



ESPAÑA

10 ES	11 NUMERO 444.983	10 A 1
21	22 FECHA DE PRESENTACION 7 FEB. 1976	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO 75 04003	32 FECHA 7 Febrero 1975	33 PAIS Francia
--	----------------------------	--------------------

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL B01F; A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA ---
------------------------	--	---

64 TITULO DE LA INVENCION

"Procedimiento de preparaci3n de emulsiones estables de agua en aceite"

71 SOLICITANTE (S)

AGENCE NATIONALE DE VAORISATION DE LA RECHERCHE (ANVAR)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

13, rue Madeleine Michelis, 92522 Neuilly-Sur-Seine, Francia

72 INVENTOR (ES)

Françoise Audibert, Edgar Lederer y Louis Chedid

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

M. Curell Suñol

DE/PL - 0033 76 B -ANVAR- "Emulsion végétale adjuvante"  
EX-FR-II

**CONCEDIDA**

P A T E N T E   D E   I N V E N C I O N

por VEINTE años

solicitada en España a favor de AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (ANVAR), de nacionalidad francesa, domiciliada en 13, rue Madeleine Michelis, 92522 Neuilly-Sur-Seine, Francia, por "Procedimiento de preparación de emulsiones estables de agua en aceite", con prioridad de la solicitud francesa 75 04003 de fecha 7 Febrero 1975. - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

- La invención se refiere a la preparación y uso de nuevas composiciones que permiten la administración, en forma eficaz y bien tolerada, de coadyuvantes inmunológicos capaces de estimular en el anfitrión respuestas inmunitarias a antígenos de diferentes tipos, y a la obtención de estas preparaciones coadyuvantes. La invención se refiere en particular a la fabricación de preparaciones que permiten la administración eficaz y bien tolerada de agentes coadyuvantes que sirven para reforzar y exaltar la acción de los inmunógenos débiles utilizables para la inmunización del hombre y de los animales de sangre caliente contra infecciones bacterianas,
- 5.
- 10.

virales y parasitarias y contra diferentes antígenos tisulares de origen normal o patológico, en particular contra aquellos que originan tumores. La invención se refiere finalmente, más particularmente, a la fabricación de preparaciones de vacunas que contienen tales agentes coadyuvantes además del antígeno vacunante propiamente dicho de estas preparaciones de vacunas. - - - - -

5.

En la literatura se han descrito ya numerosos agentes, eficaces como coadyuvantes inmunológicos. Los más conocidos son los coadyuvantes de Freund: a) el coadyuvante incompleto de Freund que es a base de aceite mineral (por ejemplo el aceite mineral conocido bajo la designación "Bayol F"), con adición de un agente emulsionante (manitol monooleato), conocido bajo la designación "Arlacel"; b) el coadyuvante completo de Freund que tiene la misma composición que el primero pero que contiene micobacterias muertas. - - - - -

10.

15.

En este último caso se pueden substituir las micobacterias enteras por paredes purificadas o fracciones liposolubles tales como la cerada D. Se han descrito recientemente agentes coadyuvantes hidrosolubles que pueden obtenerse igualmente a partir de las micobacterias o de otras bacterias. Finalmente, más recientemente aún, se han descrito agentes coadyuvantes que se han obtenido por síntesis. - - -

20.

La acción coadyuvante de los coadyuvantes de tipo Freund a base de aceite mineral y de Arlacel necesita su emulsionado a partir de una parte de fase aceitosa por una parte

25.

de fase acuosa. El empleo de Arlacel es indispensable y las proporciones de fase acuosa con respecto a fase aceitosa son imperativas. - - - - -

5. A pesar de su alto poder coadyuvante, tales preparaciones son sin embargo inutilizables en la práctica debido a la agresividad presentada por un agente no metabolizable, a la falta de inocuidad del agente emulsionante y, para el coadyuvante completo, a los efectos inmunopatológicos manifestados en esta composición por ciertas preparaciones mico-
10. bacterianas. - - - - -

15. No puede preverse la substitución del aceite mineral por un aceite vegetal metabolizable en el coadyuvante in completo de Freund, sin otra modificación, puesto que entonces no se obtienen emulsiones estables. Se han previsto ciertas tentativas de estabilización de tales emulsiones pero a costa de proporciones importantes de agentes emulsionantes sobre estabilizantes difícilmente aceptables debido a su falta de inocuidad. - - - - -

20. La invención tiene por objetivo evitar estos diversos inconvenientes y proporcionar una composición emulsionable o emulsionada de la que todos los constituyentes sean, sin excepción, no tóxicos y fácilmente metabolizables, permitiendo al mismo tiempo a los coadyuvantes inmunológicos manifestar fuertemente su acción coadyuvante con respecto a los
25. antígenos vacunantes, en particular inmunógenos débiles, susceptibles de ser utilizados para la inmunización del hombre

o del animal. - - - - -

Por ello la invención se refiere a un procedimiento de preparación de emulsiones estables de agua en aceite, en las cuales el aceite está constituido por un aceite vegetal metabolizable, caracterizado porque una fase acuosa, en particular agua o una disolución acuosa, se mezcla bajo agitación con un aceite vegetal metabolizable, haciéndose intervenir la fase acuosa y el aceite metabolizable en proporciones de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 volúmenes de fase acuosa por 10 volúmenes de dicho aceite vegetal, en presencia de proteínas en estado disuelto en la fase acuosa y que se hacen intervenir en una cantidad capaz de asegurar la estabilidad de la emulsión finalmente obtenida. - - - - -

Preferentemente, el procedimiento se realiza de modo que la composición contiene entre aproximadamente 2,5 y 5 volúmenes de agua, en particular del orden de 3 volúmenes de agua por 10 volúmenes de dicho aceite vegetal. - - - - -

La invención descansa en el descubrimiento de que es posible realizar una emulsión muy estable de agua en aceite a partir de un aceite vegetal y de agua, en presencia de proteínas como únicos agentes estabilizantes, a condición sin embargo de utilizar proporciones de aceite netamente superiores a las del agua. - - - - -

Si no se respeta esta última condición, es decir la utilización para la constitución de una emulsión de agua

en aceite de volúmenes iguales de estos dos constituyentes, no se puede lograr la constitución de una emulsión estable, solamente en presencia de proteínas. - - - - -

5. Es pues notable que, por medio de una modificación solamente de las proporciones del agua y del aceite, sea posible, en ausencia de cualquier otro agente estabilizante bien conocido en este campo -en particular el Arlacel-, realizar una emulsión estable. - - - - -

10. Cuando la emulsión en cuestión debe servir de vehículo para un medicamento, es naturalmente conveniente que las proteínas utilizadas no sean inmunógenas con respecto al anfitrión al que está destinado el medicamento. En este último caso se obtiene pues perfectamente una emulsión de la que todos los constituyentes son metabolizables. - - - - -

15. Las proporciones de proteínas que deben utilizarse varían en un intervalo bastante importante. En general, están comprendidas entre aproximadamente 30 y aproximadamente 150 mg, preferentemente entre aproximadamente 40 y aproximadamente 120 mg, por ejemplo de 60 mg de proteínas por ml de fase acuosa de la emulsión. - - - - -

20. Interviniendo en estas proporciones, las proteínas proveen a la estabilidad de la emulsión final. Igualmente pueden ser suficientes para conferir al medio el carácter de isotonicidad requerido para su inyección en el hombre o el animal. Sin embargo, si es necesario, se podrá recurrir a una

25.

adición suplementaria de un agente capaz de conferir esta isotonicidad al medio, en particular al cloruro de sodio o a la glucosa, en proporciones requeridas para la obtención de esta isotonicidad. - - - - -

5. El origen del aceite vegetal empleado no tiene ninguna importancia por lo que se refiere a la estabilidad de la emulsión. Se obtienen resultados análogos tanto si se utiliza aceite según la Pharmacopée Française, 8ava ed., 1965, p. 574-581, en particular aceite de cacahuete o aceite de oliva, por ejemplo, u otros aceites, por ejemplo aceites de sésamo. - - - - -

15. Igualmente se pueden emplear, como proteínas -cuando la emulsión está destinada a servir de vehículo de un principio activo de medicamento, preferentemente de coadyuvante de la inmunidad no específica- todas las proteínas no inmunógenas con respecto al anfitrión, preferentemente proteínas de origen humano o animal, según que el medicamento esté destinado al hombre o a un animal. Por ejemplo, estas proteínas estarán constituidas por seroalbúminas o por globulinas extraídas de sangre humana o animal, de plasma o de placenta, pudiendo estas proteínas conservarse en medio acuoso. - - - - -

25. Las emulsiones así obtenidas constituyen un vehículo selecto para principios activos de vacunas y más aún para agentes coadyuvantes de la inmunidad no específica. Se ha constatado que estos principios activos de vacunas y, más

- aún, estos agentes coadyuvantes eran capaces de ejercer mejor su actividad cuando son administrados al anfitrión en el seno de la emulsión preparada y utilizada según la invención. En particular, la eficacia del estímulo en el caso del anfitrión de las respuestas inmunitarias por dichos agentes coadyuvantes es del mismo orden de magnitud cuando se administran en suspensión en el seno del coadyuvante incompleto de Freund. Esta actividad es tanto más notoria cuanto la administración del agente coadyuvante bajo esta forma no va acompañada prácticamente de los inconvenientes citados anteriormente, con respecto al coadyuvante de Freund. - - - - -
- 5.
- 10.

- Debe observarse que el carácter de emulsión de "agua en aceite" de las emulsiones preparadas y utilizadas según la invención es importante con respecto a la función que deben desempeñar en el marco de la aplicación preferida de la invención. En particular es importante que estas emulsiones sean estables, incluso en presencia de una fase acuosa, especialmente en situaciones del tipo de aquéllas a las que están destinadas a encontrar en los organismos en que se introducen, con un agente coadyuvante y, preferentemente también, un antígeno vacunante o análogo. En particular, es importante que las gotitas de agua en suspensión en la fase aceitosa de la emulsión de agua en el aceite no tiendan a es capar inmediatamente de la misma desde el momento en que esta emulsión se pone en contacto con una fase acuosa. En esta estabilidad parece pasarse la difusión retardada, sin duda necesaria, de los principios activos introducidos en el orga
- 15.
- 20.
- 25.

nismo, a fin de permitirles ser captados por los sistemas in  
munológicamente competentes, por ejemplo los macrófagos, los  
ganglios, etc. - - - - -

5. La invención se refiere pues igualmente a la prepa  
ración de un medicamento que contiene a título de principio  
activo un agente coadyuvante del género en cuestión, prefe-  
rentemente asociado a un antígeno vacunante, estando asocia-  
dos estos principios activos con una emulsión del tipo defi-  
nido anteriormente. - - - - -

10. Un agente coadyuvante preferido está constituido  
por un oligómero pobre o exento de azúcares neutros, cuya  
unidad monómero contiene los aminoazúcares y los ácidos ami-  
nados de los polímeros constitutivos de las paredes celula-  
res de las micobacterias o de las células de Nocardia. Se  
15. han descrito procedimientos de obtención de tales agentes  
coadyuvantes en la solicitud de patente francesa n° 71 41610  
del 19 noviembre 1971 y en la primera solicitud del certifica  
do de adición n° 72 22120 del 19 junio 1972. - - - - -

20. Otros agentes coadyuvantes preferidos están consti  
tuidos por fragmentos solubles de peptidoglicano que inter-  
vienen en la constitución de paredes celulares de procario-  
tes, en particular oligosacáridos-oligopéptidos, formados  
por unidades N-acetilglucosamina, unidades de ácido N-acilmu  
rámico, en las que el grupo acilo es preferentemente del ti  
25. po glicolilo o acetilo, y agrupaciones tripeptídicas, tetra-  
peptídicas y heptapeptídicas formadas en particular a partir

de L-alanina, de ácido D-glutámico, de ácido meso-alfa-épsilon-diaminopimélico y de D-alanina, habiendo sido tales agentes descritos en particular en la solicitud de certificado de adición francés nº 73 37806 del 23 octubre 1973. Han sido también objeto de publicación en "Biochemical and Biophysical Research Communications"; 1974, Vol. 56 nº 3, p. 561-567. --

Otros aún están constituidos por un compuesto formado por un ácido N-acilmurámico, al que está ligada una corta cadena peptídica que contiene por lo menos dos aminoácidos y en el que el grupo acilo está formado por un grupo glicolilo o acetilo y en el que la corta cadena peptídica comprende un primer aminoácido fijado en el ácido N-acilmurámico, constituido por la L-alanina y un segundo aminoácido constituido por el ácido D-glutámico, siendo las funciones carbonilo de este segundo aminoácido, individualmente, ya bien libres ya bien aminadas (en el caso de una cadena peptídica que no presente más que dos aminoácidos) ya bien acopladas en un enlace con otro ácido aminado (en el caso de una cadena peptídica más larga), habiéndose descrito tales agentes coadyuvantes en la solicitud del tercer certificado de adición francés nº 74 22909 presentada el 1 julio 1974. Entre estos agentes coadyuvantes, es conveniente citar el N-acetilmuramildipéptido, cuyo dipéptido contiene L-alanina y ácido D-glutámico, más exactamente N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina. La actividad coadyuvante de este compuesto se ha descrito en "Biochemical and Biophysical Research Communications", 1974, Vol. 59, nº 4, p. 1317-1325. - - - - -

Otros agentes coadyuvantes están constituidos por preparaciones liposolubles aisladas de Mycobacterium tuberculosis, por ejemplo cera D o cord factor extraídos de cepa Peurois. - - - - -

5. Las preparaciones coadyuvantes así obtenidas en forma de emulsión son muy estables. En los ensayos que se han realizado, las preparaciones de este tipo conservaron su estabilidad al cabo de tres meses de almacenaje. - - - - -

10. El emulsionado de tales composiciones es además extremadamente fácil. Puede realizarse de forma extemporánea a partir de los constituyentes que se han indicado anteriormente y en las proporciones que se han enunciado, por simple mezcla y directamente en la jeringa que sirve para la administración de la preparación al anfitrión. - - - - -

15. La invención se refiere igualmente a la preparación de los llamados "kits" o sea presentaciones o "juegos" que contienen las cantidades o volúmenes de los diversos constituyentes predeterminados en función de las proporciones que se han definido anteriormente y en frascos o recipientes análogos, de modo que el usuario pueda simplemente mezclarlas y producir la emulsión para obtener una composición directamente lista para el empleo. - - - - -

20. La invención se refiere pues, más particularmente, a la preparación de una presentación o "kit" de un vehículo líquido inyectable formado a partir: - - - - -

25.

- agua o suero fisiológico,
- aceite vegetal,
- proteínas no inmunógenas

5. caracterizada porque estos diversos constituyentes son presentados en frascos o <sup>2</sup>receptáculos distintos o no distintos, en volúmenes o pesos predeterminados en función de las proporciones definidas anteriormente, para la formación extemporánea de una emulsión. - - - - -

10. Esta presentación comprende también preferentemente principios activos de medicamento esencialmente constituidos por un antígeno vacunante o por un coadyuvante de la inmunidad no específica, o por ambos a la vez, separados en su caso el uno del otro, pudiendo así cada uno de estos principios activos ser agrupado con el uno o con el otro de dichos constituyentes de la emulsión. - - - - -

15. Por ejemplo: 1) un kit de este género comprende una ampolla que contiene un aceite vegetal, una segunda ampolla que contiene proteínas, en particular proteínas humanas o animales en estado liofilizado, y una tercera ampolla que  
20. contiene un suero fisiológico acuoso, o 2) un kit de este género comprende una ampolla que contiene el aceite vegetal y una segunda ampolla que contiene proteínas humanas o animales en disolución en suero fisiológico. En las dos presentaciones el agente coadyuvante y el principio activo de la vacuna  
25. pueden, ya sea estar contenidos en ampollas igualmente distintas, ya sea también estar incorporados, por ejemplo, en

una u otra de dichas ampollas, según que sean más compatibles con el agua o con el aceite, más solubles con el agua o con el aceite, etc. - - - - -

5. A continuación se describen ejemplos de ensayos, en particular los que han permitido determinar las proporciones relativas de los diversos constituyentes necesarios de una emulsión estable a partir de los constituyentes que se han de finido anteriormente. - - - - -

10. El ensayo realizado, para constatar la estabilidad de la emulsión obtenida observando la adherencia de la emulsión a las paredes del recipiente invertido y, aún mejor, depositando una gota de esta emulsión en la superficie del agua, según la técnica descrita por W.J. Herbert en "Handbook of Experimental Immunology, D.W. Weir ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford y Edimburgo, 1967, 1211, bajo el título "Methods for the preparation of water-in-oil, and multiple, emulsions for use as antigen adjuvants; and notes on their use in immunization procedures". Cuando la emulsión no es estable, la gota se deshace (o se desintegra) por separación de las dos fases. - - - - -

15.

20.

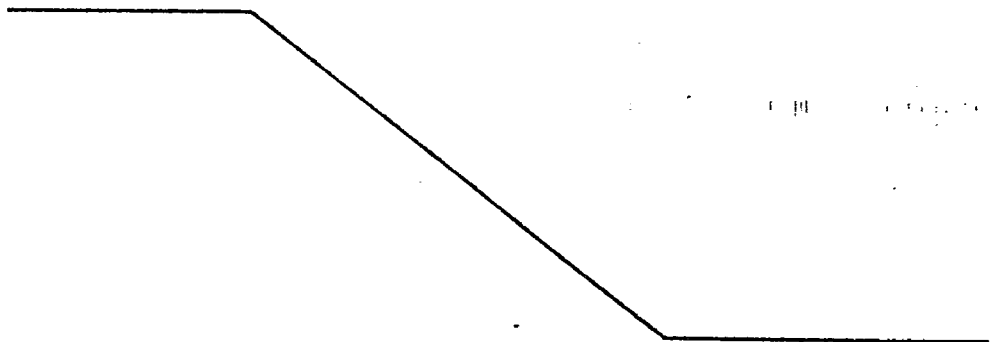
1) Condiciones de obtención de una emulsión estable de agua en aceite.

25. a) Estudio de las proporciones agua-aceite vegetal de la emulsión: comparación entre el coadyuvante incompleto de Freund (aceite mineral) y una emulsión preparada según la

invención a base de aceite de cacahuete. - - - - -

- Si se toma una disolución de agua que contiene 60 mg/ml de seroalbúmina bovina (SAB) y se disponen 10 volúmenes de esta disolución en un mezclador del tipo POTTER, añadiéndose 10 volúmenes de aceite, y se emulsiona a 2000 revoluciones/mm durante 1 minuto, se obtiene una buena emulsión, como habitualmente, con el aceite mineral pero no se observa emulsión con el aceite vegetal. Por el contrario, en estas mismas condiciones, si se disponen 3 volúmenes de la disolución de SAB en 10 volúmenes de aceite se observa una emulsión buena en el aceite vegetal y no se observa emulsión en el aceite mineral. - - - - -
- 5.
- 10.

- Esta experiencia se repite adicionando sistemáticamente, a 10 volúmenes de aceite de cacahuete, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 volúmenes de agua que contiene 60 mg/ml de SAB. Como se constata en la tabla siguiente, se obtiene una emulsión en el aceite vegetal a condición de no sobrepasar la relación 6/10, preferentemente 5/10, obteniéndose el efecto y la estabilidad óptimos cuando las proporciones son de 3/10. - - - - -
- 15.
- 20.



Obtención de estabilidad de la emulsión en función de la relación agua respecto a aceite

Nº de volúmenes de sol. acuosa de SAB * añadidos a 10 volúmenes de aceite de cacahuete	1	1,5	2	2,5	3	4	5	6	7	8	9	10
Obtención de una emulsión	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	-
Estabilidad de la emulsión				±	+	±	-					

\* Solución acuosa a 60 mg/ml de SAB.

5. Por el contrario, con el aceite mineral, es necesario respetar la proporción 10/10. Se obtienen resultados análogos a los del aceite de cacahuete si se utiliza aceite de oliva según la Pharmacopée Française 1965, 8ava edición, o aceite de sésamo, no observándose efecto alguno para las proporciones superiores a 5/10, hallándose el óptimo a 3/10 para el aceite de oliva y a 2,5/10 para el aceite de sésamo. - - -
- 10.

b) Efecto del contenido de proteínas de la disolución acuosa. - - - - -

15. En las experiencias que siguen, se añade siempre un volumen de agua que contiene SAB a 3 volúmenes de aceite de cacahuete. El contenido de SAB en el agua varía entre 15% y 0%. Se constata en la tabla siguiente que las emulsiones estables se obtienen cuando el contenido de proteínas varía entre 4 y 12%. Por debajo de 4% y por encima de 12%, las emulsiones obtenidas no son estables. - - - - -

Obtención y estabilidad de la emulsión en función del contenido de proteínas de la solución acuosa (relación agua/aceite = 1/3)

SAB (% en la sol. acuosa)	0	0,25	0,5	1	2	3	4	6	8	10	12	15
Obtención de la emulsión	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+
Estabilidad de la emulsión					-	-	+	+	+	+	+	-

5. Pueden obtenerse resultados análogos utilizando se-roalbúmina humana (SAH) o proteínas séricas de ratón. - - - -

10. Es preciso observar también que, contrariamente a lo que se observa con los coadyuvantes de Freund, las emulsiones en los aceites vegetales no necesitan la presencia de Arlacel. La presencia de este producto en las emulsiones preparadas y utilizadas según la invención es inútil e incluso desfavorable. - - - - -

15. Los resultados que preceden demuestran que es posible obtener una emulsión estable de agua en aceite vegetal a condición de respetar proporciones bien definidas de la mezcla y concentraciones bien definidas de proteínas en el agua. Puede utilizarse SAH como proteína. La presencia de Arlacel no es necesaria. Es necesario añadir que estas emulsiones pueden conservarse a +4° durante varios días o disponerse de nuevo en emulsión fácilmente en una jeringa de inyección. - - -

2) Propiedades farmacológicas de la emulsión preparada según la invención.

a) Demostración de las propiedades coadyuvantes de la emulsión preparada según la invención.

5. En las experiencias que siguen, el aumento de la respuesta inmunitaria a un antígeno ha sido demostrada utilizando comparativamente el coadyuvante incompleto de Freund y el coadyuvante completo de Freund así como emulsiones de agua en aceite de cacahuete que contienen diferentes preparaciones coadyuvantes. Las fracciones coadyuvantes utilizadas han sido ya sea, como en el coadyuvante completo de Freund, células micobacterianas enteras (Mycobacterium smegmatis), ya sea paredes purificadas de micobacterias, ya sea una preparación liposoluble aislada de Mycobacterium tuberculosis, por ejemplo 10. cera D o cord factor, extraído de la cepa Parrois, ya sea un 15. coadyuvante hidrosoluble precedentemente descrito, preparado por síntesis, el muramildipéptido mencionado anteriormente.-

Los antígenos utilizados han sido la SAB, la ovalbumina o una vacuna gripal, la comercializada bajo la designación MUTAGRIP (Institut Pasteur). - - - - - 20.

La SAB o la ovalbumina en solución en el soluto fisiológico se ha inyectado ya sea sola ya sea en diferentes emulsiones. Las emulsiones realizadas con la ayuda de un POTTER a 2.000 revoluciones/minuto se han realizado en las 25. proporciones siguientes: para las preparaciones a base de acei

te mineral, la relación de agua respecto a aceite es de 1/1, para las a base de aceite vegetal (aceite de cacahuete) esta relación es de 1/3 (en este último caso el antígeno es igualmente el estabilizador de la emulsión). Antes de la emulsión, los coadyuvantes insolubles se han puesto en suspensión en el aceite, la fracción liposoluble se ha disuelto en la fase aceitosa y la preparación hidrosoluble en la fase antigénica. - - - - -

10. Cuando la vacuna gripal es el antígeno, la estabilidad de la emulsión se ha obtenido por adición al soluto fisiológico que contiene la vacuna de 50 mg/ml de la fracción de las proteínas séricas de ratón soluble en sulfato amónico a un tercio de saturación. - - - - -

15. Las experiencias se han realizado con ratones y con ratas. - - - - -

- Experiencias realizadas con ratones

Los ratones son hembras Swiss de una edad de dos meses procedentes de la cría del C.N.R.S. (Orléans). Están distribuidos en lotes de 9. - - - - -

20. Respuesta a la SAB.

El día 0 reciben por vía plantar 500 µg de SAB en un volumen de 0,05 ml de las diferentes emulsiones descritas anteriormente. La dosis de preparación coadyuvante por ratón

es de 200  $\mu$ g (las dosis de todas las preparaciones se expresan en peso seco) excepto en una experiencia en que se ha administrado a dosis variables de fracción liposoluble (cera D o cord factor). - - - - -

5. El día 17 ó 30, se efectúa un recuerdo de 100  $\mu$ g de SAB en soluto fisiológico, igualmente por vía plantar. - -

Los ratones se sangran en la cola cada semana y luego 4 días después del recuerdo y 6 días después de éste se sacrifican por sangría en la aorta abdominal. - - - - -

10. - Experiencias realizadas con ratas.

Los animales utilizados son machos Lewis de 250 g, procedentes de la cría del C.N.R.S. (Orléans). Están distribuidos en lotes de 7. - - - - -

15. El día 0 reciben por vía plantar 1 mg de ovalbumina en 1 volumen de 0,1 ml de las preparaciones descritas anteriormente. Los coadyuvantes se administran a la dosis de 500  $\mu$ g. - - - - -

20. Se da un recuerdo de 100 mg de antígeno el día 35. Se efectúan sangrías semanales en la cola y los animales se sacrifican el día 42 por sangría en la aorta abdominal. - -

- Estimación de las tasas de anticuerpos.

1) Anti-SAB o antiovalbumina. - - - - -

Hemaglutinación pasiva. - - - - -

5. A series de dilución de los sueros a ensayar se les añade una cantidad constante de glóbulos rojos de corde-ro marcados por la SAB o la ovalbumina según el tipo del sue-ro. Los títulos de los sueros se expresan por medio del in-verso de la dilución más fuerte que ha provocado la aglutina-ción de los hematíes. - - - - -

10. Para las sangrías intermedias, las dosificaciones se realizan en la mezcla de los sueros (por lote). Para la última sangría, los títulos de cada lote representan la me-dia de las dosis efectuadas en los sueros separados. - - - - -

"Antigen binding capacity"

15. La capacidad de los sueros para fijar la SAB se mi-de con la ayuda de SAB marcada al 125 I según el método de Faar descrito en la publicación de Minden P., Farr S. titula-da "Método de medida con sulfato amónico de la capacidad de fijación de los antígenos", "Handbook for Exp. Immunol", ed. D.M. Weir Blackwell Scientific Publications, Oxford y Edimbur-go, 1967, p. 463-492. Los resultados se expresan por medio  
20. del inverso de la dilución máxima capaz de precipitar el 33% del antígeno añadido. - - - - -

2) Antivacuna gripal.

Anticuerpos que inhiben la hemaglutinación de los

eritrocitos de pollo por el virus gripal: la dosificación se efectúa empleando diluciones crecientes de suero y 4 dosis hemaglutinantes de virus gripal; después de incubación, se añade la cantidad deseada de eritrocitos de polluelo. Se anota la dilución que inhibe completamente la hemaglutinación.

- Resultados de las dosis.

1) Inmunización por la SAB o la ovalbumina. - - -

Las tablas 1 y 2 dan los títulos anticuerpos obtenidos en el ratón. Se observa, por comparación con el lote testigo que ha recibido el antígeno solo, que se obtienen aumentos importantes de la respuesta inmunológica en todos los lotes que han sido inmunizados por preparaciones coadyuvantes administradas en emulsión y que, en el caso de la respuesta secundaria, después del recuerdo, según una inyección primaria de aceite de cacahuete, el nivel alcanzado por las tasas de anticuerpos es equivalente al observado en los lotes que han recibido el aceite mineral. - - - - -

Se obtiene un efecto notable en presencia de emulsión a base de aceite de cacahuete solo; en cambio, la actividad coadyuvante de las paredes purificadas no puede ser demostrada si se administran en suspensión en el aceite vegetal. - - - - -

En la tabla 3, se observa que en el caso de la rata Lewis se obtienen tasas de anticuerpos análogas después

de la administración de coadyuvante completo de Freund o de células enteras incorporadas en una emulsión de aceite de cacahuete. - - - - -

2) Inmunización por el virus gripal. - - - - -

5. Los resultados indicados en la tabla 4 muestran que las preparaciones obtenidas incorporando ya sea la fracción liposoluble (cord factor o cera D) ya sea paredes purificadas en el aceite de cacahuete tienen un efecto coadyuvante más importante que el coadyuvante de Freund. Ilustran además la posibilidad de utilizar proteínas séricas de la misma especie para obtener una emulsión estable y eficaz. - - - -
- 10.

b) Tolerancia a la emulsión de agua en aceite vegetal: ausencia de artrogenia y de poliartrogenia en la rata Lewis.

15. Administradas en la pata, en suspensión en el coadyuvante incompleto de Freund, células enteras o paredes de micobacterias así como las ceras D de ciertas cepas provocan, en el caso de la rata Lewis, a nivel de la inyección, una artritis que puede generalizarse en forma de una poliartritis coadyuvante considerada por algunos como una enfermedad autoinmunitaria. - - - - -
- 20.

Los inventores han comparado, en el caso de la rata Lewis, la actividad artrógena de las células micobacterianas y de la fracción liposoluble inyectándolas ya sea en el

coadyuvante incompleto de Freund ya sea en el aceite de ca-  
cahuete. - - - - -

Los animales utilizados son ratas Lewis macho de  
250 g procedentes de la cría del C.N.R.S. (Orléans). - - - -

5. Las preparaciones de origen micobacteriano son las  
siguientes: células enteras, paredes de Mycobacterium smegma-  
tis. La fracción liposoluble utilizada en las experiencias  
ha sido extraída a partir de M. tuberculosis cepa Peurois. -

10. Las dosis de todas las preparaciones se expresan  
en peso seco. Todas las preparaciones han sido dispuestas en  
suspensión en el coadyuvante incompleto de Freund o el acei-  
te vegetal e inyectadas en el cojín plantar posterior dere-  
cho con un volumen de 0,1 ml. Los animales se pesan y sus pa-  
tas se examinan el día 0, el 7 y el 14. - - - - -

15. Los animales se sacrifican el día 21 y las patas  
posteriores se pesan. La severidad de la artritis se expresa  
por medio de la diferencia de peso entre la pata inyectada y  
la pata no inyectada, así como por los signos de generaliza-  
ción de la inflamación en las patas anteriores y en la cola.

20. Los resultados indicados en la tabla 5 confirman  
que mientras las células enteras de M. smegmatis administra-  
das en el coadyuvante incompleto de Freund inducen una fuer-  
te artritis y una poliartritis importante detectables a par-  
tir del día 14, estas mismas preparaciones, inyectadas en

aceite vegetal, no provocan ni artritis ni poliartritis coadyuvante en el caso de la rata Lewis. - - - - -

5. Los ensayos de coadyuvancia realizados en el ratón y la rata muestran que es posible obtener un efecto coadyuvante equivalente al coadyuvante de Freund utilizando aceite vegetal asimilable como vehículo de preparaciones micobacterianas insolubles (células enteras), liposolubles o hidrosolubles. Por ello, es necesario utilizarlo según modalidades experimentales precisas que permiten la obtención de emulsiones estables. - - - - -

10. Es necesario observar que el aceite vegetal, sin adición de agentes tales como Arlacel, es emulsionable y que se puede estabilizar la emulsión por adición de proteínas homólogas de la especie a inmunizar, como lo muestran los resultados obtenidos con la vacuna gripal consignados en la tabla 4. - - - - -

15. Las experiencias que estudian la producción de la poliartritis en el caso de la rata Lewis muestran que existe una diferencia entre la emulsión a base de aceite mineral y la emulsión a base de aceite vegetal. En efecto, las preparaciones a base de aceite mineral son capaces de inducir una inflamación local importante y una artritis generalizada en el caso de la rata. No es así en el caso de las preparaciones a base de aceite vegetal. - - - - -

20. Se obtienen pues un vehículo farmacéutico de gran

25.

valor y unas preparaciones farmacéuticas nuevas que permiten asociar eficazmente principios activos de vacunas con coadyuvantes conocidos por su eficacia, pero cuyo empleo en medicamentos, utilizables en terapéutica humana o veterinaria, no era siempre fácil. - - - - -

5.

La invención se aplica al reforzamiento de las defensas inmunitarias del hombre o del animal con respecto a los antígenos más variados. Se citarán, a título de ejemplo, la aplicación de la invención a vacunas a base de micobacte-  
rias atenuadas del tipo BCG, de vacunas contra el paludismo, etc. La invención se aplica igualmente a las vacunas destinadas a prevenir las enfermedades virales, por ejemplo la fiebre aftosa y las hepatitis virales, o las parasitarias, por ejemplo las bilharciosis. - - - - -

10.

La administración de los medicamentos así constituídos se realiza preferentemente por vía subcutánea o intramuscular. Se prevé también por vía oral. - - - - -

15.

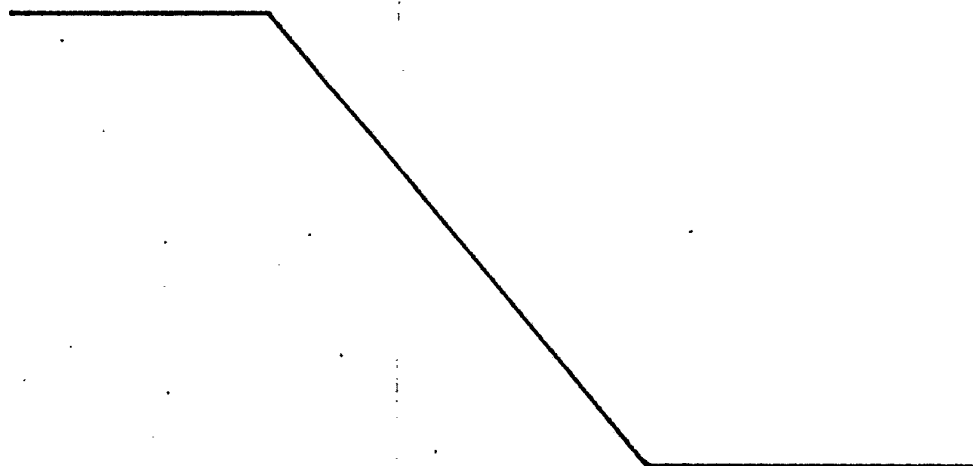


Tabla 1

Respuesta inmunológica de los ratones inmunizados por la SAB con diferentes preparaciones micobacterianas en preparaciones a base de aceite mineral o vegetal

Vehículo	Coadyuvante Cada preparación a la dosis de 200 $\mu$ g	Título anticuerpos (dilución de los sueros)											
		Día 7		Día 14		Día 17		Día 21		Día 24			
		HAP <sup>x</sup>	ABC <sup>†</sup>	HAP	ABC	Recuerdo <sup>o</sup>	HAP	ABC	HAP	ABC			
Soluto fisiológico	-	<3	<20	<3	<20			<3	<20	<3	<20	<3	<20
Composición a base de aceite mineral +	M.tub. S. Peurois fracción liposo-luble	<3	<20	6	65			50	200	800	800	200	800
	M.smeg. paredes purificadas	6	24	800	700			1600	500	3200	4000	800	200
Composición a base de aceite vegetal $\bar{m}$	M.tub. S. Peurois fracción liposo-luble	<3	20	<3	37			50	60	800	200	800	200
	M.smeg. paredes purificadas	200	50	50	340			400	250	3200	950	200	1600
	Testigo M.smeg. paredes purificadas sin emulsión	200	70	<3	170			200	200	1600	2300	<3	50

9 ratones por lote reciben en el cojín posterior derecho 500 $\mu$ g de SAB en la mezcla apropiada.

+ Emulsión realizada con 1 volumen de soluto fisiológico y 1 volumen de coadyuvante incompleto de Freund.

$\bar{m}$  Emulsión realizada con 1 volumen de soluto fisiológico, 3 volúmenes de aceite de cacahuete, excepto para el último lote en que el antígeno y el coadyuvante se disponen en suspensión en el aceite de cacahuete sin emulsión.

x HAP = hemaglutinación pasiva.

† ABC = "antigen binding capacity".

o Recuerdo de 100 $\mu$ g de SAB.

Tabla 2

Respuesta inmunológica de los ratones inmunizados por la SAB con diferentes preparaciones micobacterianas en preparaciones a base de aceite mineral o vegetal

Vehículo	Coadyuvante Cada preparación a la dosis de 100 µg	Título anticuerpos (dilución de los sueros)									
		Día 7		Día 14		Día 30	Día 34		Día 36		
		HAP <sup>x</sup>	ABC <sup>†</sup>	HAP	ABC	Recuerdo <sup>o</sup>	HAP	ABC	HAP	ABC	
Soluto fisiológico	-	<3	<20	6,25	45	/	<3	<20	<3	<20	
Composición a base de aceite mineral <sup>+</sup>	-	<3	<20	100	350	/	800	1400	2300	2500	
	M. smeg. paredes purificadas	<3	<20	100	270	/	800	750	1750	1600	
Composición a base de aceite vegetal <sup>‡</sup>	-	<3	<20	12,5	45	/	25	45	560	400	
	M. smeg. paredes purificadas	<3	<20	25	170	/	100	280	1050	1000	
	M. tub. S. Peurois fracción lipo soluble	<3	<20	50	140	/	100	270	1300	800	

9 ratones por lote reciben en el cojín posterior derecho 500 µg de SAB en la mezcla apropiada.

<sup>+</sup> Emulsión realizada con 1 volumen de soluto fisiológico y 1 volumen de coadyuvante incompleto de Freund.

<sup>‡</sup> Emulsión realizada con 1 volumen de soluto fisiológico y 3 volúmenes de aceite de cacahuete.

<sup>x</sup> HAP = hemaglutinación pasiva.

<sup>†</sup> ABC = "antigen binding capacity"

<sup>o</sup> Recuerdo de 100 µg de SAB.

Tabla 3

Respuesta anticuerpos de las ratas Lewis después de inyección por vía plantar de ovalbumina administrada en emulsión con micobacterias en composiciones a base de aceite mineral o vegetal

5.

	Día 7	Día 21	Día 35	Día 42
	HAP <sup>x</sup>	HAP	Recuerdo <sup>o</sup>	HAP
Composición a base de aceite mineral <sup>+</sup> + M.smeg. cel. enteras 500 $\mu$ g	50	<3		12.800
Composición a base de aceite vegetal <sup>o</sup> + M.smeg. cel. enteras 500 $\mu$ g	25	<3		7.400

7 animales por lote reciben 1 mg de ovalbumina en el cojín plantar derecho.

<sup>+</sup> Emulsión realizada con 1 volumen de soluto fisiológico y 1 volumen de coadyuvante incompleto de Freund.

10. <sup>o</sup> Emulsión realizada con 1 volumen de soluto fisiológico y 3 volúmenes de aceite de cacahuete.

<sup>x</sup> HAP : hemaglutinación pasiva.

<sup>o</sup> Recuerdo de 100  $\mu$ g de ovalbumina.

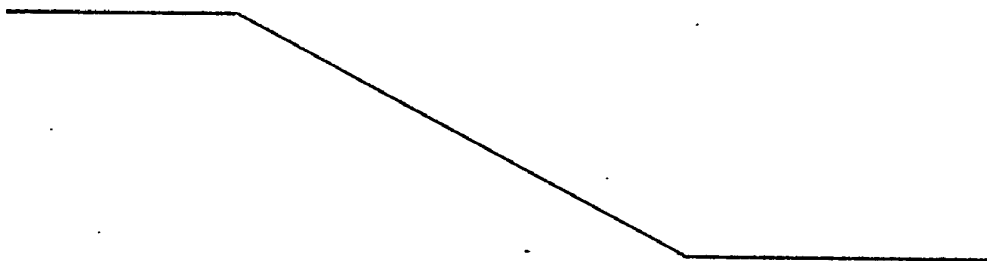


Tabla 4

Anticuerpos que inhiben la hemaglutinación en los ratones vacunados por el virus gripal (Mutagrip) en preparaciones a base de aceite mineral o vegetal.

Vehículo	Coadyuvante	Dosis ( $\mu$ g)	Título anticuerpos (dilución de los sueros)				
			Día 7	Día 14	Día 15 (Recuerdo)	Día 21	Día 28
Soluto fisiológico	-	-	neg.	neg.		50	50
Composición a base de aceite mineral <sup>+</sup>	-	-	neg.	12,5		50	200
Composición a base de aceite vegetal $\Delta$	-	-	neg.	neg.		25	50
	M. tuberculosis S. Peurois Fracción liposoluble	50	neg.	12,5		200	200
	M. smegmatis paredes purificadas	100	neg.	12,5		100	400

9 ratones por lote reciben por vía intraperitoneal, el día 0, 50 unidades de Mutagrip en la mezcla apropiada y, el día 15, 50 unidades de Mutagrip solo.

<sup>+</sup>

Emulsión realizada con 1 volumen de soluto fisiológico y 1 volumen de coadyuvante incompleto de Freund.

$\Delta$

Emulsión realizada con 1 volumen de soluto fisiológico (que contiene 60 mg/ml de proteínas séricas de ratón) y 3 volúmenes de aceite de cacahuete.

Tabla 5

Producción de la poliartritis coadyuvante en el caso de la rata Lewis después de inyección de diferentes preparaciones micobacterianas dispuestas en suspensión en el coadyuvante incompleto de Freund o el aceite de cacahuete.

Vehículo	Coadyuvante Cada preparación a la dosis de 500 µg	Severidad de la artritis				Peso de las patas (día 21)	
		Día 14		Día 21		inyectada	no inyectada
		Art. +	PAA <sup>o</sup>	Art.	PAA		
Coadyuvante incompleto	-	±	-	0	-	2,68	0,58
	M.smeg. cel. enteras	++++	++	++++	++++	3,67	1,06
Aceite de ca cahuete.	M.tub. S.Peuroids fracción Liposoluble	++	-	++	-	3,18	1,17
	M.smeg. cel. enteras	±	-	±	-	2,41	0,34
	M.tub. S.Peuroids liposolu ble	+	-	±	-	2,5	0,53

7 ratas por lote reciben 0,1 ml de suspensión aceitosa en el cojín posterior derecho.

<sup>+</sup> Estimación del grado de inflamación de la pata inyectada.

<sup>o</sup> Estimación del grado de generalización en las 4 patas y la cola.

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - -

R E I V I N D I C A C I O N E S

5. 1.- Procedimiento de preparación de emulsiones estables de agua en aceite, en las cuales el aceite está constituido por un aceite vegetal metabolizable, caracterizado porque una fase acuosa, en particular agua o una disolución acuosa, se mezcla bajo agitación con un aceite vegetal metabolizable, haciéndose intervenir la fase acuosa y el aceite metabolizable en proporciones de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 volúmenes de fase acuosa por 10 volúmenes de dicho aceite vegetal, en presencia de proteínas en estado disuelto en la fase acuosa y que se hacen intervenir en una cantidad capaz de asegurar la estabilidad de la emulsión finalmente obtenida. - - - - -
- 10.
- 15.
20. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se actúa de forma que la emulsión contenga entre aproximadamente 2,5 y 5 volúmenes de agua, en particular del orden de 3 volúmenes, por 10 volúmenes de dicho aceite vegetal. - - - - -
- 3.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque se actúa de forma que la

emulsión contenga entre aproximadamente 30 y aproximadamente 150 mg, preferentemente entre aproximadamente 40 y aproximadamente 120 mg, en particular del orden de 60 mg de proteínas por mililitro de fase acuosa. - - - - -

5. 4.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el aceite vegetal está constituido por aceite de cacahuete, aceite de oliva o aceite de sésamo. - - - - -

10. 5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque las proteínas son de origen humano o animal y no son inmunógenas para la especie a la que son inyectadas. - - - - -

15. 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque las proteínas son del tipo seroalbúminas o globulinas. - - - - -

20. 7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, caracterizado porque se actúa de forma que el contenido en proteínas de la emulsión sea suficiente para conferirle un carácter isotónico o se provee otro agente en solución en la fase acuosa, tal como cloruro sódico, en una cantidad ajustada de forma que la emulsión resulte isotónica. - - - - -

8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por la incorporación de

un agente inmunógeno o antígeno vacunante. - - - - -

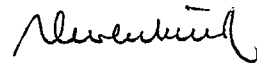
9.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 8, caracterizado por la incorporación de un agente coadyuvante de la inmunidad. - - - - -

5. 10.- "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE EMULSIONES ESTABLES DE AGUA EN ACEITE". - - - - -

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de treinta y dos hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

MADRID, 7 FEB. 1976

P.A. M. CURELL SUÑOL



maf.