



370.827

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>A01</u>
SUBCLASE <u>H</u>

M E M O R I A D E S C R I P T I V A

de una Patente de Invención a nombre de:

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, de naciona-

lidad alemana, domiciliada en 1 Berlin

65, Müllerstrasse 170-172 y 4619 Bergka-

zen, Waldstrasse 14 (Alemania); por :

"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE VA-

CUNAS PROTECTORAS CONTRA INFECCIONES IN-

TESTINALES LOCALES, POLIVALENTES, SUSCEP-

TIBLES DE SER APLICADAS ORALMENTE".

El presente invento concierne a vacunas protectoras
 contra infecciones intestinales locales, polivalentes, suscep-
 tibles de ser aplicadas oralmente, que actúan de modo sinérgico,
 caracterizadas porque contienen una mezcla de diversas vacunas
 5 inmunizantes contra infecciones intestinales locales.

En el caso de las infecciones de los intestinos, se
 distinguen fundamentalmente dos formas de desarrollo clínico di-
 ferentes, las enfermedades cíclicas y las enfermedades locales.
 Las infecciones intestinales cíclicas (tifus y paratifus), que
 10 están caracterizadas por un transcurso por fases con un periodo
 de incubación normalizado, una etapa de generalización y una



etapa de manifestación orgánica, conducen a una inmunidad de larga duración, que impide una segunda enfermedad. Las infecciones locales de los intestinos (disentería, cólera, enteritis de salmonellas, infecciones de dispepsiocoli, etc.) no poseen ningún transcurso por fases, y conducen solo a una débil inmunidad antitóxica; por lo tanto a los diferentes procedimientos de vacunación por inyección contra estas enfermedades infecciosas, que imitan a una infección cíclica, ha correspondido solo un éxito insatisfactorio. El hecho de que la administración oral de vacunas inactivadas produce una buena y duradera inmunidad de los intestinos contra las infecciones locales es un conocimiento sorprendente, que todavía no ha sido aprovechado en la práctica. Así, en el transcurso de trabajos, en los que está basado el presente invento, se encontró que ratones, incluso todavía 257 días después de la introducción oral de antígenos, eran capaces de formar anticuerpos específicos.

En todos los países con alta civilización disminuyen desde hace aproximadamente 20 años continuamente las enfermedades de tifus y paratifus, mientras que otras infecciones intestinales, tales como la disentería bacteriana y, en países subtropicales y tropicales, el cólera, se presentan endémicamente invariables con una tendencia aproximadamente de igual magnitud, o las infecciones tales como la enteritis infecciosa salmonelosa, las enfermedades de dispepsia-coli y las infecciones con algunos enterovirus (virus de Coxsackie y ECHO) aumentan de modo continuo. En el caso de los animales útiles aumenta considerablemente de modo continuo en los últimos tiempos el número de las infecciones de salmonella; esto es importante sobre todo en



lo que respecta a las economías nacionales. Contra todos estos organismos patógenos de enfermedad no existe hasta ahora todavía ninguna profilaxis de inmunidad activa, solo se puede citar la vacunación por inyección contra el cólera, que en efecto hace
5 transcurrir la enfermedad del cólera de modo más benigno, pero no puede impedirla.

Una profilaxis de inmunidad contra organismos patógenos de enfermedad que causan la enteritis está indicada y es deseada con urgencia en zonas de epidemia y de catástrofe y en viajes
10 por países con un nivel higiénico bajo según la experiencia. Como en la mayor parte de los casos permanecen desconocidos los organismos patógenos de la enteritis, que amenazarán a los hombres, se debe inmunizar contra todas las bacterias posibles. Lo mismo ocurre con una profilaxis de inmunidad en el caso de animales
15 útiles; en este caso se trata sobre todo de diferentes salmonellas, que son arrastradas juntamente por los piensos importados y de determinados tipos de coli-bacterias que causan diferentes y graves epizootias de cría. Por lo tanto, en el caso de animales útiles está indicada una profilaxis de inmunidad continua.

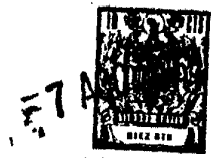
20 Ahora bien, existen por encima de 500 tipos de salmonellas, que son facultativamente causantes de enfermedades para los hombres y los animales, 22 tipos de bacterias de disentería, que solo son patógenas para los hombres, y un gran número, todavía desconocido, de coli-bacterias (al menos 120 tipos) que son
25 peligrosas en parte para los hombres y en parte para los animales jóvenes. Una vacuna combinada contra todos los enterítidos posibles debería contener por lo tanto los antígenos de aproximadamente 700 tipos de organismos patógenos; en este caso, hay que



tener en cuenta adicionalmente que cada día se descubren nuevos tipos. Por dos razones es imposible preparar una tal vacuna para inyecciones : En la cantidad para inyección máxima posible (1-2 ml), dicho gran número de antígenos no puede ser llevado a una concentración activa, y por otra parte el cuerpo no es capaz de formar anticuerpos específicos que correspondan simultáneamente a tantos antígenos, después de inyección. Con los métodos de inyección no es posible por lo tanto una amplia profilaxis de inmunidad contra anterítidos.

10 Los métodos de inmunización oral tienen por el contrario una serie de decisivas ventajas:

 Los antígenos, cuando son deglutidos, aparecen ya después de horas en la circulación sanguínea, y después son resorbidos con facilidad según la experiencia por las mucosas intestinales. En las mucosas intestinales activan células notoriamente competentes para inmunidad local. Al llegar a la sangre y con ello al sistema reticuloendotelial (SRE), los antígenos tomados oralmente ponen en marcha una reacción de defensa general del cuerpo. Después de vacunación oral resulta por lo tanto una buena inmunidad, predominantemente celular, susceptible de ser aumentada, de los intestinos así como también una reacción inmunológica de todo el cuerpo; esta afirmación ha sido corroborada tanto en ensayos con animales como también en extensos ensayos con hombres. En una proporción cuantitativa apropiada se pueden combinar numerosos antígenos, sin que se perturben recíprocamente. Combinaciones de antígenos se mostraron como muy bien compatibles en el caso de aplicación oral. Como la dosis para vacunas aplicadas oralmente es prácticamente ilimitada, se pueden combinar el número deseado



de antígenos en una concentración suficientemente alta. Una vacunación oral puede ser repetida sin dificultades técnicas; según esto, el cuerpo no está obligado, como en el caso de la vacunación parenteral, a reaccionar repentinamente a una única introducción de antígenos de alta concentración. Además, se evita ampliamente en el caso de la administración oral de antígenos el peligro de reacciones alérgicas, que todavía es muy grande en el caso de vacunas de inyección. Finalmente, este método oral tiene una decisiva ventaja de profilaxis de epizootias.

10 Según la experiencia, la participación voluntaria en la vacunación es mucho mayor en el caso de la aplicación oral de la vacuna que en el caso de la vacunación por inyección. Un determinado y alto grado de vacunación a fondo de la población es sin embargo necesario con el fin de impedir la propagación de una enfermedad infecciosa.

15 En efecto, en el caso de la vacunación oral se pueden utilizar cantidades esencialmente mayores de antígeno, de modo que es posible incorporar aproximadamente 700 antígenos en la vacuna, pero en la práctica es muy difícil la reunión de tantas cepas de bacterias. En esto se muestra otra decisiva ventaja de los métodos de inmunización oral. A diferencia de la administración parenteral de antígenos, en el caso de la aplicación oral de antígenos y de la subsiguiente infección, la acción no es específica para organismos patógenos. Junto con la protección contra la infección contra las cepas de las bacterias homólogas, se protege significativamente también contra cepas afines, aunque no de modo tan bueno como mediante la vacunación específica para la cepa. Así, por ejemplo, una vacunación oral con bacterias de S, typhi-murium protege contra



una infección oral con *S. enteritidis* y a la inversa (Zbl. f. Bakt. I. Orig. 197, 368 (1965)). Por lo tanto, sería suficiente si de cada grupo de organismos patógenos se reuniesen solo algunos tipos de organismos patógenos en la vacuna. Sin embargo, estos deberían ser dosificados en cantidad uniformemente alta, lo cual
5 exigiría una cantidad global de antígenos en la vacuna, irracionalmente alta e intolerable.

En la realización de experimentos adicionalmente se evidenció una ventaja sorprendente, imprevisible, adicional de la vacuna polivalente según el invento. Se encontró que, después de la
10 aplicación oral de varios antígenos, los componentes no específicos de la mezcla de antígenos elevaron la acción específica en el sentido de un efecto coadyuvante; apareció una considerable acción sinérgica. Así, por ejemplo, se pudo comprobar que una vacuna quintuple, que contenía 5 diferentes antígenos en partes iguales, en
15 la cantidad total que presenta usualmente en una vacuna simple, proporcionó la misma protección de inmunización que una correspondiente vacuna simple, que por consiguiente contenía una cantidad 5 veces mayor del antígeno homólogo.

20 La aplicación de las vacunas según el invento, y el tipo de los antígenos y su combinación en dichas vacunas orales, se ajustan al correspondiente estado epidemiológico y a la meta buscada de la profilexia de inmunidad. En zonas de catástrofe (terremotos, inundaciones, etc.) se incluirán en la vacuna combinada,
25 en lo posible, todos los antígenos de los organismos patógenos de enfermedad que se pueden esperar en la zona en cuestión, preferiblemente salmonellas, shigelos y bacterias de dispepsia-coli. En zonas de cólera endémica se incluirán en la vacuna también anti-



genos de los vibriones. Viajeros centroeuropeos en zonas subtropicales y tropicales serán vacunados también con una combinación de salmonellas, shigelos y bacterias de dispepsia-coli inactivadas. Es suficiente una administración de los antígenos de los tipos de bacterias últimamente citados, si se deben proteger niños de pecho en hospitales asilos o casas-cuna contra infecciones de dispepsia-coli. Cuando se debe lograr una inmunización de terneros jóvenes contra la temida disentería de terneros, es suficiente la aplicación de los antígenos de los correspondientes organismos patógenos de la colitis.

La preparación de la vacuna combinada se ajusta a la aplicación. En general, los microorganismos inactivados según procedimientos de por sí conocidos, son mezclados en forma secada por congelación (liofilizada) y son administrados en las formas de aplicación farmacéuticamente usuales, tales como por ejemplo grageas, tabletas, píldoras, pastillas, zumos o cápsulas, pero los antígenos pueden ser desleídos en líquido también sin previo secado por congelación. A niños de pecho, niños pequeños y animales jóvenes se administrará convenientemente el antígeno mixto secado por congelación mezclado con la alimentación. Para una inmunización profiláctica de hombres adultos se ha mostrado conveniente una aplicación oral, realizada en 5 días sucesivos, de 50 mg cada vez de un antígeno mixto liofilizado, pero la dosis diaria puede ser elevada también de modo inofensivo.

25 Ejemplo 1:

100 ratones blancos fueron vacunados oralmente, 10 veces en días sucesivos, diariamente, con una capa de dispepsia-coli (número 2.380) inactivada en caliente; el número de bacterias total



administrado fué de $7,5 \times 10^9$ bacterias por ratón.

Otros 100 ratones fueron vacunados oralmente con una vacuna triple que contenía el mismo número total de bacterias y consistía en un tercio de cada de la misma capa de coli, de una
5 capa de Salmonella typhimurium y de una capa Shigella flexneri 2a, y otros 100 ratones no fueron vacunados. En el décimo día después de la última vacunación los 300 ratones fueron infectados simultaneamente con la capa viva de coli 2.380. De los animales testigo no vacunados murieron 63%, y de los dos grupos vacunados
10 murieron solo 29% en cada caso. La vacuna triple había actuado igualmente bien que la vacuna simple, aunque solo contenía un tercio del antígeno homólogo. Si el componente específico de la vacuna simple hubiera sido diluído a 1/3 con una sustancia inerte, de acuerdo con los resultados experimentales la mortalidad hubie-
15 ra ascendido a aproximadamente 51%.

Ejemplo 2 :

123 ratones fueron vacunados oralmente como en el Ejemplo 1 con la capa de dispepsia-coli número 2380 inactivada en ca-
liente, 247 ratones recibieron una vacuna quintuple del mismo nú-
20 mero de bacterias total, la cual, junto con la cepa de coli, contenía además en partes iguales bacterias inactivadas de S. typhi murium, S.- schwarzenrund, S. blockley y Sh. flexnari 2a. En el décimo día después de la última vacunación, todos los animales y 142 animales testigo fueron infectados con la cepa viva de coli
25 número 2.380. De los ratones no vacunados murieron 61,3%, y de los animales vacunados solo con la cepa murieron 17,1% y de los vacunados con vacuna quintuple murieron 20,2%. Si el componente específico de la vacuna simple hubiera sido diluído a 1/5 con una



sustancia inerte, la mortalidad hubiera ascendido a 53% según los resultados experimentales.

Ejemplo 3 :

Producción de la vacuna

5 La cepa de bacterias utilizada para la producción de
la vacuna (bacterias del grupo de las enterobacterias) es conser-
vada de manera usual en el laboratorio. Procedente del cultivo de
colección, un cultivo previo es inoculado en medio líquido y es
incubado durante 8 horas a 37°C. Con este cultivo previo se ino-
10 cula a continuación la superficie de un medio nutritivo de bacte-
rias sólido usual, que se encuentra en recipientes con gran super-
ficie. Después de incubación durante 24 horas de los cultivos so-
bre el medio sólido, las bacterias son lavadas con solución fisio-
lógica de sal común. La suspensión de bacterias es centrifugada,
15 el líquido flotante es desechado, el material de bacterias es re-
cogido nuevamente en solución fisiológica de sal común de nueva
aportación, la suspensión es centrifugada, y los líquidos de la-
vado son desechados. El proceso de lavado se repite generalmente
todavía una vez más. Después del último lavado, el residuo bacte-
20 riano es recogido nuevamente con solución fisiológica de sal común
o con agua destilada y es calentado aproximadamente durante 20 mi-
nutos a 100°C (inactivación de las bacterias vivas). Las bacterias
inactivadas de tal manera son separadas de la fase líquida por cen-
trifugación, como se indica anteriormente para el proceso de lava-
25 do, y son liofilizadas según un procedimiento conocido.

En la realización de este procedimiento de preparación,
5 x 10⁹ bacterias corresponden aproximadamente a 1 mg de peso en
seco.



Ejemplo 4 :

Cápsulas de gelatina con 50 mg de vacuna liofilizada.-

Porciones de 10 g de bacterias de E. coli número 2.380, S. typhi murium y Sh. flexneri 2a liofilizadas o inactivadas de acuerdo con el ejemplo 3, son mezcladas de modo homogéneo y son cargadas en cantidades de 50 mg cada una en cápsulas enchufables de gelatina dura.

Ejemplo 5 :

Tabletas con 50 mg de vacuna liofilizada.

Composición para una tableta :

Porciones de bacterias, mezcladas homogeneamente, liofilizadas de 16 2/3 mg cada una e inactivadas según el Ejemplo 3, de E. Coli número 2.380, S. typhi murium y S. flexneri 2a

- 25,00 mg de fécula de maiz (USP XVI)
- 20,00 mg de lactosa (DAB 6)
- 3,00 mg de talco (DAB 6)
- 1,45 mg de gelatina, blanca (DAB 6)
- 0,52 mg de laurilsulfato de sodio (USP XVI)
- 0,02 mg de para-oxibenzoato de metilo (DAB 6, 3º apéndice)
- 0,01 mg de para-oxibenzoato de propilo (DAB 6, 3º apéndice)
- 100,00 mg

Ejemplo 6 :

Leche inmunizadora con un contenido de vacuna de 50 mg/100 ml de líquido.-

Se suspenden en 30 litros de leche pasteurizada porciones de 5 g cada una de bacterias inactivadas de E. coli número 2.380, S. typhi murium y Sh. flexneri 2a, y se cargan en frascos de 100 ml cada uno.



Ejemplo 7 :

Pastillas para aplicación bucal con 15 mg de vacuna liofilizada.-

Composición de una pastilla :

- 5,00 mg de bacterias liofilizadas e inactivadas de E. coli 2.380
- 5 5,00 mg de bacterias liofilizadas e inactivadas de S. typhi murium
- 5,00 mg de bacterias liofilizadas e inactivadas de Sh. flexneri 2a
- 300,00 mg de azúcar en polvo
- 130,00 mg de zumo de regaliz
- 25,00 mg de polvo de regaliz
- 10 30,00 mg de goma arábica
- 500,00 mg

--- N O T A ---

Se reivindica como nuevo y de propia invención.

1. Procedimiento para la preparación de vacunas protectoras contra
15 infecciones intestinales locales, polivalentes, susceptibles de ser aplicadas oralmente, con acción sinérgica, caracterizado porque diversas bacterias de la especie Dispepsicoli y de los tipos Salmonella y/o Shigella, causantes de infecciones intestinales
20 locales, son inactivadas a unos 100° C, se aíslan los antígenos así obtenidos, se liofilizan, se unen en estado liofilizado a partes más o menos iguales y la mezcla de antígenos así obtenida se convierte en una forma de presentación aplicable por vía oral.

2. "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE VACUNAS PROTECTORAS
25 CONTRA INFECCIONES INTESTINALES LOCALES, POLIVALENTES, SUSCEPTIBLES DE SER APLICADAS ORALMENTE".



Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva, que consta de doce hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 7 AGO. 1969

CARLOS FERNÁNDEZ CANDELAS
P.P.