

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



CONCEDIDA

26 ENE. 1978

PATENTE DE INVENCION

ES

11

21

22

458038

A 1

FECHA DE PRESENTACION

- 6 ABR. 1977

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
76 10455	9 abril 1976	Francia
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K 5/00, A61K 39/12	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE AGENTES INMUNOGENOS CONTRA LA PESTE PORCINA"		
71 SOLICITANTE (S)		
AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (A N V A R)		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
92522 NEUILLY SUR SEINE (FRANCIA) 13 rue Madeleine Michelis		
72 INVENTOR (ES)		
D. Louis DHENNIN, D. Bertrand LARENAUDIE y D. Michèle REMOND		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
D. Alfonso Durán Olivella.		

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente Patente de Invención se refiere a un procedimiento para la preparación de agentes inmunógenos contra la peste porcina y permite conseguir nuevos agentes inmunógenos para dicha aplicación.

5. Las medidas profilácticas contra la peste porcina evolucionan en Francia en función de los riesgos de propagación de la misma. En 1964, después de una epizootia constatada cuyo origen era la llamada peste porcina "africana", las autoridades correspondientes
10. decidieron el sacrificio de los animales de las cuadras infectadas. Estas medidas drásticas habían permitido la erradicación de la enfermedad así como simultáneamente la de la peste porcina llamada clásica o "europea" que aparecía anteriormente de manera endémica. Habiendo
15. desaparecido la infección, se han dejado de aplicar las medidas mencionadas. Después de ello, se ha constatado la renovación en Europa de focos de peste porcina clásica. Por el número limitado de casos registrados, del
20. orden de una veintena al mes en Francia, la política de sacrificio, cuyo coste es relativamente elevado no se ha puesto en vigor y actualmente, la profilaxia pasa por la vacunación preventiva de los animales.

25. Actualmente, las vacunas conocidas están constituidas por preparados que contienen virus vivos modificados.

Para conseguir dichos virus modificados se utilizan principalmente cepas que hayan sufrido un

número importante de pasos por animales no receptores tales como el conejo. También se ha propuesto utilizar virus mutantes conseguidos por cultivo a temperaturas inferiores a las normales.

5. Las ventajas de las vacunas vivas son esencialmente la rapidez y la duración (1 a 2 años) de la protección conseguida. No obstante, estas vacunas vivas no son según parece capaces de provocar la erradicación completa de la enfermedad. Incluso se ha adelantado la hipótesis
10. de que esta población vírica que se ha extendido por la vacunación, por modificaciones inversas de las que han llevado a su "modificación", podría conducir al desarrollo natural de variedades patógenas, cuando vuelve a encontrar condiciones favorables y principalmente con
15. sujetos receptivos. La utilización de la vacuna que contiene virus inactivados no presenta este tipo de riesgos y su utilización es por lo tanto particularmente deseable.

20. Cronológicamente, las primeras vacunas utilizadas contra la peste porcina eran del tipo de virus inactivado. Estaban constituidas por homogeneizados de bazos de animales infectados activados con ayuda de cristal violeta (cloruro de metilrosanilinio). Su utilización ha sido no obstante abandonada dando preferencia a las
25. vacunas que contienen los virus modificados. En efecto, la preparación y utilización de estas vacunas rudimentarias, que constituyen los homogeneizados inactivados, presentan grandes dificultades. Em primer lugar, es nece-

sario disponer de modo continuo de animales donadores infectados; en segundo lugar en razón misma de su modo de obtención es practicamente imposible conseguir preparados que presenten características bien definidas. Las vacunas de ese tipo no pueden evidentemente ser convenientes para tratamientos organizados de modo sistemático.

Recientemente, han tenido lugar diversos intentos para preparar una vacuna inactivada que responda a las condiciones exigidas en la práctica. Hasta la actualidad, ninguna ha permitido la puesta a punto de técnicas convenientes, es decir, que lleguen a conseguir una vacuna eficaz, exenta de cualquier riesto patógeno y cuyas características sean bien definidas y reproducibles.

La presente Patente tiene por finalidad proporcionar un procedimiento para la obtención de agentes inmunógenos contra la peste porcina constituidos a partir de virus inactivados que respondan a las exigencias dichas.

El procedimiento de preparación de agentes inumógenos contra la peste porcina según esta Patente se caracteriza por la realización de una inactivación de cultivo de virus patógenos de la peste porcina con ayuda de un agente alquilante, escogiéndose la naturaleza y la concentración de dicho agente de manera que la cinética de la reacción de inactivación pueda quedar controlada, consiguiendo así la inactivación completa de los virus sin pasar de los límites para los cuales se llegaría a la desnaturalización de los virus y por consiguiente a la desaparición del poder inmunógeno.

En el procedimiento objeto de esta Patente, se puede utilizar cualquier cepa de virus patógeno de peste porcina, particularmente la cepa aislada en el laboratorio central de investigaciones veterinarias de Maisons-
5. Alfort y designado por la abreviatura A-19.

Los virus conseguidos son inactivados químicamente por un agente alquilante. Las condiciones de esta inactivación deben permitir la eliminación completa del poder patógeno de los virus, dicho de otra manera, su
10. capacidad de réplica debe ser completamente destruída y al mismo tiempo, la inactivación no debe ser llevada demasiado a fondo para evitar la desnaturalización de los virus. Con esta finalidad, se escogen agentes alquilantes cuya acción sea suficientemente progresiva para que la
15. reacción pueda ser bien controlada.

Ensayos llevados a cabo previamente permiten para cada agente alquilante, para concentración del mismo y para cada temperatura, determinar el tiempo mínimo necesario para conseguir la inactivación del cultivo
20. vírico. En estos ensayos, se estudia la cinética de la reacción, dicho en otras palabras, se mide en función del tiempo transcurrido desde el inicio de la reacción, el contenido de la mezcla de virus que todavía no han sido inactivados. Para efectuar esta medición, se puede utilizar
25. especialmente una técnica de inmunofluorescencia. La repetición de estas mediciones a intervalos de tiempo regulares permite determinar, por extrapolación, el tiempo necesario para conseguir la inactivación completa de

la suspensión vírica en las condiciones particulares del ensayo.

Según la presente Invención, se lleva a cabo la inactivación de los virus con un agente alquilante tal que

5. no induzca la pérdida de actividad inmunógena de los virus tratados después de una duración de contacto igual y por lo menos tres veces el tiempo necesario para su inactivación completa. De modo preferente, las condiciones de inactivación se mantienen durante el doble de tiempo necesario

10. para la inactivación completa. En estas condiciones, se puede estar seguro de la inocuidad de la preparación y del hecho de que las propiedades inmunógenas de dicho preparado no son efectuadas de modo redhibitorio.

Se termina la reacción de inactivación en el momento deseado introduciendo en la solución una cantidad suficiente de un agente que inhibe la acción del compuesto de alquilación, por ejemplo un suero. La solución del agente vírico conseguida es conservada hasta su utilización.

15.

Según la presente Invención, un agente alquilante preferido es el constituido por el glicidaldehído pero se pueden utilizar igualmente otros agentes alquilantes, con la condición de que su acción sea progresiva y permita el control de la reacción. Si se utiliza el glicidaldehído, su concentración queda comprendida preferentemente entre 0,01% y 0,001%, preferentemente alrededor de 0,005%.

20.

25.

Siempre para este mismo agente alquilante, la temperatura de la reacción queda preferentemente comprendida entre 20°C y 35°C y preferentemente alrededor de 28°C.

- Tal como se ha indicado en uno de los ejemplos que ilustran esta Invención, es necesario aproximadamente un tiempo de 3 horas para conseguir la inactivación completa de los virus cuando ésta se efectúa con el glicidaldehído con una concentración de 0,005% y a una temperatura de 28°C.
- 5.

- Tal como se ha indicado anteriormente, la producción de una vacuna contra la peste porcina requiere la disposición de virus en cantidad abundante y regular.
10. Además, para que la vacuna final presente una buena eficacia, es necesario que su concentración en antígeno de vacuna sea suficiente. Como consecuencia, el contenido en virus del cultivo inicial debe ser lo más elevado posible a fin de limitar las operaciones de concentración. Se escogen
15. preferentemente condiciones de cultivo que permiten conseguir una concentración no inferior a 10^6 UFP/ml (unidad que forma zona o playa) y preferentemente superior a 5×10^6 UFP/ml.

- La réplica del virus solamente se puede producir en células vivas capaces de ser parasitadas. Los cultivos en órganos presentan numerosas dificultades materiales y se prefiere los sistemas de razas celulares perpetuas. Para cultivar los virus de la peste porcina se utiliza preferentemente según la Invención, el cultivo celular
20. denominado PK15 (del inglés Pig-Kidney).
- 25.

Cuando los cultivos llegan a un estadio de desarrollo conveniente, se rompen las células del medio de cultivo a fin de liberar el máximo de virus lo que

puede ser conseguido de modo tradicional, por ejemplo por una sucesión de operaciones de congelación y descongelación. Los virus son separados a continuación del medio de cultivo según procedimientos usuales tales como principalmente la centrifugación y el filtrado. La centrifugación permite principalmente eliminar las células o los residuos celulares, concentrándose en virus el medio recuperado, por ejemplo mediante ultrafiltrado.

La presente Invención se refiere asimismo a los preparados medicamentosos que contienen los agentes inmunógenos contra la peste porcina y que se consiguen por el procedimiento anteriormente descrito. La Invención concierne especialmente a vacunas que contienen una dosis eficaz de estos agentes inmunógenos asociados, en caso preciso, con excipientes o adyuvantes que facilitan su administración o que favorecen el crecimiento de la proporción de formación de los anticuerpos.

Ventajosamente, los preparados de vacunas, se dosifican para contener como mínimo 10^6 unidades de antígeno y preferentemente 10^7 unidades como mínimo y más en particular entre 5×10^7 y 10^8 unidades de antígeno. El volumen de estas dosis de vacuna queda comprendido de modo cómodo entre 0,5 y 10 ml y preferentemente entre 1 y 8 ml.

Para fortalecer la acción inmunógena de los virus inactivados según esta invención se pueden asociar éstos a adyuvantes de tipo clásico y especialmente adyuvantes aceitosos en forma de emulsión. Como compuestos

- aceitosos utilizados como adyuvantes inmunológicos para las vacunas según esta Invención se pueden citar por ejemplo los aceites de parafina, vaselina, éteres glicólicos de alcoholes grasos o aceites análogos, eventualmente adicionados a agentes emulsionantes.
- 5.

Otros detalles de esta Invención aparecerán por los ejemplos de antígenos de peste porcina y vacunas que les contienen y que forman objeto de la descripción siguiente.

10. En la descripción, las titulaciones en virus se expresan en UFP/ml. Las mediciones se han efectuado por inmunofluorescencia indirecta sobre células PK15.

19/ producción del virus

- Se ha utilizado la cepa vírica denominada A-19 del Laboratorio Central de Investigaciones veterinarias de Maisons-Alfort. Esta cepa patógena procede de una cepa "salvaje" que se ha pasado diecinueve veces por un medio celular constituido por células genéticamente controladas, de riñón de cerdo del tipo PK 15. Esta cepa de virus es patógena y se multiplica bien en las células PK 15. La cepa de origen conservada tiene una titulación de 10^6 UFP/ml.
- 15.
- 20.

- El cultivo se desarrolla por etapas a partir de las cepas. En cada etapa el protocolo utilizado es el siguiente:
- 25.

-se prepara un cultivo de células PK 15 en un medio esencial de Eagle (M.E.M.) con la añadidura de 8% de suero de becerro fetal (Flobio); después de 36 horas

de cultivo el tapiz celular apenas confluyente es inoculado con la cepa vírica.

- durante una hora a 37° C, se deja desarrollar la adsorción del virus;

5. - se añade medio M.E.M. sin suero pero con los antibióticos siguientes:

Penicilina	100 U.I./ml
Estreptomina	0,2 mg/ml
Polimixina	100 U.I./ml.

10. - El cultivo se mantiene 60 horas a 38°C para conseguir una titulación máxima en virus.

- Para romper las células del medio de cultivo y recoger los virus se añade al medio 5% de dimetil-sulfoxido y se congela y descongela dos veces; se clarifica

15. la suspensión vírica por centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos.

Las diferentes etapas cuyo protocolo se ha indicado son las siguientes:

20. - 1 ml de virus de cepa sirve para inocular un recipiente Falcón de 60 ml; se recuperan 8 ml de suspensión vírica.

- Con esta, se inocula 1 caja de Roux de un litro y se consiguen 80 ml de suspensión vírica;

25. - Se inoculan a continuación 8 de cajas de Roux de un litro y se consiguen 800 ml de suspensión vírica.

- Finalmente se inoculan frascos rodantes de 1 litro a razón de 20 ml de la suspensión vírica anterior y se recogen 100 ml de suspensión vírica por frasco cuya

titulación es de 5×10^6 UFP/ml.

Por la última etapa del cultivo, es decir en los frascos rodantes, no se añade dimetil-sulfoxido que haría difícil la etapa de concentración posterior.

5. Se concentra la suspensión vírica, preparada del modo que se ha descrito por ultrafiltrado con membrana XM 100 de la Sociedad AMICON, en una célula de 350 ml bajo agitación y bajo presión de 0,7 bar en atmósfera de nitrógeno (calidad médica). Se opera a +42 C.
10. Se recupera la suspensión vírica cuando su volumen queda reducido a 1/30 del volumen inicial. El rendimiento es prácticamente de 100%. Se consigue así una suspensión cuya titulación media está comprendida entre $5 \cdot 10^7$ y 10^8 UFP/ml.
15. 22/ inactivación de los virus
La inactivación se efectúa bajo agitación con protección contra la luz a temperatura constante de 282 C mantenida en baño maría.
Se ha utilizado glicidaldehido con una concentración de 0,005 % como agente alquilante.
20. Para determinar el tiempo necesario de inactivación de la suspensión vírica en estas condiciones se extrae cada hora una muestra alicuota que se dosifica después de la dilución a 1/10. De este modo se determina
25. la curva de inactivación de la suspensión, es decir, el número de UFP/ml (referenciado en unidades logarítmicas) en función del tiempo de inactivación. La extrapolación de esta curva permite determinar el tiempo necesario para

conseguir la inactivación completa.

- En el presente caso ese tiempo es aproximadamente de 3 horas y se ha mantenido la reacción de inactivación en total durante 6 horas. La reacción se detiene por añadidura a la suspensión de 2,5 % de suero de becerro fetal.
- 5.

Esta suspensión de antígeno es conservada a 4º C.

- 3º/ preparación de la vacuna contra la peste
10. porcina

Se utiliza para la preparación de las vacunas, un adyuvante aceitoso formado por aceite de vaselina y de una mezcla de éteres poliglicólicos de alcoholes grasos.

- La mezcla se hace añadiendo progresivamente y bajo agitación suave, la suspensión de antígeno preparada en el punto 2º en la fase aceitosa, encontrándose las dos fases en cantidades iguales.
- 15.

Se obtiene así la vacuna bajo forma de una emulsión blanca que es conservada a + 4º C.

20. Las vacunas preparadas tal como se ha indicado forman el objeto de ensayos in vivo, destinados simultáneamente a controlar su inocuidad y su actividad.

control de inocuidad

- Varios lotes de vacunas han sido controlados en cerdos en los que se asegura previamente, mediante pruebas serológicas que no han estado anteriormente en contacto con el virus.
- 25.

Con esta finalidad, 6 cerdos han recibido una

inyección de 5 ml de la vacuna preparada tal como se ha indicado. Durante los 30 días siguientes a la inyección no se ha comprobado ni hipertermia más allá de 40°C ni signos clínicos de infección.

5. Simultáneamente, 15 cerdos se han puesto en contacto con los animales vacunados del ensayo que se ha indicado anteriormente. Después de 10 semanas, ninguno de los 15 animales presenta anticuerpos contra la peste porcina.

10. control de actividad

a/ 2 cerdos de 30 y 40 Kg. se han vacunado por medio de 5 ml de la vacuna cuya titulación es de 10^8 UFP/ml y que ha sido inactivada a 25-30°C durante 4 h, 30 minutos, con 0,05 o/oo de glicidaldehído. 15 días

15. después de la primera inyección los cerdos recibían nuevamente 5 ml de la misma vacuna.

Se ha verificado la protección conferida por esta vacunación inyectando 2 ml de un homogeneizado a 1/10 de bazo virulento, 6 semanas después de la vacunación.

20. La dosificación de los anticuerpos de peste por inmuno-fluorescencia es negativa 15 días después de la primera vacunación. 30 días después de la segunda vacunación el índice de neutralización, con la ayuda de un suero con dilución 1/20, es respectivamente de 3 y de 5 para cada uno de los cerdos.

Durante el mes siguiente a la inyección de la dosis de prueba, los animales vacunados no presentan ni

signos clínicos ni hipertermia más allá de 40°C, mientras que en las mismas condiciones, un animal testigo, no vacunado, ha muerto 8 días después de la inoculación.

- b/ Cuatro cerdos de 50 Kg han recibido con 15 días de intervalo, 5 ml de vacuna cuya titulación es 10^7 y cuya inactivación ha sido efectuada a 25-27°C durante 5 horas 30 m, con glicidaldehído con una concentración de 0,005 %. Se ha seguido en estos animales la evolución del índice de neutralización con el suero a concentración 1/20. Los resultados conseguidos son los siguientes:

Tabla 1

Número de días después de la primera vacunación	Índice	Número de cerdos
15	nulo	2
	débil	2
30	- ≤ 1	2
	2	2
37	1	1
	2	2
	3	1
42	3	4
75	3	4

En los animales testigo en contacto con los cerdos vacunados no se revela formación alguna de anticuer-

pos.

90 días después de la primera vacunación, se efectúa la inyección de prueba tal como se ha dicho anteriormente. A continuación de esta inyección no se observa ningún signo clínico ni hipertermia en los animales vacunados mientras que el animal testigo muere después de una hipertermia a 41^o-42^o C.

c/ Se han renovado los ensayos de vacunación en lotes de animales a fin de variar las dosis administradas. La vacuna utilizada tiene una titulación de $5 \cdot 10^7$ y ha sido inactivada a 28^o C durante 5 horas 45 m.

La composición de los lotes y los tratamientos efectuados son los siguientes:

- 13 animales han recibido 2 veces 5 ml de vacuna con 15 días de intervalo,
- 13 animales han recibido 2 veces 2,5 ml de vacuna con 15 días de intervalo,
- 13 animales han recibido 2 veces 1 ml de vacuna con 15 días de intervalo,
- 7 animales han recibido 1 vez 5ml de vacuna,
- 15 animales testigo han sido situados en contacto con animales vacunados.

La investigación de los anticuerpos y su titulación en dilución de suero se han realizado 10 semanas después de la primera vacunación con los siguientes resultados.

Tabla 2

Vacunación	Titulación	Titulación media
2 x 5 ml	1/80, 1/80, 1/60, 1/80, 1/80	1/1000
2 x 2,5 ml	1/60, 1/60, 1/80 1/40, 1/20, 1/40	1/80
2 x 1 ml	1/10, 1/20, 0, 1/20 1/20, 1/40	1/20
1 x 5 ml	1/10, 1/20, 1/20, 1/10 1/10	1/10
testigo	-	-

Diez semanas después de la primera vacunación, los animales reciben la inyección de prueba de 2 ml de homogeneizado de bazo virulento diluido a 1/10. El comportamiento de los animales en cada lote posteriormente a la inoculación es el siguiente.

1er. lote (2 x 5 ml)

- Se comprueba una hipertermia fugaz en dos animales.

- Un animal muere 15 días después de la prueba sin hipertermia ni signos clínicos de la infección. La autopsia muestra ausencia de lesiones de peste típicas y la presencia de una fuerte peritonitis. La inmunofluorescencia de homogeneizado de bazo es negativo.

- No hay nada que señalar en cuanto a los

otros animales del lote.

2º lote (2 x 2,5 ml)

- Dos animales presentan hipertermia ($\geq 41^{\circ}\text{C}$).

- Nada a señalar para los otros animales.

5.

3er. lote (2 x 1 ml)

- Cinco animales presentan hipertermia ($\geq 41^{\circ}\text{C}$).

- Dos animales mueren, uno de los cuales era enfermizo (último de camada) (aportación). El diagnóstico es de peste porcina.

10.

- Nada a señalar para los otros animales.

4º lote (1 x 5 ml)

- Tres animales presentan oscilaciones térmicas entre 40 y 41°C.

- Nada a señalar para los otros animales.

15.

Testigos

- Los quince animales mueren a los 10 días después de la inoculación, después de haber presentado hipertermia superior a 41°C y los signos clínicos de la peste porcina. Los ensayos de inmunofluorescencia en el

20. bazo han sido positivos.

Estos resultados demuestran que la protección conferida por las vacunas según la presente invención es muy satisfactoria incluso si se efectúa una inyección única y también cuando se llevan a cabo dos inyecciones de poca dosis (y ello a pesar de que la proporción de antígenos circulantes permanece débil).

25.

Todo cuanto no afecte, altere, cambie o modifique la esencia del procedimiento descrito, será variable a los efectos de la actual Patente.

N O T A.

Se reivindica como objeto de esta Patente de Invención:

1.- Procedimiento para la preparación de
5. agentes inmunógenos contra la peste porcina, caracterizado por la realización de una inactivación de cultivos de virus patógenos de la peste porcina con ayuda de un agente alquilante, escogiéndose la naturaleza y la concentración de dicho agente de manera que la cinética de la
10. reacción de inactivación pueda ser controlada, de tal manera que la inactivación queda completa sin pasar de los límites más allá de los cuales se llegaría a la desnaturalización de los virus y que se detiene la reacción de inactivación neutralizando el agente alquilante
15. en exceso.

2.- Procedimiento para la preparación de agentes inmunógenos contra la peste porcina, caracterizado porque los virus utilizados son los de la cepa patógena A-19.

20. 3.- Procedimiento para la preparación de agentes inmunógenos contra la peste porcina, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado porque la duración de la reacción de inactivación queda comprendida entre 1 y 3 veces la duración necesaria para
25. conseguir la inactivación completa de la suspensión vírica tal como esta queda determinada por el estudio de la cinética de la reacción de inactivación.

4.- Procedimiento para la preparación de



- agentes inmunógenos contra la peste porcina, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el agente alquilante es el glicidaldehído y porque este se emplea a razón de 0,01% hasta 0,001% y preferentemente alrededor de 0,005%.
- 5.

- 5.- Procedimiento para la preparación de agentes inmunógenos contra la peste porcina, según la reivindicación 4, caracterizado porque la temperatura de inactivación es de 20°C a 35°C y preferentemente alrededor de 28°C.
- 10.

- 6.- Procedimiento para la preparación de agentes inmunógenos contra la peste porcina, según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, caracterizado porque la reacción de inactivación es mantenida entre 4 y 7 horas.
- 15.

- 7.- Procedimiento para la preparación de agentes inmunógenos contra la peste porcina, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los virus provienen de cultivos en un medio celular del tipo de control genético perpetuo.
- 20.

- 8.- Procedimiento para la preparación de agentes inmunógenos contra la peste porcina, según la reivindicación 7, caracterizado porque el medio celular queda constituido por células de riñón de cerdo conocidas con la designación PK 15.
- 25.

- 9.- Procedimiento para la preparación de agentes inmunógenos contra la peste porcina, según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, caracterizado



porque los virus cultivados en suspensión en el medio de cultivo son concentrados hasta una titulación como mínimo 10^6 UFP/ml y preferentemente como mínimo igual a $5 \cdot 10^6$ UFP/ml.

5. 10.- Procedimiento para la preparación de agentes inmunógenos contra la peste porcina, según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque los agentes inmunógenos son dosificados de manera que cada dosis contiene por lo menos 10^6 unidades de antígeno y preferentemente un mínimo de 10^7 .

10. 11.- Procedimiento para la preparación de agentes inmunógenos contra la peste porcina, según la reivindicación 10, caracterizado por la añadidura al agente inmunógeno, de un adyuvante aceitoso, efectuando la emulsión de la mezcla.

15. 12.- Procedimiento para la preparación de agentes inmunógenos contra la peste porcina, según la reivindicación 11, caracterizado porque el adyuvante aceitoso añadido contiene aceites de vaselina y éteres glicolicos de alcoholes grasos.

20. Sean cuales fueren las circunstancias que concurren en la esencialidad de la Patente de Invención definida en las anteriores reivindicaciones, cuyo objeto es:

25. 13.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE AGENTES INMUNÓGENOS CONTRA LA PESTE PORCINA".

Consta la presente memoria de veintiuna hojas



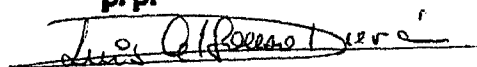
foliadas, mecanografiadas por una sola cara.

Barcelona, - 6 ABR. 1977

P.A. de AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA
RECHERCHE (A N V A R),

ALFONSO DURÁN

P. P.



JR/mj

