



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

NUMERO	10 A1
ES	
408808	
14-4-78	
FECHA DE PRESENTACION	

(Case O.Z. 1011/00) - 6 NOV. 1978

**PATENTE DE INVENCION**

50 PRIORIDADES: 51 NUMERO	52 FECHA	53 PAIS
4679/77	15 Abril 1.977	Suiza

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A23J	

64 TITULO DE LA INVENCION

**"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN CONCENTRADO PROTEINICO QUE CONTIENE FACTORES INMUNOLOGICOS DE ORIGEN LACTEO"**

71 SOLICITANTE (S)

**SOCIETE DES PRODUITS NESTLE, S.A.**

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

**VEVEY (Suiza)**

72 INVENTOR (ES)

**Helmut HILPERT**

73 TITULAR (ES)

**SOCIETE DES PRODUITS NESTLE, S.A.**

74 REPRESENTANTE

**D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial.**

Case O.Z. 1011/00

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a un procedimiento para la preparación de un concentrado proteínico que contiene factores inmunológicos de origen lácteo, principalmente inmunoglobulinas activas.

Se ha propuesto ya la introducción de factores inmunológicos de origen lácteo en productos dietéticos para recién nacidos y lactantes por incorporación de dichos factores a la leche, permitiendo transferir a la sangre del lactante esos factores, pero sin indicar las modalidades ni los resultados de una tal inmunización pasiva generalizada.

Se ha propuesto también aislar lactoglobulinas inmunes a partir de leche de vacas vacunadas, por coagu-

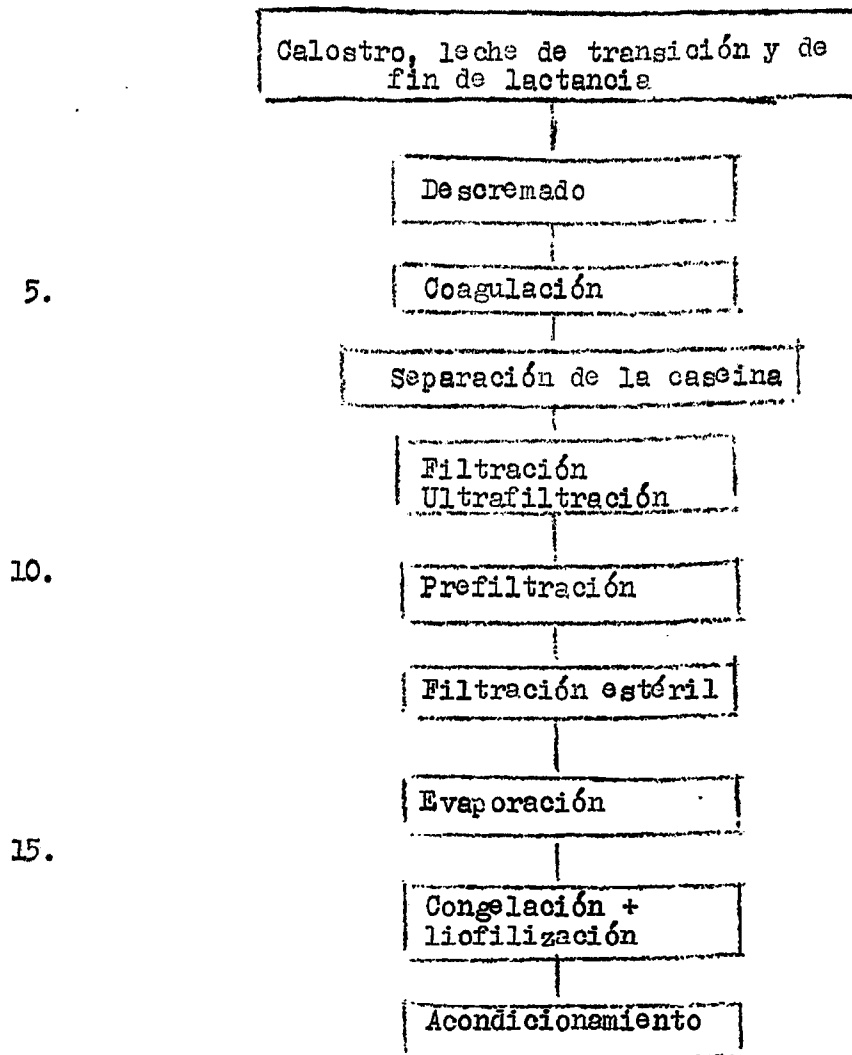
- lación de la leche, recuperación del lactosuero y precipitación selectiva de las lactoglobulinas por el sulfato de amonio seguida de diálisis contra el agua pura, filtración y secado. Se han realizado ensayos de seroprotección con ratones en relación con dichos trabajos, los cuales han mostrado que la inyección parenteral de estos principios inmunizantes proporcionaba una protección pasiva generalizada contra algunas bacterias y virus enteropatógenos cuando se inyectaban por la misma vía esos
5. microorganismos a los animales.
- 10.

- Se ha encontrado ahora un método para preparar en escala industrial un concentrado proteínico que contenga inmunoglobulinas sin desnaturalizar éstas durante el proceso tecnológico. Dicho producto proporciona una inmunización pasiva local a nivel del intestino sin reabsorción y sin destrucción notable de su actividad en el tracto digestivo.
- 15.

El procedimiento según el invento se caracteriza por las etapas siguientes:

20. Se recoge la leche de hembras lecheras hiperinmunizadas se separan la crema y las impurezas, se coagula la leche clarificada y descremada, se separa la caseína, se filtran, se ultrafiltran y se esterilizan las proteínas, del lactosuero por filtración, se evapora y se seca
25. el producto en condiciones que no desnaturalizan las inmunoglobulinas y conservan la esterilidad.

La página siguiente esquematiza las diferentes etapas de realización del procedimiento.



20. Las hembras lecheras utilizadas son bóvidos, en particular vacas.

La leche que hay que tratar puede ser de diferentes tipos más o menos ricos en anticuerpos : calostro, leche de transición (leche de los 8 días siguientes al

25. parto) o leche de final de lactación (2 últimos meses de secreción láctea).

Se prefiere tratar una mezcla de estos sueros para obtener un elevado porcentaje de anticuerpos durante el período más largo posible.

La hiperinmunización de la vaca se efectúa mediante una vacunación combinada. Por ejemplo, por instalación intracisternal en la glándula mamaria, inyección parenteral (subcutánea, intravenosa), inyección en el sistema ganglionar retromamario, por escarificación, por ingestión oral o por combinación de varios de estos modos.

Se prefiere utilizar una combinación de estos modos de acuerdo con un esquema de inmunización cuidadosamente establecido a fin de obtener una dosificación satisfactoria de anticuerpos en cada tipo de leche utilizado. Así para, el calostro y la leche de transición, la vacunación es parenteral o intracisternal en las 8-2 semanas antes del parto y oral durante la semana que precede al parto.

Para la leche de final de lactación se procede a alternar la vacuna parenteral, local y oral a partir de 2 meses y medio antes del agotamiento presunto de la secreción láctea.

Con ventaja, la vacuna utilizada es una mezcla del antígeno elegido y de un coadyuvante a base de suero sanguíneo homólogo de vacas inmunizadas, el cual permite así una des-toxificación de la vacuna y la formación de complejos inmunes.

Dado que la vaca sirve de animal de producción, los Ig contenidos en el concentrado proteínico son principalmente IgG (en especial IgG<sub>1</sub>) a diferencia de la leche materna que contiene IgA como Ig preponderantes.

El porcentaje de Ig en el concentrado proteínico en el que las proteínas representan el 70 al 80% en peso es del 25 al 35 % en peso. Algunas ventajas se deben al hecho de que, al realizar el procedimiento, los Ig no se

separan de las otras proteínas del lactosuero, las cuales están por lo tanto igualmente presentes en el concentrado obtenido. Se evitan así las operaciones de precipitación selectiva, por ejemplo mediante sulfato de amonio y diálisis.

5. Además, algunos factores bacteriostáticos o antivirales, por ejemplo la lactoferrina o los sistemas enzimáticos como la lactoperoxidasa y la ribonucleasa que están presentes en el lactosuero se encuentran en el concentrado proteínico.
10. Se pueden utilizar toda clase de antígenos de origen viral o bacteriano y los anticuerpos obtenidos son función de la naturaleza de los antígenos administrados a la vaca. Se puede, por ejemplo, obtener una protección contra las bacterias y virus enteropatógenos responsables de gastroenteritis acompañados de fuertes diarreas con deshidratación, por incorporación del concentrado proteínico que contiene las Ig en cualquier soporte que sea apropiado para efectuar una administración oral. Dicho soporte puede ser cualquier excipiente o de preferencia un producto dietético, como una leche o una harina lacteada para niño pequeño, una leche llamada "humanizada" o adaptada para lactante, una leche especializada adaptada para un grupo particular de recién nacidos, como por ejemplo una leche para prematuros o niños nacidos con poco peso, etc.
15. Si se quiere utilizar por ejemplo un concentrado que contenga Ig anti E.coli en dosis profiláctica con una leche como soporte se incorporarán de 0,8 a 3 g de concentrado a 100 g de materia seca y hasta 6 g en dosis terapéutica.
20. Si se quiere utilizar por ejemplo un concentrado que contenga Ig anti E.coli en dosis profiláctica con una leche como soporte se incorporarán de 0,8 a 3 g de concentrado a 100 g de materia seca y hasta 6 g en dosis terapéutica.
25. Si se quiere utilizar por ejemplo un concentrado que contenga Ig anti E.coli en dosis profiláctica con una leche como soporte se incorporarán de 0,8 a 3 g de concentrado a 100 g de materia seca y hasta 6 g en dosis terapéutica.

Para realizar el procedimiento es necesario cuidar de que las operaciones de descremado y clarificación sean muy completas a fin de evitar una subsiguiente obturación de los filtros y ultrafiltros.

5. De preferencia, el descremado se efectúa en dos etapas: primero en frío para eliminar la mayor parte de las materias grasas y de las impurezas (como por ejemplo la sangre que a menudo contiene el calostro) y después en caliente para separar completamente éstas. La coagulación se puede hacer
10. con el pH isoelectrónico de la caseína en presencia de cuajo con adición de ácido, por ejemplo de ácido cítrico.

Se prefiere efectuar la coagulación mediante la adición de ácido, por ejemplo de ácido clorhídrico, hasta que el pH sea de alrededor de 4,6 y calentando hasta 40°C.

15. La separación de la caseína va acompañada de un lavado del suero que permite separar los finos.

Por otra parte, es esencial efectuar las operaciones que requieren un tratamiento térmico (evaporación y secado) en condiciones que eviten la inactivación de las Ig.

20. Para disminuir las pérdidas de Ig, una parte de la cual se elimina en el descremado con la crema y otra parte con la caseína durante la separación de ésta, es conveniente proceder a una extracción con el agua y la crema y la cuajada y tratar las aguas de lavado que contienen
25. las Ig para recuperarlas.

Los ejemplos siguientes, en los que las cantidades y las proporciones se expresan en peso salvo indicación en contrario, ilustran la manera de poner en práctica el invento.

#### Ejemplo 1

Se han hiperinmunizado vacas de diferentes razas según el esquema de más abajo con una vacuna cuya preparación se indica a continuación, y se ha recogido la leche de los dos últimos meses de secreción láctea y de los 8 primeros días después del parto.

Preparación de la vacuna

Se han utilizado los serotipos E. Coli enteropatógenos siguientes:

	O 18 : K 76 (B 20)	O 111 : K 58 (B 4)
10.	O 20 : K 17 (L)	O 112 : K 68 (B 11)
	O 26 : K 60 (B 6)	O 119 : K 69 (B 14)
	O 44 : K 74 (L)	O 124 : K 72 (B 17)
	O 55 : K 59 (B 5)	O 125 : K 70 (B 15)
	O 78 : K 80 (-)	O 126 : K 71 (B 16)
15.	O 86 : K 61 (B 7)	O 127 : K 63 (B 8)
		O 128 : K 68 (B 12)

Las diferentes cepas procedían de casos de gastroenteritis en niños hospitalizados. La caracterización del suero se ha llevado a cabo con antisueros multivalentes y monovalentes (Difco). Las bacterias se han cultivado en medio líquido mínimo que contenía el 2% de ácidos aminados derivados de la caseína (casaminoácidos Difco) y el 2% de glucosa durante 24 horas a + 37°C sin agitación de los copos. Para inactivar los gérmenes, se han separado los cultivos por centrifugación entre células sedimentadas y que sobrenadaban. Se han vuelto a poner en suspensión las células y se las ha incubado a + 37°C durante 24 horas en presencia de 0,5 % de formaldehído, mientras que lo que sobrenadaba se ha inactivado como se ha indicado más arri-

- ba, pero con el 0,05 % de formaldehído. Después de una nueva centrifugación y eliminación de lo que sobrenada, se han vuelto a poner en suspensión las bacterias en lo que sobrenada inactivado original. Este procedimiento permite conservar las materias que sobrenadan y contienen exotoxinas bacterianas para la vacuna. Se ha obtenido una vacuna con  $1-2 \times 10^9$  bacterias/ml, que se ha diluido luego mediante una mezcla con una solución al 2 % de  $Al(OH)_3$  y suero sanguíneo homólogo de vacas inmunizadas.

10. Procedimiento de inmunización

A. Esquema de inmunización para obtener leche calostrual y de transición que contenga Ig anti-E. coli :

Día presunto para el parto = X

Momento del tratamiento	Vacuna + coadyuvante ev.	Modo de administración
X - 8 semanas	5 ml vacuna ( $5 \times 10^7$ bacterias/ml) + 5 ml suero*	Inyección subcutánea
X - 7 semanas	5 ml vacuna ( $5 \times 10^7$ bacterias/ml) + 5 ml 2 % $Al(OH)_3$ + 5 ml suero	Inyección intravenosa
X - 6 semanas	10 ml vacuna ( $5 \times 10^7$ bacterias/ml)	Inyección subcutánea
X - 5 semanas	20 ml vacuna ( $5 \times 10^7$ bacterias/ml) + 10 ml 2% $Al(OH)_3$	Inyección en el sistema ganglionar retromamario
X - 5 semanas	40 ml vacuna ( $5 \times 10^7$ bacterias/ml) + 20 ml suero	Instilación de 4 x 15 ml en la ubre por los canales de los pezones
X - 4 1/2 semanas	24 ml vacuna ( $5 \times 10^8$ bacterias/ml) + 8 ml suero*	Inyección subcutánea**

Momento del tratamiento	Vacuna + coadyuvante ev.	Modo de administración
X - 4 semanas	40 ml vacuna ( $5 \times 10^7$ bacterias/ml) + 20 ml suero	Instilación de 4 x 15 ml en la ubre por los canales del pezón
X - 3 semanas	10 ml vacuna ( $5 \times 10^8$ bacterias/ml)	Inyección subcutánea
X - 2 semanas	5 ml vacuna ( $5 \times 10^8$ bacterias/ml) + 5 ml 2% Al (OH) <sub>3</sub>	Inyección intravenosa
X - 1 semana	100 ml vacuna ( $1 \times 10^9$ bacterias/ml)	Ingestión oral durante la rumia
X - 1/2 semana	100 ml vacuna ( $1 \times 10^9$ bacterias/ml)	Ingestión oral durante la rumia

\* Estas adiciones de suero se efectúan únicamente en el caso de que se inmunice una vaca por primera vez.

\*\* Esta inyección subcutánea se reparte en el  
15. sistema linfático del modo siguiente:

2 x 4 ml en los ganglios linfáticos preescapulares

2 x 4 ml en los ganglios linfáticos postescapulares

2 x 4 ml en los ganglios linfáticos inguinales

20. 2 x 4 en los ganglios linfáticos poplíteos

B. Esquema de inmunización para obtener leche de final de lactación (2 últimos meses de lactación) que contenga Ig anti-E. coli,

Esta inmunización se aplica únicamente a las vacas que ya han sido inmunizadas para el período calostrado y de transición.  
25.

Día presunto de agotamiento de la secreción láctea = X

Momento del tratamiento	Vacuna + coadyuvante ev.	Modo de administración
X - 70 días	5 ml vacuna ( $5 \times 10^7$ bacterias/ml) + 5 ml 2% Al (OH) <sub>3</sub>	Inyección intravenosa
X - 65 días	20 ml vacuna ( $5 \times 10^8$ bacterias/ml)	Inyección en el sistema ganglionar retro mamario
X - 60 días	24 ml vacuna ( $5 \times 10^8$ bacterias/ml)	Inyección subcutánea <sup>xx</sup> (como en A, supra)
X - 55 días	100 ml vacuna ( $1 \times 10^9$ bacterias/ml)	Ingestión oral durante la rumia
X - 50 días	40 ml vacuna ( $5 \times 10^7$ bacterias/ml) + 20 ml suero	Instilación en la ubre como en A, supra
X - 40 días	100 ml vacuna ( $1 \times 10^9$ bacterias/ml)	Ingestión oral durante la rumia
X - 30 días	20 ml vacuna ( $5 \times 10^8$ bacterias/ml)	Inyección en el sistema ganglionar retromamario
X - 25 días	40 ml vacuna ( $5 \times 10^7$ bacterias/ml) + 20 ml suero	Instilación en la ubre como en A, supra
X - 10 días	100 ml vacuna ( $1 \times 10^9$ bacterias/ml)	Ingestión oral durante la rumia

Ejemplo 2

20. La leche de los ocho primeros días siguientes al parto recogida a partir de vacas vacunadas según el ejemplo 1 se ha sometido al tratamiento siguiente:

- el descremado se efectúa en dos etapas: etapa A, en frío y etapa B, en caliente.

25. A/ 1100 kg de leche se hacen pasar en frío por una descremadora centrífuga y se dirigen a una cuba tampón de 2500 l y se bombean luego a una desenlodadora centrífuga a aceleraciones elevadas (alrededor de 11.000 g) para eliminar sangre e impurezas (lodos).

- B/ La leche a la que se han quitado los lodos en frío se almacena en un depósito de 2500 l y se bombea a través de un calentador a 40°C a la descremadora centrífuga utilizada anteriormente, separando así 110 kg de crema que se recuperan y 5 kg de lodos que se destruyen. Como variante, se puede utilizar una descremadora autodesenlodadora en las operaciones de descremado en frío y en caliente y una desenlodadora entre dichas operaciones y reducir así la duración del descremado.
- 5.
10. - la leche descremada y desenlodada en caliente (985 kg) se reparte luego en 4 cubetas de coagulación cuadradas de 750 l cada una provistas de dispositivos mezcladores para la operación de coagulación.
- Se añade una solución de ácido clorhídrico 1 N
15. a 37°C hasta estabilizar el pH a alrededor de 4,6 y se mantiene la temperatura durante 20 minutos mezclando. Se enfría luego a alrededor de 15°C.
- la operación siguiente consiste en la separación de la caseína. Comprende dos centrifugaciones en serie de la leche descremada, cuajada y mezclada. La primera separa la mayor parte de la caseína cuajada por medio de una clarificadora-autodesenlodadora que separa 150 kg de caseína, siendo conducido el suero a un depósito tampón. La segunda centrifugación elimina toda traza de
20. partículas que puedan entorpecer la operación siguiente de filtrado y ultrafiltrado, por ejemplo por medio de la desenlodadora empleada en la operación A de descremado. Se obtienen 854,7 kg de suero desenlodado que se bombea a un depósito de 2,500 l.
- 25.

- Se procede luego a filtrar el suero y después a ultrafiltrarlo. La filtración debe llevarse a cabo muy cuidadosamente para eliminar toda dificultad en la ultrafiltración separando las partículas muy finas de caseína.

5. La filtración se efectúa con un filtro Sitz Supra 100 con placas de 20 x 20 cm. El filtrado se almacena en un depósito de 3000 l y se bombea luego hacia el ultrafiltro. La ultrafiltración se efectúa en 2 ó 3 etapas con reciclado del producto de retención en el depósito. Dos bombas centrífugas en serie proporcionan el caudal contra una presión de entrada en el compartimiento de entrada del ultrafiltro de alrededor de 7 bares, a la salida del cual se mantiene la presión a alrededor de 4,5 bares. Para evitar el recalentamiento del producto de retención por
10. la energía aportada a las bombas, se enfría éste a alrededor de 10-12°C.
- 15.

- La primera etapa o ultrafiltración permite separar los solutos de elevado peso molecular, las proteínas, retenidas sobre la membrana, que se encuentran en el producto de retención, mientras que una parte de la lactosa, las vitaminas, las sales minerales y el agua se evacúan en el filtrado. Utilizando un módulo DDS con membrana 800 (superficie de la membrana =  $7 \text{ m}^2$ ), con una relación producto de retención/filtración de alrededor de 1 a 3,1
- 20.
  25. se obtienen 580 kg de filtrado I y 272,7 kg de producto de retención con un caudal medio de 14,17 kg de filtrado/ $\text{m}^2 \text{ h}$ .

La segunda etapa es una diafiltración, en el curso de la cual se añaden continuamente 825 kg de agua

- al producto de retención y se hace circular la solución en las mismas condiciones que en la primera etapa. La diafiltración se hace cesar cuando la conductibilidad eléctrica del filtrado alcanza el valor deseado, siendo la
5. relación filtrado/agua añadida de alrededor 1 a 3. Se separan así 825 kg de filtrado II y 274,7 kg de producto de retención con un caudal medio de 11,77 kg filtrado/m<sup>2</sup>h. La tercera etapa es una concentración que se efectúa op-
10. tativamente por reciclado del producto de retención sobre la membrana hasta un porcentaje de materias secas de alrededor del 10%, por eliminación de 82,5 kg de filtrado III. Se obtienen así 192,2 kg de solución preconcentrada. Según una variante, se suprime esta tercera etapa y se produce directamente a la filtración estéril.
15. La filtración estéril representa una etapa importante en todo el procedimiento porque la esterilización no puede efectuarse por tratamientos térmicos, pues éstos provocan una desnaturalización de las Ig. La filtración estéril desembaraza al producto de retención
20. de los microorganismos que todavía pudiera haber (la mayor parte de éstos se han eliminado ya al separar la crema, la caseína y los lodos). A fin de evitar el taponamiento de los filtros de esterilización es necesario proceder a un desenlodo por filtración y a un triple fil-
25. trado del producto de retención. Después del desenlodo, el producto de retención se almacena en un depósito y se hace pasar por una línea de filtración que comprende una prefiltración sobre triple filtro Seitz Supra 100, EK, EKS montados en serie, seguida de una filtración es-

térril sobre filtro Seitz Supra 20 y Millipore HA 0,45 micras, montados en serie y previamente esterilizados con agua recalentada. El producto de retención estéril se almacena en un depósito estéril de 500 litros.

5. Todas las operaciones ulteriores se efectuarán en condiciones estériles. La transferencia a la operación siguiente de evaporación se puede efectuar mediante, por ejemplo, nitrógeno comprimido y filtrado estéril.

10. La evaporación se realiza con un evaporador de capa doblada (con un flujo descendente de superficie  $1 \text{ m}^2$ ) a una temperatura de calentamiento de  $75^{\circ}\text{C}$ , siendo la temperatura del producto de alrededor de  $30^{\circ}\text{C}$  hasta un porcentaje de materias secas de al menos el 20%. Al objeto de evitar cualquier infección, la transferencia se efectúa mediante una bomba peristáltica desde el depósito de producto de retención hasta el depósito de concentrado, el cual está unido a un circuito que comprende el evaporador, efectuándose la operación de concentración en un circuito cerrado. Esta operación no afecta a la actividad de las Ig.
- 15.
- 20.

25. - Se procede entonces a secar el concentrado (96 kg) por todo medio conveniente, por ejemplo por congelación seguida de liofilización. La congelación se puede realizar sobre placas a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Las Ig se pueden almacenar a  $-30^{\circ}\text{C}$  sin que pierdan su actividad durante 45 días. El producto a  $-30^{\circ}\text{C}$  se liofiliza en placas en una cámara a una presión de 0,5 torr, con el condensador a una temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$  y se calienta a una temperatura de  $30-35^{\circ}\text{C}$ . El modo de secado no afec-

ta a la actividad de las Ig. Se obtiene así 19,1 kg de producto seco que contiene 25-35 % de Ig que se acondicionan estérilmente.

Ejemplo 3

5. Cuando se procede como en el ejemplo 2 tratando la leche de los primeros 8 días siguientes al parto y la leche recogida durante las 4 últimas semanas de la lactación, se obtiene un concentrado proteínico con la siguiente composición media:

10.	Proteínas	75 ± 5 %
	30 ± 5 % inmunoglobulinas	
	15 ± 5 % alfa-lactoalbúminas	
	35 ± 5 % beta-lactoglobulinas	
	5 ± 2 % suero albúminas	
15.	5 ± 2 % otras proteínas secundarias	
	Humedad residual	4 ± 0,5 %
	Lactosa	10 ± 2 %
	Sales minerales	5 ± 2 %
20.	Sustancias nitrogenadas no proteínicas	5 ± 2 %

Ejemplo 4

Se procede como en el ejemplo 2 salvo que la crema y la caseína se extraen con agua a fin de recuperar una parte de las Ig perdidas, reciclándose las aguas de lavado en la línea de fabricación.

- El descremado en frío (etapa A) se efectúa con una línea paralela de extracción con agua de la fracción de proteínas que contiene las Ig arrastrada con la crema.

- La crema procedente de la primera centrifugación (115 kg) se almacena en un depósito de 1000 l con dispositivo de mezcla y se mezcla con 150 kg de agua templada a 40°C, se remueve el todo durante 30 minutos y se centrifuga en
5. una descremadora. Se separan así 115 kg de crema y 150 kg de solución que se añade a la leche descremada y desentlodada. Se obtienen de este modo 1130 kg de líquido, que se conduce hacia el descremado en caliente (etapa B) y la coagulación.
10. - La separación de la caseína da a partir de 1.145 kg de leche descremada cuajada y acidificada, 991 kg de suero y 154 kg de caseína. Una línea paralela permite extraer la fracción de proteínas que contiene las Ig de la cuajada con agua. Al salir de la clarificadora-desentlodadora,
15. la cuajada se la almacena en un depósito provisto de un dispositivo mezclador y se la mezcla con 300 kg de agua templada a 40°C durante 30 minutos y luego se transfiere a un molino coloidal. La suspensión de cuajada triturada se separa entonces en una clarificadora-autodesentlodadora.
20. Se recuperan 154 kg de caseína lavada y 300 kg de líquido de lavado que se añaden al suero para las operaciones ulteriores. Se filtran y se ultrafiltran 1291 kg de suero y conducen a la obtención de 2010 kg de filtrados (I, II y III) y 216 kg de preconcentrado. La evaporación proporciona 108 kg de concentrado que da 21,6 kg de
25. producto seco por secado. Se ganan así alrededor del 14% de Ig con respecto al procedimiento según el ejemplo 2.

Ejemplo 5

1 kg del polvo preparado según el ejemplo 2 ó

- 4, respectivamente 2 kg del polvo preparado según el ejemplo 3, se mezclan con 100 kg de polvo de leche de modo homogéneo y éste se acondiciona esterilmente para proporcionar un producto que contiene una dosis profiláctica de Ig, para una alimentación isocalórica de 140 cal/kg/día que corresponden a 250 mg de concentrado Ig/kg/día preparado según los ejemplos 2 ó 4, respectivamente a 500 mg de concentrado Ig/kg/día preparado según el ejemplo 3.

Ejemplo 6

10. Se han efectuado diferentes ensayos in vitro e in vivo con el concentrado proteínico según los ejemplos 2 ó 4 y designados en lo sucesivo "concentrado Ig" para demostrar que:

15. - las Ig lácteas tienen una especificidad anti-cuerpos que se encuentra normalmente en las Ig humanas y que la misma se conserva en el curso de los procesos de fabricación,

20. - las Ig lácteas específicas presentan una actividad protectora interfiriendo en los mecanismos patógenos de los microorganismos enteropatógenos.

Hemaglutinación pasiva

25. Se han sensibilizado glóbulos rojos de carnero con un extracto de urea de un serotipo de E. coli específico. Dicho extracto se había obtenido según Brodhago (Brodhago H., (1961) J. Hyg., 1961, 148, 94). Se han cultivado las bacterias sobre agar nutritivo (Difco) a 37°C durante 30 horas en frascos de Roux. Se ha recogido el cultivo con 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (8,8 g NaCl + 1,86 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O + 0,43 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/

- /1000 ml H<sub>2</sub>O) a pH 7,2. Después de adicionar 10 g de urea (Merck) se ha dejado reposar la suspensión durante 90 horas a 37°C agitando lentamente. Después de centrifugar se ha dializado totalmente lo que sobrenadaba contra una solución salina tamponada al fosfato con pH 7,2, so ha diluido hasta un volumen final de 50 ml con solución salina tamponada con fosfato a pH 7,2 y se ha congelado en pequeñas porciones a -20°C. La sensibilización de los glóbulos rojos del carnero con este antígeno se ha efectuado combinando los métodos según Avrameas y otros (Avrameas S., Taudou B. Chuilon S., *Immunochemistry*, 1969, 6,67) y según Otto y otros (Otto H., Takamiya H., Vogt A., J. *Immunol. Methods*, 1973, 3, 137). Los glóbulos rojos del carnero han sido pretatados con glutaraldehído (concentración final glóbulos rojos de carnero 5 % y 0,5 % de glutaraldehído), lavados luego y puestos en suspensión al 20% en solución salina tamponada al fosfato con pH 7,2 y se han mezclado con el mismo volumen extraído con urea. Después de 16 horas de incubación a 20°C agitando suavemente, los glóbulos rojos de carnero sensibilizados se han lavado varias veces y se han puesto en suspensión al 1% para su uso inmediato. Los glóbulos rojos del carnero se pueden almacenar en suspensión al 10% a 4°C durante varias semanas.
25. Antes de la filtración, cada muestra que se va a examinar debe ser absorbida sobre glóbulo rojo de carnero pretratado con glutaraldehído (0,1 ml de glóbulo rojo de carnero sedimentado por 1 ml de concentrado Ig, 37°C, 60 minutos).

- Las valoraciones se han efectuado según el sistema Microtiter (Sever J.L., J. Immunol., 1962, 88, 320 y Conrath T.B., Handbook of Microtiter Procedures, 1972) utilizando placas de poliestireno con cavidades en forma
5. de V. Se han efectuado una serie de diluciones de 50 microlitos cada una en el suero normal de conejo diluido al 1/200 y se han añadido 25 microlitros de glóbulos rojo de carnero sensibilizado al 1% a cada dilución. Se ha preparado una serie con glóbulos rojos de carnero no sensibilizados como control de aglutinación no específica. Se han leído los resultados al cabo de dos horas, siendo dada la valoración de hemaglutinación por la última dilución que da lugar a una reacción positiva neta.
- 10.

- En el cuadro siguiente se consignan los resultados obtenidos para 5 serotipos de E. coli:
- 15.

Serotipo E. coli	Valoración en aglutinantes
0 55	1/256
0 111	1/ 64
20. 0 119	1/128
0 127	1/128
0 128	1/ 64
control	-----

Actividad bacteriostática in vitro

- Se ha estudiado la actividad bacteriostática sobre el crecimiento de diferentes serotipos E. coli mediante la adición de concentrado Ig en medio de cultivo. Se ha utilizado el sistema Microtiter adaptado para el cultivo, permitiendo así utilizar cantidades mínimas de muestra de ensayo y examinar simultáneamente un número máximo de
- 25.

muestras.

- Cada cultivo tenía un volumen final de 0,25 ml, ya fuera en un medio mínimo que contenía 1 % de glucosa, o en un medio de cultivo rico. Por cada valor del tiempo
5. de incubación estudiado se han efectuado dos tomas de muestras a fin de disminuir los riesgos de errores debidos a variaciones de volumen. La evaluación se ha efectuado por doble recuento de partes alicuotas de 10 microlitros sobre placas de agar nutritivo. El "inoculum" bacteriano con-
10. sistió en una dilución de un cultivo de 16 horas en medio mínimo que contenía 1 a  $2 \times 10^3$  bacterias/ml. La incubación se ha efectuado en atmósfera húmeda a 37°C. El concentrado Ig se ha añadido, en concentraciones finales de 1 microgramo/ml, 10 microgramos/ml, 100 microgramos/ml y
15. 1 mg/ml, al medio de cultivo antes de inocular con  $2 \times 10^3$  E.coli/ml. Se ha observado una nota inhibición del crecimiento de E. coli O 111: B4 durante las primeras 4 horas de incubación a la concentración de concentrado Ig de 10 microgramos/ml. En comparación con un control cons-
20. tituido por el medio de cultivo solo, se ha observado un crecimiento superior en presencia de 1 mg/ml de proteínas de lactosuero normales obtenidas a partir de vacas no inmunizadas.

#### Depuración de E.coli O 111:B4 en el ratón

25. En cada ensayo se han utilizado 8 ratones (ratones blancos machos suizos, de 20 a 24 g), 2 como control y 6 para 3 ensayos que han sido efectuados cada uno dos veces. Todos los ratones han recibido una inyección subcutánea de 0,1 ml de heparina (500 UI/ml). Un caldo de

- cultivo de 16 horas de E. coli O 111:B4 se ha diluido al 1/10 con una solución salina estéril, luego se ha diluido al 1/100 por adición de suero de ternero fetal (Difco) diluido al 1/10 para los controles y que contenía 3 concentraciones escogidas de concentrado Ig. Se han inyectado por vía intravenosa 0,2 ml de la solución obtenida en la vena caudal, recibiendo cada ratón (2 ratones para el control y 2 x 3 para los ensayos) alrededor de  $2 \times 10^6$  bacterias, conteniendo la suspensión bacteriana de origen  $10^9$  bacterias/ml. Inmediatamente después de la inyección (en el tiempo  $t_0$ ), y al cabo de 20, 40 y 60 minutos, se ha efectuado una punción sanguínea de 50 microlitros a partir del plexo venoso oftálmico, por medio de tubos capilares calibrados heparinizados, y se han transferido inmediatamente las muestras en 5 ml de solución salina estéril (dilución sanguínea  $10^{-2}$ ) que se ha diluido luego a  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  en solución salina. Se ha efectuado el recuento sobre placas de agar (Difco) con 1 ml de cada dilución y se ha determinado el índice de fagocitosis K según Biozzi y otros (Biozzi G., Stiffel C., Halpern B.N., Le Minor I., Mauton D., J. Immunol., 1961, 87 296) :

$$K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{T_2 - T_1}$$

25.  $C_1$  y  $C_2$  corresponden a los recuentos en los tiempos  $T_1$  y  $T_2$ .

Se ha observado también una disminución normal del número de bacterias por eliminación en el sistema retículo-ondotelial en presencia de suero de ternero fetal,

mientras que la adición de 10' microgramos de concentrado Ig a la solución de inyección ha provocado la desaparición del 99,6 % de las bacterias del flujo sanguíneo en 20 minutos.

5. Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Tiempo (minutos después de inyectar E.coli		Bacterias en % del número inicial en el tiempo 0 después de inyección intra- venosa de $2 \times 10^6$ E.coli O 111:B4			
		Control 1:10 suero fetal de ternero	Ensayos, concentrado Ig		
			1000 g	100 g	10' g
10.	0	100	100	100	100
	20	27,8	0,14	0,22	0,4
	40	15,5	0,02	0,02	0,12
	60	10,0	0,02	0,02	0,06

15. Se ha controlado la especificidad de la opsonización por absorción exhaustiva de concentrado Ig con el serotipo O 111:B4 de E.coli y se ha observado que esta absorción anula prácticamente toda la actividad de aumento de la fagocitosis incluso con una cantidad de 1 mg de concentrado Ig.

20. En la tabla siguiente se consignan los índices de fagocitosis K obtenidos en 20 minutos:

		Control 1:10 suero de ternero fetal	1000 g concentrado Ig no absorbido	1000 g concentrado Ig absorbido
25.	K	0,015	0,128	0,039

Ensayo de protección en el ratón

Se han preparado soluciones logarítmicas ( $\log_{10}$ ) de un cultivo de E.coli O 111:B4 en caldo nutritivo (Difco) que contiene  $10^9$  bacterias/ml para formar diluciones de

$10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  en mucina al 5% (mucina granular, tipo 1701-W para potenciar la virulencia de bacterias de Wilson Laboratories, Chicago, Illinois).

- Se han mezclado luego 3 ml de cada dilución con
5. 0,6 ml de solución que hay que ensayar, o respectivamente de solución salina, de concentrado Ig, de proteínas de lactosuero normal (vacas sin inmunizar). Utilizando 5 ratones para cada dilución, se han inyectado 0,6 ml de la mezcla obtenida a cada ratón por vía intraperitoneal. Los resultados de la evaluación del número de ratones tratados después de 48 horas se indican en la tabla siguiente.

	Número de ratones muertos / 5 ratones tratados			
	Concentración en bacterias del tratamiento			
	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^1$
15. solución salina	5	5	5	5
10 micras Concentrado Ig *	5	5	5	3
25 micras Concentrado Ig *	5	4	0	0
20. 100 micras Concentrado Ig *	0	0	0	0
10 micras proteínas de lactosuero normal (vacas no inmunizadas)	5	5	5	5
25. 25 micras proteínas de lactosuero normal	5	5	5	5
100 micras proteínas lactosuero normal	5	5	5	5

\* calculado en proteínas totales que contienen 34-45%

de Ig lácteas.

Se ha encontrado que 100 microgramos de concentrado Ig proporcionaban una protección total con todas las concentraciones de bacterias ensayadas, mientras que 100  
5. microgramos de proteínas de lactosuero aisladas a partir de la leche de vacas no inmunizadas no daban ninguna protección.

#### Ejemplo 7

I / Una primera serie de ensayos clínicos muestran que las Ig lácteas resisten a la degradación proteolítica en fragmentos inactivos en el tracto intestinal.  
10.

11 niños (9 niños, 2 niñas) hospitalizados por diversos motivos pero que no padecían gastroenteritis y cuyas edades variaban de 2 semanas a 1 año han sido alimentados con una leche que contenía un concentrado Ig preparado según el ejemplo 2 ó 4 en dosis isocalórica correspondiente a 2 g/kg de peso corporal distribuida de modo igual en 24 horas. La primera y la última comidas en las que se había incorporado concentrado Ig fueron marcadas  
15. con 0,2 g de rojo carmin. Se ha recogido al menos una deposición antes de administrar concentrado Ig y sistemáticamente todas las deposiciones siguientes durante 72 horas, y se conservaron todas esas deposiciones a -20°C.  
20.

Se han preparado extractos de deposiciones por adición de dos partes de deposición por una parte de solución salina tamponada con fosfato a pH 7,2 y se han dispersado las deposiciones a 0°C con una varilla de vidrio. A continuación se ha agitado la suspensión durante 20 minutos con mezclador (400 r.p.m.) a temperatura ambiente.  
25.

te. Se ha enfriado luego la suspensión rápidamente a 0°C y se ha centrifugado a esa temperatura a 3500 x g durante 15 minutos. Luego se ha tomado cuidadosamente lo que sobrenadaba.

5. Se ha confirmado la presencia de Ig activos en los extractos de deposiciones por doble inmunodifusión (ensayo de Ouchterlony) y por inmunoelectroforesis. Los antisueros utilizados en estos ensayos se prepararon mediante inyecciones subcutáneas e intravenosas repetidas de
10. 1 mg de anticuerpos lácteos o 0,1 mg de Ig G<sub>1</sub>. Para realizar el ensayo de Ouchterlony, se recubrieron placas de vidrio (94 x 84 mm) con una capa de 1% de gel de agar en una solución salina tamponada con fosfato a pH 7,2, en la que se han excavado cavidades de 4 mm distantes 9,5 mm del sa-
15. cabocados (IKB-Producteur AB), utilizando un antisuero anti-proteínas de suero calostroal bovino y un antisuero monovalente específico anti IgG<sub>1</sub> de leche de vaca.

- Para efectuar la inmunoelectroforesis, se han recubierto placas de vidrio (100 x 85 mm) con 12 ml de gel
20. de agar al 1% en el barbiturato 0,05 molar tamponado a pH 8,3 (10,3 g de barbiturato de sodio + 0,5 g de ácido cítrico + 0,5 g de ácido oxálico por 1 l de agua) y la separación por electroforesis se ha realizado a temperatura ambiente durante 90 minutos a 40 voltios/cm. Después
25. de difusión de los antisueros (24 horas), se han lavado las placas con la solución salina, se han secado y se han revelado con azocarrina B.

Se hallaban presentes Ig lácteos en las deposiciones pese a variaciones considerables en cuanto al mo-

mento de su aparición y a la duración de la secreción Ig, y se ha encontrado una buena correspondencia entre la aparición y la desaparición del marcador rojo carmin y los Ig.

5. Con el objeto de confirmar la actividad de dicho Ig lácteos se ha llevado a cabo el ensayo in vivo de seroprotección en el ratón (como se describe en el ejemplo 6), utilizando 6 extractos de deposiciones en cada serie y en la tabla siguiente se resumen los resultados

10. obtenidos:

Extractos de deposiciones	Intensidad de las Ig en el extracto de deposiciones después del examen inmunoelectroforético	Número de ratones muertos/5 ratones tratados				
		Número de bacterias utilizadas on el tratamiento	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^1$
Niño M.D. (2 semanas)	I	-----	5	5	5	5
	II	-----	5	5	5	5
	IV	+ + + +	2	1	0	0
	V	+ + + +	0	0	0	0
	VI	+ + +	1	1	0	0
	IX	-----	5	5	3	4
Niño S.G. (1 mos)	I	-----	5	5	5	5
	III	-----	4	5	5	5
	IV	+ + + +	0	0	0	0
	VI	+ + + +	0	0	0	0
	X	+ +	3	0	1	0
	XI	+	5	2	0	0

So ha encontrado una clara correlación entre los resultados positivos en inmunoelectroforesis y la capacidad protectora de la materia contenida en los extractos de las deposiciones. En particular, se estima que las concentraciones de Ig lácteos de los extractos V (niño M.D.) y IV y VI (niño S.G.) correspondían al menos a 1 mg de concentrado Ig,

II / En una segunda serie de ensayos clínicos se han estudiado las propiedades terapéuticas y profilácticas del concentrado Ig preparado según el ejemplo 2 ó 4.

#### Propiedades terapéuticas

Se ha efectuado este estudio con niños con edades de hasta 5 meses que padecían gastroenteritis, de benignas a agudas, provocadas por E. coli. En diferentes series de ensayos se han administrado a un total de 152 pacientes 2 g de concentrado Ig/kg/día durante 5 días, o bien 1 g/kg/día durante 10 días en su comida. Los pacientes no han recibido ningún medicamento, como sulfamidas o antibióticos, ni oral ni parenteralmente. Se han realizado coprocultivos cada día siguiente a una administración, la última entre 36 y 48 horas después de la última administración de concentrado Ig. Se han tratado del mismo modo 43 pacientes, pero sustituyendo el concentrado Ig por proteínas de lactosuero procedentes de vacas no inmunizadas.

Se han obtenido coprocultivos negativos en 90 niños (57,7 %) en curso de tratamiento. En la serie control, solamente 14 niños (27,7 %) han experimentado una desaparición espontánea de E.coli en los coprocultivos.

Debe tenerse en cuenta que las proteínas nativas de lactosuero procedente de vacas no inmunizadas contienen una pequeña cantidad de Ig anti.E.coli. También se ha observado que el tratamiento no ha sido eficaz con mayor frecuencia en los casos que habían recibido la mayor dosis durante un tiempo más breve.

En cada caso se ha examinado la consistencia de las deposiciones. Se produjo una desaparición de la diarrea y una mejora clínica sensible en un gran número de casos y ello incluso cuando los coprocultivos continuasen siendo positivos. En los casos en que los coprocultivos se hicieron negativos, la consistencia de las leches mejoró más rápidamente cuando el concentrado Ig se administró en un preparado lácteo pobre en lactosa.

15. Propiedades profilácticas

Dado que los prematuros representan un grupo extremadamente sensible a las gastroenteritis por E.coli, se ha elegido este grupo para los ensayos clínicos de profilaxis.

20. Este estudio se ha efectuado durante 6 meses en 2 salas con 8 incubadoras en cada sala. Se han repartido los ensayos y los controles en cada sala para que todos los pacientes estuviesen expuestos a las mismas condiciones, utilizándose 4 incubadoras para los ensayos y 4 para el control. Cada caso ha sido realizado durante un promedio de 41 días, con separación de un niño después de su curación y sustitución del mismo por otro cualquiera que fuese su pertenencia (ensayo o control). Se han seguido 70 casos : 36 como control y 34 para el grupo de en-

sayo.

El grupo de ensayo ha recibido el concentrado Ig a cada toma de alimento repartido en 24 horas a razón de 0,25 g/kg/días. Se ha procedido a un coprocultivo desde el comienzo del ensayo y se han examinado los coprocultivos cada 5 días. De un total de 666 coprocultivos, 339 pertenecían al control y 327 al ensayo. Entre estos últimos, 33 han demostrado la presencia de E.coli (10,1 %), mientras que 96 de los 339 cultivos de control han sido positivos (28,3 %). Si se examina únicamente el serotipo E.coli O 119:B14 que se encuentra asociado frecuentemente con formas agudas de gastroenteritis, la frecuencia de coprocultivos positivos ha sido del 5,5 % en el grupo de ensayo frente al 23,3 % en el grupo de control.

Se puede concluir que la incorporación de concentrado proteínico que contenga Ig lácteas específicas anti E.coli a la leche para prematuros disminuye netamente el grado de infección por E.coli de dicho grupo particularmente sensible de recién nacidos.

20.

= . =

#### REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones.

25.

1. Procedimiento para la preparación de un concentrado proteínico que contiene factores inmunológicos de origen lácteo, principalmente inmunoglobulinas activas no desnaturalizadas, caracterizado porque comprendo en su realización, tratar la leche de hembras lecheras hip-

rinmunizadas, en la cual se ha separado la crema y las impurezas, a un proceso de coagulación, con separación de la caseína en el cual se filtran, se ultrafiltran y se esterilizan las proteínas del lactosuero durante la filtración y finalmente se evapora y se seca el producto en condiciones que no desnaturalizan las inmunoglobulinas y conservan la esterilidad.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la leche sometida a tratamiento es leche de vacas hiperinmunizadas por vacunación y se compone:

- del calostro de 1 y 2 días después del parto
- de la leche de transición de los 3 a 8 días después del parto
- y de la leche de lactación final de los últimos 60 días de la lactancia.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el plan de vacunación previo comprende, en lo que respecta a la leche calostrada y de transición, una serie de administraciones sucesivas de antígenos por vía parenteral y local desde alrededor de la 8ª semana hasta la 2ª semana antes del parto y, en lo que respecta a la leche de fin de lactancia, una serie de administraciones sucesivas de antígeno a partir de unos 2 1/2 meses antes del presunto agotamiento de la secreción láctea alternando la vía parenteral, local y la vía oral.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la vacuna es a base de antígenos de *Escherichia coli* responsables de gastroenteritis neonatales.



5. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de coagulación comprendida en el proceso se efectúa por adición de ácido clorhídrico hasta pH de alrededor de 4,6 y calentando hasta 40°C.
5. 6. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque, a fin de evitar una obturación subsiguiente de los filtros y ultrafiltros, la operación de descromado previo se efectúa en dos etapas : primero en frío y luego en caliente, y porque el descromado y la separación de la caseína van acompañadas de desenlodados intensos.
10. 7. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la ultrafiltración del lactosuero se efectúa en 3 etapas : ultrafiltración propia, diafiltración y preconcentración.
15. 8. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el lactosuero preconcentrado se somete a una prefiltración seguida de una filtración estéril.
20. 9. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la evaporación del lactosuero preconcentrado y esterilizado se efectúa en circuito cerrado en condiciones estériles.
25. 10. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el producto concentrado se seca por congelación seguida de liofilización y se acondiciona de modo estéril.
11. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque a fin de recuperar las inmunoglo-

bulinas eliminadas en las operaciones de descremado y de separación de la caseína, se extraen con agua la crema y la cuajada y se juntan las aguas de lavado respectivamente con la leche descremada y el lactosuero.

5. 12. Procedimiento para la preparación de un concentrado proteínico que contiene factores inmunológicos de origen lácteo.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 32 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

10.

Madrid, a 14 ABR. 1978

P. a.

J A I M E I S E R N  
p. p.

~~firmado: JOSE F. NIETO~~

6