente ese antígeno particular. Para cualquier antígeno dado, los eritrocitos apropiados pueden ser encontrados seleccionando los tipos posibles de eritrocitos para hallar aquellos que son aglutinados por una solución acuosa del antígeno adoptando un procedimiento como el que se describe más adelante aquí.

10

15

20

25

30

Por razones de sencillez, la invención será descrita con detalle en relación con las cepas enteropatógenas de E. coli que están especialmente implicadas en la diarrea neonatal de los cerdos. La infección de los cerditos recién nacidos con estas cepas puede conducir rápidamente a la deshidratación y muerte del animal y por lo tanto representa un grave problema en la producción de cerdos para alimentación.



1 Entre las cepas productoras de enterotoxinas más frecuentemen
te encontradas en la diarrea neonatal se encuentran las si-
guientes:

Clasificación internacional de serotipos

- 5 08:K87 (B), K88a,b (L)
08:K87 (B), K88a,c (L)
045a,c:K "E65", K88a,c (L)
0138:K81 (B), K88a,c (L)
0141:K85a,b (B), K88a,b (L)
10 0147:K89 (B), K88a,c (L)
0149:K91 (B), K88a,c (L)
0157:K "V17", K88a,c (L).

15 En la diarrea neonatal del cerdo, el intestino delgado anterior es colonizado por una o más de estas cepas y se ha postulado que su resistencia a la separación del intestino delgado por peristalsis es debida a sustancias adhesivas presentes en la superficie de la bacteria. Además, se ha observado que todas estas cepas sintetizan uno u otro de dos
20 antígenos superficiales proteicos estrechamente relacionados denominados K88a,b y K88a,c, que son esencialmente insolubles entre pH 3,5 y 5,5, son de elevado peso molecular (con un coeficiente de sedimentación de alrededor de 35S) y termolábiles, siendo desnaturalizados cuando se calientan por encima de 70°C. Se ha sugerido que son estas sustancias las responsables de las propiedades de adhesión al intestino de las
25 cepas enteropatogénicas de E. coli.

30 En la bibliografía se encuentran varias referencias a la administración experimental de vacunas (es decir, composiciones de antígeno) que contienen antígeno K88 a las cerdas preñadas con objeto de que puedan generarse anticuerpos



1 protectores adicionales en el sistema inmune circulatorio de
la cerda y, después del parto, puedan pasar al calostro (pri-
mera leche) y de esta forma sean suministrados a los puntos
de colonización por E. coli en el intestino del cerdito lac-
5 tante. Sin embargo, se ha admitido (véase J.M. Rutter,
"Escherichia coli infections in piglets: Pathogenesis, viru-
lence and vaccination" en The Veterinary Record, 22 de Febre-
ro de 1975, 96, 171-175) que se han obtenido resultados varia-
bles con estas vacunas: los experimentos con ellas producen
10 algunas veces resultados positivos y otras no.

Esta invención proporcionará composiciones antigénicas
mejoradas para la administración a las cerdas preñadas y es
el resultado de nuestro descubrimiento de que el factor de
adhesión/K88a,b es intensamente adsorbido de los medios acuo-
15 sos sobre ciertos eritrocitos no modificados (glóbulos rojos),
especialmente los del pollo; que el complejo así producido es
intensamente inmunogénico y que los anticuerpos producidos
por administración parenteral del complejo inhiben la adhesión
al intestino del cerdito de todas las cepas de E.coli antes
20 citadas, tanto si el antígeno K88 presente sobre la superfi-
cie de estas cepas es K88a,b o K88a,c.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la
invención, se proporciona una composición antigénica que com-
prende eritrocitos no modificados sobre los que está adsorbi-
do el factor de adhesión/K88a,b.
25

Preferiblemente, la relación entre el factor de adhe-
sión/K88a,b adsorbido y el volumen de eritrocitos en la compo-
sición está comprendido entre 125 y 800 unidades por milili-
tro y se prefiere especialmente una relación comprendida en-
30 tre 400 y 800 unidades/ml. Puede encontrarse en la composición



1 un factor de adhesión en una relación superior a 800 uni-
dades/ml pero el exceso no es adsorbido en su mayor parte
sobre los eritrocitos y no es utilizado inmunológicamente
tan eficazmente como el material adsorbido. Las unidades a
5 que nos hemos referido (unidades de hemoaglutinación) se mi-
de por el procedimiento convencional en inmunología pero adap-
tado a este caso y está ilustrado en el Ejemplo 1 en esta me-
moria.

10 La composición antigénica puede ser una composición
acuosa sencilla o puede contener una fase de aceite coadyuvan-
te, tal como aceite mineral o aceite de aráquida, cuya pre-
sencia permite mejorar la respuesta de anticuerpo (mejorada
en comparación con la de la composición acuosa sencilla) que
se obtiene por administración por inyección. En la forma pre-
15 ferida, la composición es una emulsión múltiple de aceite en
agua, del tipo descrito en general en la memoria de la paten-
te británica n°1.080.994. En esta forma, la fase continua es
una fase acuosa (tal como agua estéril, solución salina fi-
siológica o solución reguladora de fosfato) y el material anti-
20 génico (en nuestro caso complejo de factor de adhesión/K88a,b-
glóbulo rojo) está presente en otra fase acuosa (secundaria)
que a su vez está dispersa en una fase dispersa primaria de
aceite.

25 Para preparar la composición antigénica, se pone en
contacto una solución acuosa exenta de células que contiene,
el factor de adhesión/K88a,b con eritrocitos no modificados,
especialmente eritrocitos de pollo no modificados, en condi-
ciones tales que el factor de adhesión/K88a,b se adsorbe en
los eritrocitos. La solución acuosa exenta de células puede
30 prepararse a su vez a partir de una cepa K88a,b (conveniente-



1 mente las cepas enterotóxicas G7 o G68 tipo 1, que pueden ob-
tenerse del Central Veterinary Laboratory, Ministry of Agri-
culture and Fisheries, New Haw, Welbridge, Surrey, Inglaterra,
siguiendo el procedimiento general descrito por Stirm, Orskov
5 Orskov y Mansa en J. Bacteriology, 93,731-739. Estos proce-
dimientos suponen la liberación del material K88 de las su-
perficie de las bacterias y su paso al agua, por ejemplo ca-
lentando las materias vivas en un medio acuoso regulado a
pH 6-9 a 60-65°C durante 15 minutos o más o aplicando una
10 fricción a la superficie de las bacterias en el tampón acuo-
so, por ejemplo en una mezcladora Waring. Se separan las bac-
terias después, por filtración o centrifugación, de los extrac-
tos acuosos de K88 así obtenidos. El material K88 presente
en los extractos exentos de células puede ser purificado si
15 se desea (por ejemplo para análisis) por precipitación iso-
eléctrica repetida (pH alrededor de 5) y redisolución. A gran
escala, puede cultivarse una cepa K88a,b de E. coli en un me-
dio convencional de hidrolizado de caseína/sacarosa, suplemen-
tado con los aditivos habituales como vitaminas, en condicio-
20 nes de aireación (v.g. 3 litros/minuto/10 litros de medio)
con agitación constante, control del pH (alrededor de 7) y
control de la temperatura (37°C). El cultivo resultante se
recoge a las 24 horas y se centrifuga para sedimentar las
bacterias. Después estas se suspenden en solución salina 0,15M
25 al 3 % del volumen del cultivo original y a continuación se
calientan a unos 60°C para liberar el factor de adhesión al
medio acuoso. Los residuos celulares se separan por centrifuga-
ción y el líquido que sobrenada se analiza para determinar su
contenido en factor de adhesión y después este último se adsor-
30 be sobre eritrocitos de pollo.



1

Por administración parenteral de la composición anti-
génica a conejos, ovejas, ratas, cerdos, etc, de forma total-
mente convencional, se producen antisueros que pueden ser
administrados por vía oral a los cerditos recién nacidos para
5 combatir la diarrea neonatal. Sin embargo, la mejor forma de
utilizar las composiciones es mediante administración paren-
teral a las cerdas preñadas unas 3 semanas antes del parto
(es decir, unos 95 días antes de la monta por el macho) de
manera que en el momento del parto el calostro contiene una
10 concentración efectiva de anticuerpos del factor de adhe-
sión/K88a,b de cepas enterotóxicas de E. coli.

10

La invención es ilustrada mediante los siguientes
ejemplos.

EJEMPLO 1

15

a. Preparación y aislamiento del factor de adhesión/K88a,b

20

Un cultivo puro de la cepa G7 de E. coli, clasifi-
cación internacional de serotipo 08:K87 (B) K88a,b (L), se sub-
cultiva en caldo nutriente y se incuba a 37°C durante la no-
che. Se inoculan intensamente unos medios inclinados de
agar nutriente en matraces Roux con el cultivo y se incuba a
20 37°C durante 24 horas. El crecimiento en la superficie con-
fluente se lava y se recoge asépticamente utilizando solución
reguladora estéril de fosfato 0,1M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), pH 7,5,
y la suspensión bacteriana resultante se calienta a 60°C du-
25 rante 30 minutos para liberar el factor de adhesión/K88a,b de
las superficies celulares. Se separa el material celular por
centrifugación (300G; 10 minutos) y después de la adición de
azida sódica (0,2 %) para impedir el crecimiento bacteriano,
el líquido que sobrenada se conserva a 4°C durante 3 días.

25

30

Las impurezas que se han sedimentado se separan después por



1

5

10

15

20

25

30

centrifugación y se agrega ácido acético diluido al líquido sobrenadante continuamente agitado para reducir el pH a 5. (El punto isoeléctrico del factor de adhesión/K88a,b está comprendido entre 4,5 y 5,5). El material precipitado se deja en reposo durante 24 horas a 4°C, después se recoge por centrifugación y se lava dos veces con solución reguladora 0,005M de McIlvaine (Na₂HPO₄/ácido cítrico), pH 5,0. Se purifica por dialisis (empleando solución salina 0,15M regulada con fosfato a pH 7,2) y precipitaciones repetidas (solución reguladora 0,15M de McIlvaine, pH 5,0). Finalmente el material precipitado se disuelve en solución salina 0,15M regulada con fosfato a pH 7,2 y se almacena a -20°C.

b. Análisis del factor de adhesión/K88a,b en una solución de concentración desconocida

Este análisis puede ser utilizado como ensayo selectivo para identificar los eritrocitos no modificados que son capaces de adsorber selectivamente un antígeno dado. Se diluye en serie una porción de 0,05 ml de la solución (Y) que ha de ser analizada con solución salina regulada con fosfato a pH 7,1 en depresiones (pozos) sucesivas de una placa de microvaloración para obtener una serie de soluciones con una concentración del factor de adhesión igual a 1/2, 1/4, 1/8... 1/2ⁿ de la solución Y. A cada una de estas soluciones se añaden 0,025 ml de una suspensión al 2 % de eritrocitos de pollo en la misma solución reguladora, lavada tres veces (con solución salina regulada con fosfato a pH 7,1). La placa se sacude mecánicamente y el contenido de las depresiones se deja sedimentar. Al cabo de media hora se examina la placa. En las soluciones más concentradas (las que se encuentran en las depresiones llenadas en primer lugar) se produce aglutinación de los eritrocitos.



1 de pollo pero no en las más diluidas y el punto final de la
valoración (determinado a la temperatura ambiente) se toma co-
mo la solución en la que solo se produce justamente la hemo-
aglutinación. En un procedimiento típico, el punto final
5 puede encontrarse en la depresión decimotercera y el título
de la solución Y sería entonces 2^{13} (= 8192, es decir,
8000, correspondiente a 8000 unidades de hemoaglutinación
(HA) por mililitro).

EJEMPLO 2

10 Preparación de una vacuna simple acuosa de eritrocitos de pollo

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1b, se ana-
liza una solución preparada de acuerdo con el Ejemplo 1a y
se encuentra que presenta un título de factor de adhesión/
K88a,b de 8000. A partir de esta solución se prepara una va-
cuna diluyendo primero 1 ml de la solución hasta 10 ml con
solución salina regulada con fosfato a pH 7,1 (SRP) y des-
pués agitando la solución diluida (Z) durante media hora a
15 37°C con 10 ml de eritrocitos de pollo compactados, lavados
tres veces (SRP), obtenidos por centrifugación (1000 G, 10
minutos). Este procedimiento conduce a una saturación sustan-
cial de las superficies de los eritrocitos de pollo con el
factor de adhesión, es decir, en el punto de saturación hay
20 8000 unidades HA de factor de adhesión por cada 10 ml de
glóbulos rojos de pollo.

25 Se agrega azida sódica (0,2 % en peso) a la vacuna
resultante, que se almacena a 4°C hasta que se requiere pa-
ra uso.

30 La vacuna así obtenida es administrada adecuadamen-
te a cerdas preñadas a una dosis de 2 ml. A este nivel de do-



1 sis, produce alrededor de 10 veces el efecto generador de anticuerpos de la solución Z (que no contiene eritrocitos) a partir de la cual ha sido preparada.

5 En lugar de utilizar azida sódica como preservativo como se ha descrito antes, la vacuna puede ser tratada con formalina (solución acuosa de formaldehído al 40 %), adecuadamente en la proporción de un volumen de formalina por cada 100-50 volúmenes de la vacuna.

EJEMPLO 3

10 Este ejemplo ilustra la preparación de vacunas que contienen un aceite coadyuvante.

15 i) se disuelve 1 ml del emulgente de monooleato de manida vendido con el nombre de "Arlacel A" en 9 ml de un aceite mineral de calidad farmacéutica. Después la solución oleosa se agrega a un volumen igual de la vacuna acuosa simple de eritrocitos de pollo obtenida de acuerdo con el Ejemplo 2. Se mezcla en un homogeneizador para formar una emulsión cremosa de agua en aceite.

20 ii) se añade un volumen de la vacuna de agua en aceite de i) a un volumen igual de una solución al 2 % del emulgente monooleato de polioxietilensorbitano, vendido bajo el nombre de "Tween 80", en solución salina 0,15M. Se mezcla en un homogeneizador.

25 La vacuna de baja viscosidad de agua en aceite en agua así formada se inyecta a las cerdas intramuscularmente, a una dosis de 8 ml, tres semanas antes del parto (es decir, unos 95 días después de la monta por el macho). La actividad antiadhesiva así generada estaba asociada a las tres clases de anticuerpos (IgG, IgM e IgA), proporcionando un amplio espectro de actividad anticuerpo y se compara a continuación

30



1

con la correspondiente actividad en un grupo de control de cerdas preñadas no tratadas.

5

	<u>Actividad antiadhesiva</u>	
	<u>En el suero</u>	<u>En el calostro</u>
Cerdas vacunadas	256	512
Cerdas no vacunadas	4-8	32

10

La actividad antiadhesiva en el suero de los cerditos amamantados por las cerdas vacunadas fué de 128 unidades; para el suero de los cerditos amamantados por las cerdas no tratadas fué solamente de 32 unidades. Los cerditos amamantados por las cerdas vacunadas eran mucho más resistentes que los amamantados por las cerdas no vacunadas a la infección por cepas enterotóxicas K88a,b y K88a,c de E.coli.

15

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

20

1. Un procedimiento para la preparación de una composición antigénica caracterizado por la operación de adsorber selectivamente un antígeno sobre eritrocitos no modificados.

25

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado porque el antígeno es un factor de adhesión bacteriano enteropatogénico.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 2, caracterizado porque el antígeno es un factor de adhesión de una cepa enteropatogénica de E. coli.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 3, caracterizado porque el antígeno es un factor de adhesión/ K88a,b.


30



1

5. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque los eritrocitos son eritrocitos de pollo.

5

6. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque la relación de antígeno adsorbido a volumen de eritrocitos presente está comprendida entre 125 y 800 unidades por mililitro.

10

7. Un procedimiento según la Reivindicación 6, caracterizado porque la relación de antígeno adsorbido a volumen de eritrocitos presente está comprendida entre 400 y 800 unidades por mililitro.

15

8. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque la composición resultante es una composición acuosa simple.

20

9. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la respuesta anticuerpo de la composición es mejorada incorporando a la misma una fase oleosa.

25

10. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque se pone en contacto una solución acuosa del antígeno con los eritrocitos no modificados.

11. Un procedimiento según la Reivindicación 10, caracterizado porque se pone en contacto una solución acuosa exenta de células de factor de adhesión/K88a,b con eritrocitos de pollo no modificados.

12. Un procedimiento para reducir la incidencia de la diarrea neonatal en cerdos, caracterizado por administrar parenteralmente a las cerdas preñadas una vacuna que contiene factor de adhesión/K88a,b adsorbido sobre eritrocitos de



1 pollo no modificados de forma que en el momento del parto el
calostro contiene una concentración efectiva de anticuerpos
del factor de adhesión/K88a,b de las cepas enterotóxicas
de E. coli.

5 13. Un procedimiento según la Reivindicación 12,
caracterizado porque la vacuna es administrada parenteralmen-
te a las cerdas unas 3 semanas antes del parte.

10 14. Se reivindica por último como objeto sobre el
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita
por UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA COMPOSICION
ANTIGENICA.

15 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de trece hojas me-
canografiadas.

Madrid, 11 de Junio de 1976

BERNABO UNGRIA
P.P.



20

25

30

