



ESPAÑA

19	ES	11	NUMERO	446637	10	A1
		21				
		22	FECHA DE PRESENTACION	24.4.75		

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
	31	NUMERO			
		75 10252	2 abril 1975		Francia

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C12K; A61K		- - -

54	TITULO DE LA INVENCION
	"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE VACUNAS ACELULARES"

71	SOLICITANTE (S)
	PIERRE FABRE S.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
125, rue de la Faisanderie, 75016 Paris, Francia

72	INVENTOR (ES)
	Lucien Dussourd d'Hinterland, Gérard Normier, Anne Marie Pinel y Hubert Serre

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	M. Curell Sufiol

328-961  
EX-FR

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 PIERRE FABRE S.A., de nacionalidad francesa, domiciliada en 125, rue de la Faisanderie, 75016 Paris, Francia, por "Procedimiento para la preparación de vacunas acelulares", con prioridad de la solicitud francesa 75 10252 de fecha 2 abril 1975. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención, realizada en el Centro de Investigaciones Pierre Fabre, se refiere a un procedimiento para la preparación de vacunas. - - - - -

5.            Más particularmente, la presente invención se refiere a las nuevas vacunas acelulares, a base de ácido ribonucleico (ARN), asociadas a unos lipopolisacáridos y a unos polisacáridos membranares extraídos de bacterias. - - - - -

10.           Las vacunas de la técnica anterior, aunque eficaces, tienen una actividad antigénica que varía según los gérmenes y el tipo de preparación utilizados: cuerpos microbianos muertos, atenuados o lisados. En todos los casos, la actividad antigénica de estas vacunas es netamente inferior a la de los

gérmenes vivos. - - - - -

Para evitar este inconveniente, ha sido pues interesante poner a punto unas nuevas vacunas que no sufran ninguna pérdida de actividad antigénica en el curso de su preparación.

- 5. La presente invención descansa sobre la observación de que el poder antigénico de ciertos gérmenes se halla localizado a nivel del ARN y que es pues posible preparar unas vacunas acelulares a base de ARN (ver en particular *Infect. and Immunity*, 1, 574-82, 1970). Sin embargo, uno de los problemas mayores de este tipo de vacunas es el carácter relativamente lábil del ARN, era pues interesante poder asociar al ARN un adyuvante que asegure la estabilización del ARN para permitirle conservar una acción antigénica semejante a la de las células vivas. - - - - -
- 10.

- 15. Para ello, la presente invención propone una vacuna acelular que comprende los ácidos ribonucleicos de los gérmenes que corresponden a la vacuna en asociación con unos lipopolisacáridos y unos polisacáridos membranaarios extraídos de los mismos gérmenes o de otras bacterias, más particularmente de bacterias de los tipos *Klebsiella*, *Serratia* y *Corynebacterium*. - - - - -
- 20.

Entre las bacterias cuyos lipopolisacáridos y polisacáridos son más particularmente utilizables, es preciso citar, en primer lugar, las bacterias siguientes: - - - - -

Klebsiella

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella rhinoscleromatis

Serratia

5. Serratia corallina

Serratia indica

Serratia keilensis

Serratia kiliensis

Serratia marsecens

10. Serratia plymuthica

Corynebacterium

Corynebacterium avidum

Corynebacterium bovis

Corynebacterium enzymicum

15. Corynebacterium equi

Corynebacterium fascians

Corynebacterium flaccumfaciens

Corynebacterium flavidum

Corynebacterium fusiforme

20. Corynebacterium granulosum

Corynebacterium helvolum

Corynebacterium hypertrophicum

Corynebacterium insidiosum

Corynebacterium liquefaciens

25. Corynebacterium parvum

Corynebacterium parvum infectiosum

Corynebacterium paurometabolum

Corynebacterium pyogenes

*Corynebacterium tumescens*

*Corynebacterium xerosis*

Además, la presente invención se refiere más particularmente a una vacuna bronco ORL que contiene los constituyentes siguientes: - - - - -

5.

- ARN ribosomal de *Klebsiella Pneumoniae*
- ARN ribosomal de *Haemophilus Influenzae*
- ARN ribosomal de *Streptococcus A<sub>12</sub>*
- ARN ribosomal de *Pneumococoque tipo II*
- Lipopolisacáridos membranares de *Klebsiella*

10.

una vacuna antipiorreica que contiene los constituyentes siguientes: - - - - -

15.

- ARN ribosomal de *Rothia Dentocariosus*
- ARN ribosomal de *Streptococoque mutant Salivarius*
- ARN ribosomal de *Lactobacille Casei*
- Lipopolisacáridos membranares de *Serratia Marcescens*,

una vacuna intestinal que contiene los constituyentes siguientes: - - - - -

20.

- ARN ribosomal de *Bacterium coli*
- ARN ribosomal de *Salmonella Para Typhis A*
- ARN ribosomal de *Salmonella Para Typhis B*
- ARN ribosomal de *Shigella dysenteriae*
- ARN ribosomal de *Enterococcus*

25.

- Lipopolisacáridos membranares de *Serratia Marcescens*.

Estas vacunas comprenden, preferentemente, entre 100 y 200 partes en peso de lipopolisacáridos membrenarios por 100 partes en peso de ARN ribosomales en total. - - - -

5. Aunque en las vacunas precedentes los lipopolisacáridos membrenarios sean extraídos de un solo tipo de bacteria, es posible utilizar unos lipopolisacáridos membrenarios extraídos de varios tipos de bacterias. - - - - -

10. Por "gérmenes que corresponden a las vacunas", debe entenderse que se utilizan los mismos gérmenes que los utilizados en una vacuna con gérmenes microbianos muertos, atenuados o lisados de la técnica anterior. - - - - -

15. La presente invención se refiere también a un procedimiento para la preparación de vacunas acelulares a base de ARN, caracterizado porque se mezclan los ARN del o de los gérmenes que corresponden a las vacunas con los lipopolisacáridos y los polisacáridos extraídos de las membranas de los mismos gérmenes o de otras bacterias. - - - - -

20. Este procedimiento está particularmente destinado a la preparación de las vacunas acelulares citadas precedentemente y en particular de las vacunas bronco ORL, antipneumónica e intestinal mencionadas anteriormente. - - - - -

25. En un modo de utilización preferido del procedimiento según la presente invención, los lipopolisacáridos y los polisacáridos membrenarios se extraen de una suspensión acuosa que contiene las membranas por tratamiento con fenol de la

suspensión acuosa, pudiendo esta operación ser repetida varias veces antes de recuperar la solución acuosa así obtenida que contiene los lipopolisacáridos y los polisacáridos membranares. Las últimas trazas de fenol se eliminan de la fase acuosa preferentemente por diálisis de la solución acuosa contra agua corriente. La extracción es conducida preferentemente en caliente a una temperatura comprendida entre aproximadamente 40 y 80°C y de manera aún preferida a 65°C con una solución de fenol al 90%. - - - - -

5.

10.

La suspensión de membranas se obtiene preferentemente a partir de un molido homogéneo de gármes por una primera centrifugación bajo una aceleración tal que se sedimentan las células intactas y unos residuos celulares, después una segunda centrifugación bajo una aceleración que asegura la sedimentación de las membranas pero no de los ribosomas, más particularmente, la primera sedimentación se realiza bajo una aceleración del orden de 5.000 a 10.000 g y la segunda sedimentación bajo una aceleración de 30.000 a 50.000 g. - - - - -

15.

20.

El segundo residuo de centrifugación que contiene las membranas es entonces puesto en suspensión en un solvente acuoso, tal como agua destilada por ejemplo, para constituir la suspensión que será extraída con fenol. - - - - -

25.

Preferentemente, antes de la segunda centrifugación, la solución es tratada por desoxirribonucleasa por incubación a 15°C durante 30 minutos. - - - - -

En el modo de utilización preferido del procedimiento según la presente invención, el ARN se prepara a partir de un molido homogéneo acuoso de gérmenes, del cual se extraen por una o varias centrifugaciones las células intactas, los residuos celulares y las membranas, la solución obtenida, que contiene los ribosomas, es a continuación precipitada con polietilenglicol y el precipitado es a continuación puesto de nuevo en suspensión en solución acuosa, preferentemente en un tampón fosfato 0,01 M a pH 7,1 a 4°C, y después tratado una o varias veces con fenol extrayendo cada vez la fase acuosa y separando la fase orgánica, la fase acuosa contiene el ARN. En una variante, la fase orgánica de extracción contiene fenol, dodecilsulfato de sodio y EDTA bajo forma de sal disódica, preferentemente esta fase contiene fenol al 30% equilibrado en el mismo tampón fosfato que el de la suspensión, 0,5% de dodecilsulfato de sodio y 0,001 M de EDTA. - - - - -

La extracción se realiza preferentemente en caliente a una temperatura comprendida entre aproximadamente 40 y 70°C, preferentemente a los alrededores de 65°C, después se realiza la extracción de las fases preferentemente a 4°C. El fenol residual es eliminado de la fase acuosa por técnicas conocidas como la extracción con éter. Se recupera el ARN de la solución acuosa por precipitación, por ejemplo, con la ayuda de etanol, si es necesario el éter residual es eliminado previamente de la solución acuosa por ejemplo por un boteo de gas inerte tal como el nitrógeno. Queda entendido que el ARN puede ser extraído de los gérmenes por otro proce

dimiento, por ejemplo el descrito en Infect. and Immunity, 1, 574-82, 1970. Asociando el ARN ribosomal así obtenido a los lipopolisacáridos y polisacáridos membranaarios preparados anteriormente se obtiene una vacuna según la presente in vención. - - - - -

5.

Cuando los lipopolisacáridos y los polisacáridos membranaarios se extraen de los mismos gérmenes que los que han servido para la preparación del ARN, la extracción del ARN ribosomal a partir del molido se realiza en dos tiempos, una primera centrifugación que permite sedimentar las células intactas y los residuos celulares, y una segunda centrifugación que permite sedimentar las membranas dejando los ARN ribosomales en solución. Finalmente, cuando los gérmenes tra tados son de varios tipos, se les puede tratar o bien juntos, o bien separadamente. - - - - -

10.

15.

El molido homogéneo de gérmenes se prepara tanto por la extracción del ARN como de los lipopolisacáridos y de los polisacáridos, preferentemente a partir de un cultivo bacteriano lavado en un tampón fosfato 0,01 M a pH 7,1, después se toma de nuevo en el mismo tampón fosfato que contiene  $\text{HgCl}_2$   $10^2\%$  y  $3 \times 10^{-4}\%$  de sulfato de polivinilo para dis minuir la actividad de las ribonucleasas endógenas. - - - - -

20.

La suspensión bacteriana así obtenida es entonces molida con el Manton-Gaulin bajo una presión del orden de  $630 \text{ kg/cm}^2$  o bien por tratamiento con ultrasonidos. - - - - -

25.

Los ensayos siguientes han permitido poner en evi

dencia la actividad de las vacunas según la presente invención y particularmente de las vacunas siguientes: - - - - -

Vacuna broncho ORL

	- ARN ribosomal de Klebsiella Pneumoniae .....	35
5.	- ARN ribosomal de Hemophilus Influenzae .....	5
	- ARN ribosomal de Streptococcus A <sub>12</sub> .....	30
	- ARN ribosomal de Pneumococoque tipo II .....	30
	- Lipopolisacáridos membrenarios de Klebsiella .....	150

Vacuna antipiorrérica

10.	- ARN ribosomal de Rothia Dentocariosus .....	33
	- ARN ribosomal de Streptococoque Mutant Salivarius ...	33
	- ARN ribosomal de Lactobacille Casei .....	33
	- Lipopolisacáridos membrenarios de Serratia Marcescens	150

Vacuna intestinal

15.	- ARN ribosomal de Bacterium Coli .....	30
	- ARN ribosomal de Salmonella Para Typhie A .....	20
	- ARN ribosomal de Salmonella Para Typhie B .....	20
	- ARN ribosomal de Shigella dysenteriae .....	10
	- ARN ribosomal d'Enterococcus .....	20
20.	- Lipopolisacáridos membrenarios de Serratia Marcescens	150

El animal ensayado, rata o conejo, es inmunizado con la ayuda de una vacuna según la presente invención y descrita anteriormente. Para ello, en la rata se procede a una inyección cada dos días por vía subcutánea de 2, 12 y 24  $\gamma$  de vacuna. - - - - -

25.

Habiendo durado la inmunización 45 días, se paran las inyecciones durante 15 días y se procede a una nueva inyección 48 horas antes de la punción del animal por vía intracardíaca, la sangre se recoge y el suero es estudiado en Ouchterlony y en inmunoelectrodifusión contra el antígeno bacteriano total del cual se ha extraído el antígeno ribosomal. - - - - -

5.

Se utilizan 5 lotes de 10 ratas: - - - - -

- un lote testigo de animales no tratados, - - -

10.

- un lote de animales vacunados con el antígeno bacteriano total, - - - - -

- un lote de animales vacunados con la vacuna según la presente invención con 2  $\gamma$ , - - - - -

15.

- un lote de animales vacunados con la vacuna según la presente invención con 12  $\gamma$ , y - - - - -

- un lote de animales vacunados con la vacuna según la presente invención con 24  $\gamma$ . - - - - -

20.

En Ouchterlony, los sueros de los animales vacunados con la ayuda de la vacuna según la presente invención contienen todas las fracciones antigénicas de la bacteria, cualquiera que sea la dosis inyectada, como los animales que han recibido el antígeno total. - - - - -

En inmunoelectrodifusión, en las ratas vacunadas

con la ayuda de la vacuna según la presente invención, se ven aparecer los anticuerpos mucho más rápidamente y en concentraciones superiores. - - - - -

5. El poder vacunante de estas vacunas es por tanto superior al de las bacterias de las cuales se extraen y el plazo de aparición de los anticuerpos es más corto. - - - -

10. Estas vacunas son utilizables para el tratamiento de las mismas enfermedades infecciosas que las vacunas de otros tipos correspondientes y que están preparadas a partir de los mismos gérmenes muertos, atenuados o lisados. - - -

A fin de ilustrar la puesta en práctica del procedimiento según la presente invención, se describe a continuación el modo de puesta en práctica preferido del mismo. - -

#### Preparación del ARN ribosomal

15. Las cepas bacterianas utilizadas se aíslan a partir de extracciones patológicas. Estos gérmenes son reactivados por paso sobre unos animales de laboratorio, en el ejemplo unas ratas, y conservados en unos medios de cultivo apropiados. A partir de las cepas así obtenidas, se preparan  
20. los inoculados inseminando cada germen en un medio nutritivo líquido que se incuba 24 horas a 35°C. Este inoculum es utilizado para inseminar una batería de fermentador destinada a la preparación de las vacunas. Después de 24 horas de cultivo bajo agitación, las células bacterianas se recogen por  
25. paso del medio por un clarificador del tipo Sharpless. Dichas

células son a continuación lavadas con un tampón fosfato 0,01 M a pH 7,1, después tomadas de nuevo en un tampón fosfato 0,01 M con pH 7,1 que contiene  $\text{MgCl}_2 \cdot 10^{-2}$  y  $3 \times 10^{-4}\%$  de sulfato de polivinilo. La suspensión bacteriana es entonces molida por paso por el Manton-Gaulin a  $630 \text{ kg/cm}^2$  (3 pasos) y a  $4^\circ\text{C}$ . Este molido puede ser también realizado por tratamiento de la suspensión con ultrasonidos. - - - - -

5.

El molido celular así obtenido es centrifugado durante 15 minutos a 2500 vueltas por minuto a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante es adicionado con  $5 \mu\text{g/ml}$  de desoxirribonucleasa e incubado durante 30 minutos a  $15^\circ\text{C}$ . Las membranas son entonces sedimentadas por centrifugación 30 minutos bajo una aceleración del orden de 30 a  $40.000 \text{ g}$  y a  $4^\circ\text{C}$ . Se precipitan los ribosomas en el sobrenadante por adición de  $100 \text{ g/l}$  de polietilenglicol 4.000 a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Los ribosomas precipitados se recogen por centrifugación 10 minutos a  $10.000 \text{ g}$  y a  $4^\circ\text{C}$ . - - - - -

10.

15.

El residuo de centrifugación es puesto de nuevo en suspensión en un tampón fosfato 0,01 M, pH 7,1 a  $4^\circ\text{C}$ . Es a continuación adicionado con un mismo volumen de fenol al 80% previamente equilibrado en el mismo tampón, pero que contiene además 0,5% de dodecilsulfato de sodio y 0,001 M de ácido etilendiaminotetracético en forma de sal disódica. Esta mezcla es entonces llevada a  $65^\circ\text{C}$  durante 10 minutos bajo agitación vigorosa, después enfriada a  $4^\circ\text{C}$ . La fase acuosa es entonces extraída y reextraída en las mismas condiciones con fenol. Las dos nuevas fases obtenidas son separadas por cen-

20.

25.

trifugación bajo 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se extraen cuidadosamente los 4/5 de la fase acuosa que son a continuación extraídos tres veces con un volumen de éter durante 3 minutos a temperatura ambiente a fin de eliminar el fenol residual. - - - - -

5.

Se eliminan los residuos de éter por un barboteo de nitrógeno y se precipita el ARN por adición de 2 volúmenes de etanol al 95% a 20°C durante 4 horas, después de haber ajustado la fase acuosa a 0,1 M en NaCl. - - - - -

10.

La suspensión se centrifuga 10 minutos a 10.000 g y el residuo de ARN es disuelto en un tampón fosfato 0,01 M a pH 7,1 a 4°C. Se obtiene así el ARN ribosomal que podrá ser utilizado en las vacunas según la presente invención en asociación con los lipopolisacáridos y los polisacáridos membrana-  
rios. - - - - -

15.

Preparación de los lipopolisacáridos y de los polisacáridos membrana-  
rios

El molido homogéneo de las bacterias destinadas a proporcionar los lipopolisacáridos y los polisacáridos membrana-  
rios se prepara de la misma manera que la que se ha descrito para la preparación de los ARN ribosomales. Después este molido homogéneo es centrifugado como anteriormente durante 15 minutos a 2.500 vueltas por minuto a 4°C. El sobrenadante es adicionado con desoxirribonucleasa a 5 µg/ml e incubado 30 minutos a 15°C. Las membranas son entonces sedimenta-

20.

25.

das por centrifugación bajo una aceleración del orden de 30 a 40.000 g a 4°C. - - - - -

5. El residuo así obtenido es puesto de nuevo en suspensión en agua destilada a 65°C, después se adiciona a la misma temperatura un mismo volumen de una solución de fenol al 90%. - - - - -

Se agita vigorosamente durante 5 minutos, después se enfría bruscamente a 4°C. Las dos fases se separan por centrifugación a 3.000 vueltas por minuto durante 30 minutos. -

10. La fase acuosa es extraída cuidadosamente, después dializada contra agua corriente hasta eliminación del fenol. El dializado interno contiene los lipopolisacáridos y los polisacáridos membranares que, mezclados con los ARN ribosomales preparados precedentemente, constituirán la vacuna según la presente invención. - - - - -

20. Las vacunas según la presente invención son útiles tanto en medicina humana como en medicina veterinaria y pueden presentarse bajo cualquiera de las formas conocidas para el acondicionamiento de las vacunas, particularmente en forma de aerosoles secos, ampollas liofilizadas inyectables, supositorios, tabletas o cápsulas. - - - - -

N O T A

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

REIVINDICACIONES

5. 1.- Procedimiento para la preparación de vacunas acelulares, caracterizado porque se mezcla el ácido ribonucleico (ARN) del o de los gérmenes que corresponden a la vacuna y unos lipopolisacáridos y polisacáridos membranaarios extraídos de bacterias. - - - - -

10. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se mezclan entre 100 y 200 partes en peso de lipopolisacáridos y polisacáridos por 100 partes en peso de ácido ribonucleico. - - - - -

15. 3.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque los lipopolisacáridos y los polisacáridos utilizados se extraen de las membranas de bacterias elegidas entre por lo menos uno de los géneros siguientes: *Klebsiella*, *Serratia*, *Corynebacterium*. - - - - -

20. 4.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los lipopolisacáridos y/o los polisacáridos utilizados se extraen de las membranas de bacterias elegidas entre - - - - -

20. Klebsiella  
*Klebsiella pneumoniae*  
*Klebsiella rhinoscleromatis*  
Serratia  
*Serratia corallina*  
25. *Serratia indica*

- Serratia keilensis
  - Serratia kiliensis
  - Serratia marsecens
  - Serratia plymuthica
  - 5. Corynebacterium
    - Corynebacterium avidum
    - Corynebacterium bovis
    - Corynebacterium enzymicum
    - Corynebacterium equi
  - 10. Corynebacterium fascians
  - Corynebacterium flaccumfaciens
  - Corynebacterium flavidum
  - Corynebacterium fusiforme
  - Corynebacterium granulosum
  - 15. Corynebacterium helvolum
  - Corynebacterium hypertrophicum
  - Corynebacterium insidiosum
  - Corynebacterium liquefaciens
  - Corynebacterium parvum
  - 20. Corynebacterium parvum infectiosum
  - Corynebacterium paurometabolum
  - Corynebacterium pyogenes
  - Corynebacterium tumescens
  - Corynebacterium xerosis.
25. 5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque los lipopolisacáridos y/o los polisacáridos se extraen de las membranas de los gérmenes que corresponden a la vacuna. - - - - -

5. 6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque los lipopolisacáridos y/o los polisacáridos se extraen a partir de una suspensión acuosa de membranas por tratamiento de esta suspensión con fenol y extracción de la fase acuosa que contiene los lipopolisacáridos y/o los polisacáridos. - - - - -

7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la suspensión acuosa y el fenol se ponen en presencia a una temperatura comprendida entre 40 y 80°C. - -

10. 8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, caracterizado porque la fase acuosa que contiene los lipopolisacáridos y/o los polisacáridos es purificada por diálisis. - - - - -

15. 9.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado porque la suspensión acuosa de membranas se obtiene por centrifugación de un molido homogéneo de gérmenes bajo una aceleración que sedimenta las células intactas y los residuos celulares, eliminación del residuo de esta centrifugación, y después centrifugación de la fase sobrenadante bajo una aceleración que sedimenta las membranas pero no los ribosomas y nueva toma del residuo de centrifugación que contiene las membranas por una solución acuosa. - - - - -

20.

25. 10.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el ARN de los gérmenes se obtiene por extracción de una solución acuosa de ri-

bosomas con la ayuda de una fase fenólica y extracción de la fase acuosa que contiene el ARN después de extracción. - - -

5. 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque la fase fenólica contiene dodecilsulfato de sodio y una sal disódica del ácido etilendiaminotetracético. - - - - -

10. 12.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, caracterizado porque la fase acuosa que contiene el ARN es precipitada con etanol a fin de recuperar el precipitado de ARN. - - - - -

15. 13.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado porque la solución acuosa de ribosoma se obtiene a partir de un molido homogéneo de gérmenes por centrifugación del molido bajo una aceleración comprendida entre 20.000 y 40.000 g, eliminación del residuo de centrifugación, precipitación del sobrenadante con polietilenglicol, recuperación del precipitado y puesta en solución de este precipitado en una solución acuosa. - - - - -

20. 14.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque el o los molidos homogéneos de gérmenes es o son obtenidos a partir de un cultivo o de gérmenes sometido a la acción de un tampón fosfato que contiene cloruro de magnesio, sulfato de polivinilo, que es molido por paso por el manton-gaulin o tratamiento por ultrasonidos. - - - - -

25.

5. 15.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque los ARN se extraen de Klebsiella Pneumoniae, Hemophilus Influenzae, Streptococcus A<sub>12</sub>, Pneumococoque tipo II y los lipopolisacáridos y los polisacáridos de Klebsiella. - - - - -

10. 16.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque los ARN se extraen de Rothia Dentocariosus, Streptococoque Mutant Salivarius, Lactobacille Casei, y los lipopolisacáridos y los polisacáridos de Serratia Marcescens. - - - - -

15. 17.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque los ARN se extraen de Bacterium Coli, Salmonella Para Typhis A y B, Shigella Dysenteriae, Enterococcus y los lipopolisacáridos y los polisacáridos de Serratia Marcescens. - - - - -

18.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE VACUNAS ACELULARES". - - - - -

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

MADRID - 2 ABR. 1976

P.A. M. CURELL SUÑOL

