

In^a Cl^a: C12K, A61K

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: INSTITUT DE RECHERCHES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES
APPLIQUEES(IRCEBA)

Domicilio: 38 Rue de Lisbonne, 75008 PARIS, Francia.

Enunciado: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN NUEVO PRO
DUCTO UTIL EN TERAPEUTICA PARTICULARMENTE PARA EL
TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES DEL MEDIO OTO-RINO-
LARINGOLOGICO.

Prioridad: de la solicitud de patente británica nº
39.984 del 6 de septiembre de 1.974.

l.a.

1 La presente invención se refiere como producto in-
dustrial nuevo a una composición terapéutica para uso nasal
que contiene antígenos de origen bacteriano. La invención
se refiere igualmente al procedimiento de preparación de
5 la mencionada composición, así como a la aplicación de la
mencionada composición para el tratamiento de las manifes-
taciones infecciosas del medio oto-rino-laringológico y
principalmente a las rinitis y rino-faringitis, otitis y
sinusitis.

10 La nueva composición nasal de acuerdo con el inven-
to se caracteriza porque comprende 3 partes en peso de
fracción antigénica purificada de Staphylococcus aureus
634, 3 partes en peso de fracción antigénica purificada de
Staphylococcus aureus 636, 3 partes en peso de fracción
15 antigénica purificada de Staphylococcus aureus 659, 3 partes
en peso de fracción antigénica purificada de Streptococcus
147, 3 partes en peso de fracción antigénica purificada de
Streptococcus pyogenes 155, 3 partes en peso de fracción an-
tigénica purificada de Streptococcus pyogenes 1178, 3 partes
20 en peso de fracción antigénica purificada de Diplococcus pneu-
moniae 209, 3 partes en peso de fracción antigénica purifi-
cada de Diplococcus pneumoniae 210, y, 1 parte en peso de
fracción antigénica purificada de Neisseria catarrhalis 987.

25 Los números de cepas dados anteriormente son los
que figuran en el catálogo de la colección del Centro

1 Internacional de Distribución de Cepas y de Informaciones
sobre los Tipos Microbianos de Lausanne.

5 Las nueve cepas de las cuales se han proporcionado
las fracciones antigénicas purificadas que entran en la
composición según el invento, y que forman parte de las
cepas patógenas frecuentemente encontradas en clínicas y
con respecto a las cuales es particularmente interesante
producir una inmunidad, han sido seleccionadas por su fa-
cultad de producción de antígenos.

10 Bien entendido sin salirse del marco de la inven-
ción, se pueden asociar las fracciones antigénicas purifi-
cadas extraídas de estas nueve cepas con otros ingredien-
tes, así como se podrá apreciar más adelante en el ejemplo
B.

15 El procedimiento de preparación de la composición
de acuerdo con el invento que comprende el cultivo de las
bacterias en un medio nutritivo esencialmente líquido, la
lisis de las bacterias, la extracción de las fracciones
antigénicas y su purificación, y luego la mezcla de dichas
20 fracciones, se caracteriza porque la lisis de las bacterias
se realiza en el medio nutritivo de cultivo por vía enzi-
mática a 60-65°C mediante papaina, y luego a 37°C mediante
tripsina, destruyéndose cada enzima, después de la utili-
zación, por calentamiento a 100-120°C durante 30 mn (inac-
25 tivación), y porque la extracción y la purificación de

1 las fracciones antigénicas comprenden sucesivamente:

a) la eliminación por centrifugación de las substancias sólidas de origen bacteriano que resultan de la lisis.

5 b) la absorción sobre un soporte sólido principalmente carbón activo de las fracciones antigénicas contenidas en el medio líquido después de la centrifugación.

c) la separación por centrifugación del carbón activo sobre el cual se han absorbido las fracciones antigénicas.

10 d) la elución de las fracciones antigénicas del carbón activo mediante una solución acuosa de amoníaco.

e) la evaporación de NH_3 y la concentración del eluato y a continuación una liofilización para obtener en forma de polvo las fracciones antigénicas denominadas purificadas.

Este procedimiento ha sido ilustrado a continuación en el diagrama I.

La extracción de las fracciones antigénicas purificadas necesita dos medios de cultivo distintos, conteniendo cada uno una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales minerales:

a) un medio para los Staphylococcus aureus, los Streptococcus y los Diplococcus pneumoniae; este medio se prepara en un recipiente con un volumen de 300 litros, y

25 b) un medio especial para el Neisseria catarrhalis;

1 este medio se prepara en un matraz de 5 litros.

Aunque sea posible cultivar simultáneamente las
ocho cepas de Staphylococcus, Streptococcus y Diplococcus
y extraer simultáneamente sus fracciones antigénicas, se
5 prefiere operar cepa por cepa con el fin de evitar un ries-
go eventual suplementario de contaminación y sobretudo
con el fin de dosificar mejor en el momento de la mezcla
final cada una de las fracciones antigénicas.

Otras ventajas y características de la invención
10 se comprenderán mejor con la lectura que sigue de ejemplos
no limitativos.

Ejemplo A

I - Preparación de cada una de las fracciones antigénicas
purificadas de Staphylococcus aureus, Streptococcus y
15 Diplococcus pneumoniae.

1) Medio de cultivo

	NaCl	1 500 g
	Fosfato bipotásico	1 500 g
	Fosfato monopotásico	600 g
20	Fosfato monoamónico	600 g
	Glucosa	1 500 g
	Sulfato de magnesio	60 g
	Glicerina	600 g
	Autolisato de levadura	600 g
25	Sulfato de manganeso	6 g

1	Clorhidrato de tiamina	1,50 g
	Clorhidrato de piridoxina	1,50 g
	Pantotenato cálcico	1,50 g
	Acido nicotínico	1,50 g
5	Riboflavina	0,75 g
	Agua	c.s.p. 300 litros

Los componentes del medio de cultivo se disuelven en 50 litros de agua, bajo agitación. Después de haber completado el volumen de 300 litros con agua, se ajusta el pH a 7,8 mediante adición de sosa. Después de una nueva agitación, el medio se esteriliza a 100-120°C, preferentemente a 110°C, durante 30 minutos.

2) Mantenimiento de las cepas

Las cepas destinadas a la extracción de fracciones antigénicas se mantienen mediante el paso por ratones Suizos Albinos, con el fin de conservar su carácter patógeno y sus propiedades bioquímicas. La inoculación al animal se realiza por vía intra-venosa.

Al producirse la muerte de los animales por septicemia, se extrae esterilmente, por punción cardíaca, sangre con la cual se siembra un medio líquido de enriquecimiento, y después a partir del medio líquido, un medio sólido de aislamiento. Con el cultivo puro así obtenido, se siembra una cantidad adecuada de medio líquido destinado para servir de inóculo al cultivo industrial, de

1 acuerdo con el procedimiento descrito en el punto 3) dado
a continuación.

5 Después de cada nuevo aislamiento, la conformidad
de los caracteres bioquímicos se verifica de acuerdo con
las técnicas de identificación clásicas.

3) Preparación del inóculo industrial

10 La siembra con el cultivo puro obtenido anteriormen-
te se realiza sobre 10 ml de medio líquido (descrito en 1).
Al cabo de 24 horas de permanencia en estufa a 37°C, este
volumen se introduce esterilmente en 5 litros de medio
de igual composición, previamente esterilizado. Después
de 24 horas de permanencia en estufa a 37°C, este volumen
se introduce esterilmente en 300 litros del mismo medio
previamente esterilizado.

15 4) Cultivo

20 La temperatura del medio se mantiene a 37°C, el
cultivo se realiza en 24 horas, la aeración del medio está
asegurada por la llegada de aire filtrado (por ejemplo por
medio de una membrana Millipore). Al cabo de 24 horas, el
cultivo se detiene por esterilización del medio durante
1 hora a 100-120°C.

En esta fase, se extraen asepticamente 10 ml del
medio para un control de esterilidad.

5) Lisis de las bacterias

25 Esta operación se realiza por hidrólisis enzimática

1 y tiene por objeto liberar las fracciones antigénicas en
el medio. Después del control de la esterilidad del medio,
esta hidrólisis enzimática se realiza en dos tiempos:

- 5
- primeramente, a 60-65°C mediante papaina a un pH de 6,5,
 - seguidamente, a 37°C mediante tripsina a un pH de 7.

10 La lisis enzimática tiene por objeto degradar la célula bacteriana con el fin de que el medio de cultivo del punto 4) anteriormente mencionado (en el cual se realiza la lisis enzimática, y que se lleva a un pH de 6,5 para el tratamiento mediante papaina y luego a un pH de 7 para el tratamiento con tripsina) se enriquezca con antígenos.

15 Las cantidades de papaina y de tripsina no son críticas.

20 En efecto, el mecanismo simplificado es el siguiente. Los enzimas (aún presentes en pequeña cantidad) destruyen la pared celular (en inglés: "cell wall") y ponen al descubierto una porción de la membrana citoplásmica; la mencionada membrana se destruye entonces en razón de (i) la diferencia de presión osmótica existente entre la masa citoplásmica y el medio de lisis enzimático, y/o (ii) de la degradación enzimática; de lo que resulta que los
25 antígenos (situados en la pared celular y situados sobre

1 todo en el interior de la membrana citoplásmica), o de
al menos una parte de estos, pasan al medio de lisis en-
zimático. De un modo general se pueden considerar que los
enzimas permiten separar los antígenos de las sustancias
5 que los revisten o de los eventuales substratos a los cuales
van unidos, y, recoger un extracto bacteriano (fracción
antigénica) obtenido a partir de cada antígeno completo
y que ha conservado en su estructura los emplazamientos
antigénicos del antígeno completo.

10 Por otro lado, los tiempos de tratamiento, que
dependen de las cantidades enzimáticas no son tampoco
críticos.

Para obtener buenos resultados en lo que a la can-
tidad y calidad de los antígenos extraídos se refiere, se
15 preconiza:

- emplear de 25 a 35 g de papaina (con un grado de
660 unidades por miligramo de enzima, ver la farmacopea
francesa de 1949 para la definición de éste título) para
300 litros de medio, efectuándose el tratamiento a un pH
20 de 6,5 y a 60-65°C durante 3 horas;

- calentar a 100-120°C durante 30 minutos para des-
truir la papaina;

- emplear a continuación de 12 a 18 g de tripsina
(con una graduación de por lo menos 30 Unidades Interna-
25 cionales por miligramo de enzima, ver la farmacopea fran-

1 cesa de 1965 para la definición de este título) para 300
litros de medio, efectuándose el tratamiento a un pH de 7
y a 37°C durante 3 horas, y

5 - calentar a 100-120°C durante 30 minutos para des-
truir la tripsina.

En el presente ejemplo se ha supuesto en las condi-
ciones siguientes a saber: tratamiento con 30 g de papaina
(con 660 U/mg) por 300 litros de medio, a un pH de 6,5 y
a 60°C durante 3 horas; calentamiento a 100°C durante 30
10 minutos; tratamiento con 15 g de tripsina (con una gradua-
ción de por lo menos 30 U.I./mg por 300 litros de medio,
a un pH de 7 y a 37°C durante 3 horas, y luego, calenta-
miento a 100°C durante 30 minutos.

6) Extracción de las fracciones antigénicas

15 Primeramente se ha procedido a la eliminación de
los cuerpos bacterianos por centrifugación. Se recuperan
entonces los 300 litros del medio de cultivo que contiene
las fracciones antigénicas. Estas fracciones antigénicas
se absorben a continuación sobre un soporte por ejemplo
20 sobre carbón activo (principalmente carbón OENO).

Se realiza un nuevo paso por la centrifugadora con-
el fin de recuperar las fracciones antigénicas adsorbidas
sobre el carbón, que se eluirán a continuación con ayuda
de una solución acuosa de amoníaco.

25 Las fracciones antigénicas se encuentran entonces en

1 el agua amoniacada.

5 La solución experimenta un paso por el evaporador; esta operación tiene por objeto eliminar el amoníaco y concentrar la solución acuosa. La concentración de la mencionada solución acuosa se realiza en unas condiciones corrientes; el objeto a lograr es un contenido en fracción antigénica que pueda ser liofilizado. De este modo, se podrán concentrar de 2 volúmenes a 1 volumen, o mejor, de 5 volúmenes o más a 1 volumen).

10 La liofilización de esta solución acuosa constituye la última etapa de la extracción.

Las fracciones antigénicas purificadas se presentan entonces en forma de polvo.

15 II - Preparación de la fracción antigénica extraída de Neisseria catarrhalis.

Aquí el principio no cambia, pero el medio de cultivo es distinto (esto se debe a la dificultad de cultivar éste germen); además, el cultivo se realiza en un matraz de 5 litros y dura 48 horas.

20 Aquí se dan solo las diferencias con relación a la preparación de las fracciones antigénicas extraídas del Staphylococcus aureus, Streptococcus y Diplococcus pneumoniae.

Medio de cultivo

25 Suero de caballo

250 ml

1

Medio de cultivo

Caldo T c.s.p. 5 litros

Composición del caldo T

5

Peptona 200 g

Glucosa 10 g

NaCl 25 g

Agua destilada c.s.p. 5 litros

10

Para la preparación de éste medio, se introduce esterilmente el suero de caballo en el caldo T esteril y se ajusta el pH a 7,2.

El medio se esteriliza a continuación a 100°C durante 45 minutos.

15

La lisis de las bacterias, la extracción de las fracciones antigénicas y luego la liofilización se realizan a continuación según el método descrito anteriormente para los Staphylococcus, Streptococcus y Diplococcus.

El peso molecular de cada una de las 9 fracciones antigénicas obtenidas según I y II es de 12.000 aproximadamente.

20

III - Mezcla de las diversas fracciones antigénicas

25

Se mezcla 1 parte en peso de la fracción antigénica purificada y liofilizada de Neisseria catarrhalis con 3 partes en peso de cada una de las fracciones antigénicas purificadas y liofilizadas de Staphylococcus aureus 634, 636 y 659, de Streptococcus 147, 155 y 1178 y de Diplococcus.

1 pneumoniae 209 y 210.

Ejemplo B

5 Se ha preparado una composición preferida de acuerdo con el invento reproduciendo el ejemplo A mezclando en la etapa III las fracciones antigénicas de las nueve cepas con el mercurotiolato sódico, el cloruro sódico y agua con el fin de obtener la formulación siguiente:

Composición I:

10 Fracción antigénica purificada extraída de Staphylococcus aureus 634 3 mg.

Fracción antigénica purificada extraída de Staphylococcus aureus 636 3 mg.

Fracción antigénica purificada extraída de Staphylococcus aureus 659 3 mg.

15 Fracción antigénica purificada extraída de Streptococcus 147 3 mg.

Fracción antigénica purificada extraída de Streptococcus pyogenes 155 3 mg.

20 Fracción antigénica purificada extraída de Streptococcus pyogenes 1178 3 mg.

Fracción antigénica purificada extraída de Diplococcus pneumoniae 209 3 mg.

Fracción antigénica purificada extraída de Diplococcus pneumoniae 210 3 mg.

25 Fracción antigénica purificada extraída de Neisseria cata-

1 rrhalis 987 1 mg.

Mercurioliato sódico 0,25 mg.

Cloruro sódico 90 mg.

Agua destilada c.s.p. 10 ml.

5 Procediendo como anteriormente se ha preparado una composición II respetando las proporciones de la composición I

Composición II

10 Fracción antigénica purificada extraída de Staphylococcus aureus 634 4,5 mg.

Fracción antigénica purificada extraída de Staphylococcus aureus 636 4,5 mg.

Fracción antigénica purificada extraída de Staphylococcus aureus 659 4,5 mg.

15 Fracción antigénica purificada extraída de Streptococcus 147 4,5 mg.

Fracción antigénica purificada extraída de Streptococcus pyogenes 155 4,5 mg.

20 Fracción antigénica purificada extraída de Streptococcus pyogenes 1178 4,5 mg.

Fracción antigénica purificada extraída de Diplococcus pneumoniae 209 4,5 mg.

Fracción antigénica purificada extraída de Diplococcus pneumoniae 210 4,5 mg.

25 Fracción antigénica purificada extraída de Neisseria cata-

1	<u>rrhalis</u> 987 1,5 mg.	
	Mercurotiolato sódico	0,375 mg
	Cloruro sódico	135 mg.
	Agua destilada	c.s.p. 15 ml

5 La composición II acondicionada en unos frascos de 15 ml para ser administrada por nebulización en las fosas nasales ha sido denominada provisionalmente bajo los nombres de "Rhinapten" y "Rhinapten Nebulizador". A continuación se han resumido los resultados de los ensayos farmacológicos y clínicos que se han llevado a cabo.

10

Toxicidad

El estudio de la toxicidad aguda "en el ratón, por vía oral ha permitido mostrar que la DL-0 (dosis mínima mortal) de cada una de las nueve fracciones antigénicas que entran en las composiciones I y II es superior a 4 g/kg.

15

Igualmente ha mostrado que la DL-0 de la mezcla de las nueve fracciones antigénicas es netamente superior a 1,8 g/kg, y que la DL-0 de las composiciones I y II es igual a 40 ml/kg (lo cual corresponde a una dosis de mezcla de las nueve fracciones antigénicas de 100 mg/kg).

20

El estudio de la toxicidad subaguda, en el ratón y en la rata, por vía oral de la mezcla de las nueve fracciones antigénicas que entran en las composiciones I y II en dosis de 1 mg/kg y 10 mg/kg durante 13 semanas, 5 días por semana, ha permitido observar la ausencia de mortandad.

25

1 Ensayos farmacológicos

5 La experimentación farmacológica en el animal tropieza principalmente con dos dificultades prácticas: por una parte es difícil crear localmente, a nivel de las fosas nasales, una infección experimental que no cure espontáneamente en un tiempo demasiado breve para que la experiencia pueda ser concluyente; por otro lado, la nebulización, que es una forma de administración bien adaptada para el hombre, no lo es para el animal que acepta mejor la instilación o la exposición a una neblina aerosol.

10

 Para resolver estas dificultades se han llevado a cabo cuatro experimentos:

a) Propiedades inmunológicas in vitro de las 9 fracciones antigénicas y de su mezcla según las composiciones I y II.

15

 Se demuestra que los extractos de las nueve cepas (Staphylococcus aureus 634, 636 y 659, Streptococcus 147, Streptococcus pyogenes 115 y 1178, Diplococcus pneumoniae 209 y 210, y, Neisseria catarrhalis 987) tienen una estructura antigénica empleando el método de Kolmer; en efecto

20 cada fracción obtenida según el ejemplo A y la mezcla de dichas fracciones proporcionan una reacción positiva con los inmunosueros producidos en el animal (conejo) mediante inyección de suspensiones en formaldehído de cada una de las nueve cepas (la mencionada suspensión se obtiene

25 añadiendo formaldehído al medio nutritivo de cultivo del

1 ejemplo A que contiene la cepa y después sometiéndola a centrifugación):

b) Inmunización por vía parenteral con las fracciones antigénicas y su mezcla según las composiciones I y II.

5 Se administra por vía inyectable a conejos, 2 mg por día, tres veces por semana, durante 4 semanas, de cada una de las fracciones antigénicas que entran en las composiciones I y II (excluyéndose la fracción antigénica extraída de Neisseria catarrhalis que correría el riesgo por
10 vía parenteral de provocar chocs). Se extrae a continuación el suero de los animales que se ensaya con las 9 fracciones antigénicas y su mezcla según el método de Kolmer y el de Ouchterlony. Los resultados de los dos métodos permiten afirmar que las fracciones antigénicas y su mezcla
15 conducen a una buena inmunización de los animales.

c) Evidencia de anti-cuerpos a nivel de la mucosa nasal en el animal tratado.

La experimentación ha sido realizada por instilación (rata) y aerosol (cobaya), siendo concordantes los
20 resultados solo se ha resumido a continuación los ensayos relativos a la rata.

Protocolo

La experimentación se ha llevado a cabo sobre 40 ratas distribuidas de éste modo:

25

1 Lote testigo:

Ratas macho SPF (peso medio 250 g) No. 1 a 10

Ratas hembra SPF (peso medio 250 g) No. 11 a 20.

Lote tratado:

5 Ratas macho SPF (peso medio 250 g) No. 21 a 30

Ratas hembra SPF (peso medio 250 g) No. 31 a 40.

10 Los animales se trataron por via nasal a razón de 11 gotas por orificio nasal, dos veces por dia, durante 8 semanas, mediante una solución de la mezcla de las nueve fracciones antigénicas que entran en la composición I del ejemplo B. Esta solución contenia 5 g de mezcla de fracciones antigénicas purificadas por 100 ml de agua destilada.

15 El lote testigo solo recibió agua destilada en las mismas condiciones.

Al final de las ocho semanas de tratamiento, los animales se sacrificaron y se extrajeron las mucosas nasales.

20 Las mucosas nasales se lavaron a continuación con suero fisiológico y se trituraron en presencia de 0,5 ml de solución isotónica de cloruro sódico. Los triturados una vez centrifugados, el sobrenadante se utilizó para efectuar la reacción de Kolmer contra los inmunosueros anti-estafilococo, anti-estreptococo, anti-neumococo y
25 anti-neisseria y probar la presencia de anticuerpos.

1 Resultados

Los resultados, animal por animal, para cada lote, son consignados en las tablas I y II, estos resultados han sido además reagrupados respectivamente en las tablas
5 III y IV para representar en % de acuerdo con las indicaciones de la reacción de Kolmer.

d) Evidencia de las propiedades protectoras in vivo de las fracciones antigénicas respecto a las infecciones experimentales en estrepto y en estafilococos.

10 Como era difícil producir en el animal una infección rino-faringe útil para la experimentación, se provocó en la cobaya abscesos sub-cutáneos mediante inyección de una dosis microbiana próxima a la dosis mínima infectante (DMI) de Streptococcus pyogenes 155 (DMI = 0,5 ml del medio de
15 cultivo de 24 horas de esta cepa) y de Staphylococcus aureus 636 (DMI = 0,5 ml del medio de cultivo de 24 horas de esta cepa), a continuación, se administra la mezcla de las fracciones antigénicas (fracción de Neisseria catarrhalis excluida) por via intramuscular a razón de 8 mg/kg de la
20 mencionada mezcla durante 5 semanas, cada día. Con relación a los animales testigos infestados y que no recibieron la mencionada mezcla se observó que los animales tratados estaban mejor protegidos.

25

1

T A B L A I

LOTE TESTIGO

	Ratas SPF No.	Contra-suero anti- estafilococo	Contra-suero anti- estreptococo	Contra-suero anti- neumococo.	Contra- suero ant neisserie
5	1	±	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	±	-	-
	5	+	-	-	-
10	6	-	-	-	-
	7	±	±	-	-
	8	-	-	-	-
	9	+	+	-	-
	10	-	-	-	-
15	11	-	-	-	-
	12	+	±	-	-
	13	-	-	-	-
	14	-	±	-	-
	15	-	-	-	-
20	16	-	-	-	-
	17	±	-	-	-
	18	-	-	-	-
	19	-	-	-	-
	20	+	-	-	-

25

REACCION DE KOLMER

Leyenda: - reacción negativa; + reacción ligeramente positiva; + reacción positiva; ++ reacción muy positiva

T A B L A II

1

LOTE TRATADO

	Ratas SPF No.	Contra-suero anti- estafilococo	Contra-suero anti- estreptococo	Contra-suero anti- neumococo.	Contra-suer anti- neisseria
5	21	+	+	±	±
	22	+	+	±	+
	23	±	±	±	-
	24	++	+	+	±
	25	+	+	+	+
10	26	+	++	-	±
	27	+	+	±	±
	28	-	-	-	-
	29	±	±	±	±
	30	+	+	+	-
15	31	+	±	+	±
	32	++	++	+	+
	33	+	+	±	±
	34	-	-	-	-
	35	+	+	-	-
20	36	±	-	-	±
	37	+	+	+	+
	38	++	+	±	±
	39	++	±	±	±
	40	+	+	±	+
25					

1

T A B L A III

LOTE TESTIGO

Resultados expresados en %	Contra-suero anti-estafilococo	Contra-suero anti-estreptococo	Contra-suero anti-neumococo	Contra suero anti-neisser
----------------------------	--------------------------------	--------------------------------	-----------------------------	---------------------------

5

- negativos	65%	75%	100%	100%
± ligeramente positivos	15%	10%	-	-
+ positivos	20	5%	-	-
++ muy positivos	-	-	-	-

10

T A B L A IV

LOTE TRATADO

Resultados expresados en %	Contra-suero anti-estafilococo	Contra-suero anti-estreptococo	Contra-suero anti-neumococo	Contra suero anti-neisser
----------------------------	--------------------------------	--------------------------------	-----------------------------	---------------------------

15

- negativos	10%	15%	25%	25%
± ligeramente positivos	15%	20%	45%	50%
+ positivos	55%	55%	30%	25%
++ muy positivos	20%	10%	-	-

20

25

La experimentación clínica ha sido realizada por medio de la composición II del ejemplo B con el fin de estudiar los efectos de esta composición sobre las manifestaciones infecciosas del medio oto-rino-laringológico así

1 como el poder inmunitario creado con respecto a los gér-
menes aislados tanto en el niño como en el adulto. Para-
lelamente se ha llevado a cabo una investigación del por-
centaje de inmunoglobulinas del tipo IgA secretorio a nivel
5 de la mucosa nasal antes y después del tratamiento.

Este experimento clínico realizado sobre 50 enfer-
mos repartidos en grupos de edad como se ha indicado en
la tabla V y que padecen

- 10 a) de rinitis y rino-faringitis,
b) de otitis de repetición y/o
c) de sinusitis,

ha dado los resultados globales consignados en la tabla VI.

T A B L A V

	Edad	Número de casos	Posología (a)
15	de 0 a 5 años	3	Una pulverización en cada orificio nasal, 2 veces por día.
	de 5 a 10 años	22	Una pulverización en cada orificio nasal, 3 veces por día.
20	de 10 a 20 años	10	Dos pulverizaciones en cada orificio nasal, 2 veces por día.
	de 20 años en ade- lante.	15	Dos pulverizaciones en cada orificio nasal, 3 veces por día.

25 Nota: (a) duración media del tratamiento: de 2 a 3 semanas

1

T A B L A VI

Resultados globales

Resultados	Número de casos	Porcentaje
Muy buenos	3	6
Buenos	34	68
Medios	4	8
Nulos	9	18

5

10

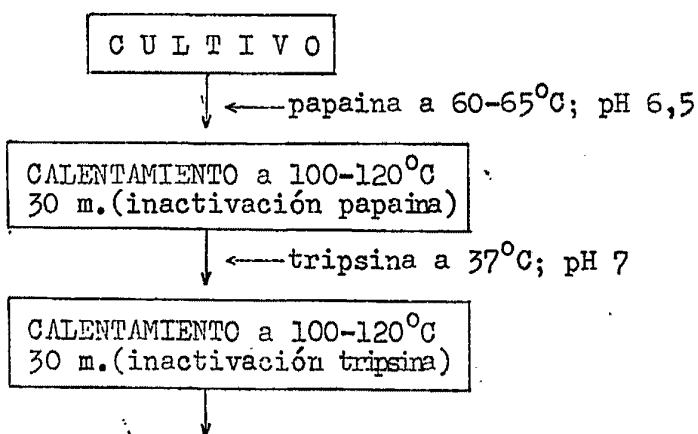
15

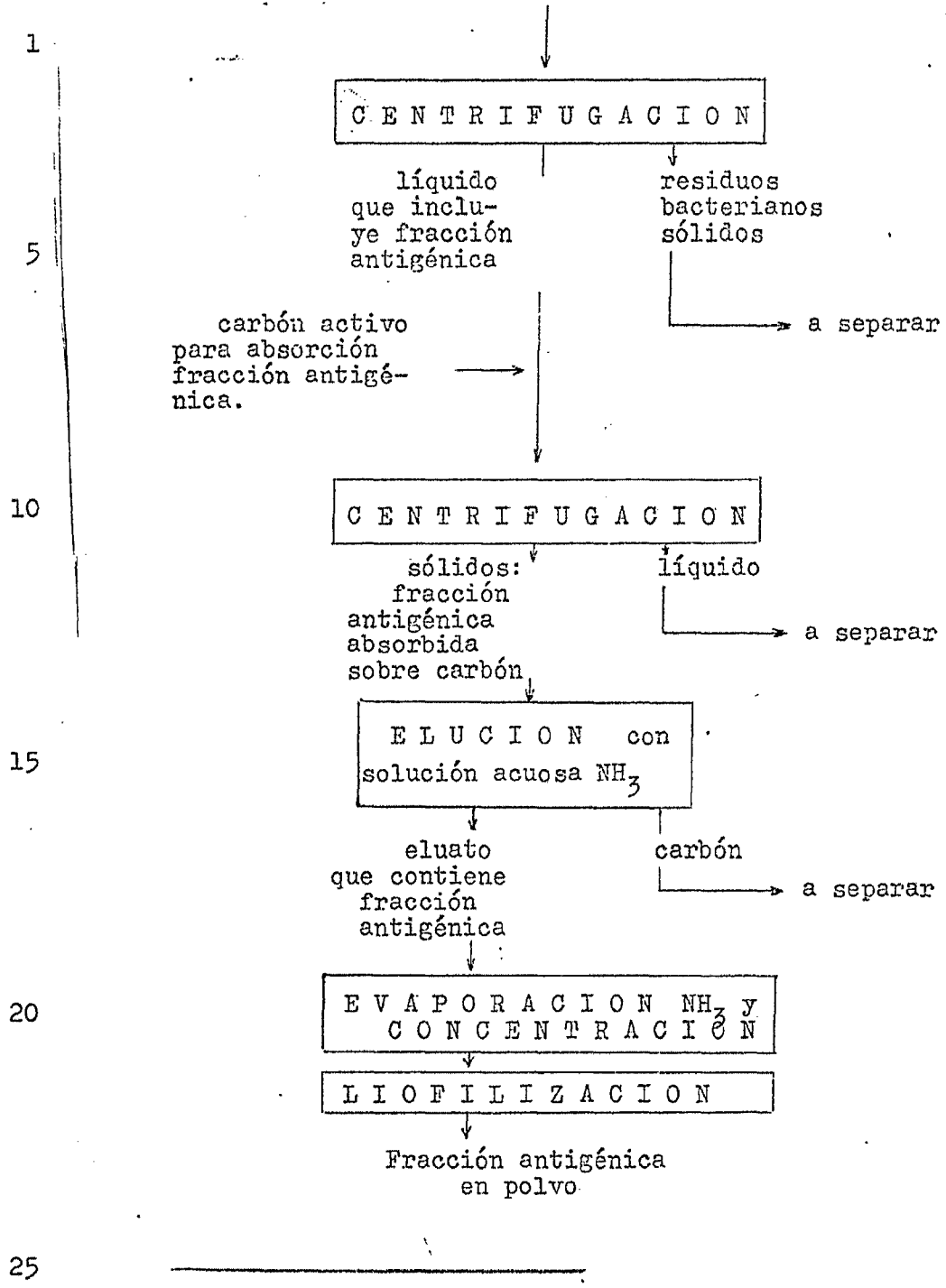
En el 82% de los resultados útiles de la tabla VI, se observa una eficacia a partir del 15^o día de tratamiento con un efecto duradero puesto que en su mayoría los enfermos no presentaron más reincidencia de sus síntomas durante un periodo de 2 a 3 meses después del final de su tratamiento. Para los 50 enfermos no se observó caso alguno de intolerancia.

DIAGRAMA I

20

25





1 minutos, porque la extracción y la purificación de las frac
ciones antigénicas comprenden sucesivamente: la eliminación
por centrifugación de las sustancias sólidas de origen bac
teriano resultantes de la lisis, la absorción sobre un sopor
5 te sólido principalmente el carbón de las fracciones antigé
nicas contenidas en el medio líquido después de la centrifu
gación, la superación por centrifugación del soporte sobre
el cual se han absorbido las fracciones antigénicas, la elu
ción de las fracciones antigénicas del soporte por medio de
10 una solución acuosa de NH_3 , la evaporación de NH_3 y la con
centración del eluato y luego una liofilización para obtener
en forma de polvo fracciones antigénicas y porque se mezclan
las nueve fracciones antigénicas así obtenidas.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, ca
15 racterizado porque se cultiva por separado cada una de las
cepas Staphylococcus aureus 634, Staphylococcus aureus 636,
Staphylococcus aureus 659, Streptococcus 147, Streptococcus
pyogenes 155, Streptococcus pyogenes 1178, Diplococcus --
pneumoniae 209 y Diplococcus pneumoniae 210 sobre un medio
20 nutritivo que comprende 1500 g de NaCl, 1500g de fosfato
bipotásico 600 g de fosfato monopotásico, 600 g de fosfato
monoamónico, 1500 g de glucosa, 60 g de sulfato de magnesio,
600 g de glicerina, 600 g de autolisato de levadura, 6 g de
sulfato de manganeso, 1,50 g de clorhidrato de tiamina, 1,50
25 g de clorhidrato de piridoxina, 1,50 g de pantotenato cálcico,

1 1,50 g de ácido nicotínico, 0,75 g de riboflavina y agua en
complemento hasta un volumen de 300 litros.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, ca-
racterizado porque se cultiva la cepa de Neisseria catarrha-
5 lis 987 sobre un medio nutritivo que comprende 250 ml de sue-
ro de caballo, 200 g de peptona, 10 g de glucosa, 25 g de NaCl
y agua hasta un volumen de 5 litros.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, carac-
terizado porque cada una de las nueve cepas se somete por se-
10 parado a una lisis enzimática que comprende:

- el tratamiento por medio de papaina a 60-65°C a
un pH de 6,5 durante 3 horas,
- la inactivación de la papaina mediante calenta-
miento a 100-120°C durante 30 minutos,
- 15 -el tratamiento por medio de tripsina a 37°C, a
un pH de 7, durante 3 horas, y
- la inactivación de la tripsina por calentamiento
a 100-120°C durante 30 minutos.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, carac-
20 terizado porque se mezclan las fracciones antigénicas liofiliza-
das a razón de 3 partes en peso de cada una de las fracciones
antigénicas liofilizadas de Staphylococcus aureus 634 Staphy-
lococcus aureus 636, Staphylococcus aureus 659, Streptococcus
147, Streptococcus pyogenes 155, Streptococcus pyogenes 1178,
25 Diplococcus pneumoniae 209, y Diplococcus pneumoniae 210 por

1 1 parte en peso de fracción antigénica liofilizada de Neisseria
catarrhalis 987.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, para
la preparación de un producto nuevo constituido por fraccio-
5 nes antigénicas de origen bacteriano, caracterizado porque

a) se cultiva por separado

- cada una de las cepas de Staphylococcus aureus
634, Staphylococcus aureus 636, Staphylococcus aureus 659,
Streptococcus 147, Streptococcus pyogenes 155, Streptococcus
10 pyogenes 1178, Diplococcus pneumoniae 209 y Diplococcus pneu-
moniae 210 del catálogo de la Colección del Centro Internacio-
nal de Distribución de Cepas y de Informaciones sobre los Ti-
pos Microbianos de Lausanne, sobre un medio nutritivo líquido
que comprende 1500 g de NaCl, 1500 g de fosfato bipotásico,
15 600 g de fosfato monopotásico, 600 g de fosfato monoamónico,
1500 g de glucosa, 60 g de sulfato de magnesio, 600 g de gli-
cerina, 600 g de autolisato de levadura, 6 g de sulfato de -
manganeso, 1,50 g de clorhidrato de tiamina, 1,50 g de clorhi-
drato de piridoxina, 1,50 g de pantotenato de calcio, 1,50 g
20 de ácido nicotínico, 0,75 g de riboflavina y agua en comple-
mento hasta un volumen de 300 litros.

- La cepa de Neisseria catarrhalis 987 del catá-
logo de la colección del Centro Internacional de Distribución
de Cepas y de Informaciones sobre los Tipos Microbianos de -
25 Lausanne, sobre un medio nutritivo líquido que comprende 250
ml de suero de caballo, 200 g de peptona, 10 g de glucosa, -

1 25 g de NaCl y agua hasta un volumen de 5 litros;

b) se someten los cultivos de cada una de las nueve cepas a una lisis enzimática que comprende

5 - el tratamiento por medio de papaina a 60°C, a un pH de 6,5 durante 3 horas,

- la inactivación de la papaina por calentamiento a 100°C durante 30 minutos,

- el tratamiento por medio de tripsina a 37°C, a un pH de 7, durante 3 horas,

10 - la inactivación de la tripsina por calentamiento a 100°C durante 30 minutos;

c) se somete el medio resultante de la lisis enzimática de cada cepa a una centrifugación para eliminar las substancias sólidas de origen bacteriano;

15 d) se somete a una absorción de cada una de las fracciones antigénicas, contenidas en el medio líquido después de la centrifugación, sobre carbón;

20 e) se somete cada medio resultante a una centrifugación para recoger el carbón sobre el cual se fija cada una de las fracciones antigénicas;

f) se somete a una elución cada una de las fracciones antigénicas absorbidas sobre el carbón por medio de una solución acuosa de NH_3 ,

25 g) se evapora el amoníaco contenido en cada eluato, se concentra cada solución acuosa restante y se liofiliza, y

1 h) se mezcla cada una de las nueve fracciones anti-
génicas así obtenidas a razón de 3 partes en peso de cada
una de las fracciones antigénicas liofilizadas de Staphy-
5 lococcus aureus 634, Staphylococcus aureus 636, Staphylo-
coccus aureus 659, Streptococcus 147, Streptococcus pyogenes
155, Streptococcus pyogenes 1178, Diplococcus pneumoniae 209,
y Diplococcus pneumoniae 210, por una parte en peso de frac-
ción antigénica liofilizada de Neisseria catarrhalis 987.

10 7. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la patente de invención que se solicita
por: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN NUEVO PRODUCTO,
UTIL EN TERAPEUTICA PARTICULARMENTE PARA EL TRATAMIENTO DE
LAS INFECCIONES DEL MEDIO OTO-RINO-LARINGOLOGICO.

15 Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente memoria descriptiva que consta de treinta y
una páginas mecanografiadas.

Madrid, 5 de septiembre de 1.975

BERNARDO UNGRIA

P.P. 

20

25