



ESPAÑA

ES	11	NUMERO	A1
	21	451.923	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		28-9-1976	

PATENTE DE INVENCION

P.- 64.045  
Case A 470

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
39857/75	29-9-75	Gran Bretaña
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A61K	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA PREPARACION ANTIGENA"		
71 SOLICITANTE (S)		
THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
183-193 Euston Road, Londres N.W.1, Inglaterra		
72 INVENTOR (ES)		
June Dalziel Almeida y David Caird Edwards		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		

1 Este invento se refiere a preparaciones antigénicas.  
Se sabe que mientras una variedad de virus inacti-  
vados, por ejemplo el virus de la gripe, son buenos inmunó-  
genos, también son pirógenos. Los intentos para eliminar la  
5 pirogenicidad purificando el resto inmunógeno del virus han  
tenido éxito pero las sub-unidades virales resultantes no  
proporcionan un inmunógeno muy activo.

Por lo tanto se necesita un coadyuvante adecuado  
para dichas sub-unidades y otras proteínas antigénicas que po-  
10 drían provocar la respuesta inmune en el receptor vacunado.

Existe un interés creciente en el empleo de liposo-  
mas como vehículos de medicamentos y enzimas y en su poten-  
cial como coadyuvantes inmunológicos. Los liposomas consis-  
ten en dispersiones acuosas de esferas concéntricas que con-  
15 sisten en bicapas fosfolípidas separadas por compartimientos  
acuosos. Tienen esencialmente estructuras similares a la ce-  
bolla, las cuales han sido descritas completamente en la bi-  
bliografía. Pueden producirse cuando una película seca de  
un fosfolípido tal como lecitina se agita en presencia de  
20 un tampón.

En las publicaciones previas sobre el empleo de  
liposomas, los medicamentos, enzimas o antígenos están des-  
critos como atrapados o encerrados dentro de los comparti-  
mientos acuosos internos del cuerpo lípido multilaminar.

25 Actualmente se ha encontrado que las proteínas an-  
tígenas pueden estar unidas a la superficie exterior de la  
capa lípida exterior de los liposomas y a la superficie exte-  
rior de la única bicapa lípida de cuerpos unilaminares simi-  
lares, y que dichas preparaciones tienen excelentes propie-  
dades antigénicas comparadas con las proteínas no unidas. Cuando  
30

1 la proteína antigéna es una sub-unidad viral, la orientación de las sub-unidades vista en el microscopio electrónico sugiere que están dispuestas de la misma forma que sobre las partículas de virus.

5 Por consiguiente, este invento proporciona una preparación antigéna que contiene una pluralidad de microvesículas, comprendiendo cada microvesícula al menos una bicapa lípida en la superficie exterior de la cual está unida una proteína antigéna derivada de un organismo patógeno.

10 Las microvesículas pueden ser ellas mismas liposomas o pueden ser cuerpos unilaminares que comprenden una única bicapa lípida que encierra un compartimiento acuoso. La proteína antigéna derivada de un único tipo de especie, tipos diferentes de la misma especie, o especies diferentes  
15 puede estar unida al mismo cuerpo; o una preparación puede incluir mezclas de éstos. Cada microvesícula está preferiblemente comprendida en el intervalo de tamaño de 40 a 100 nm; aunque también entran dentro del alcance del invento cuerpos mayores y más pequeños, por ejemplo cuerpos de 20 a  
20 200 nm.

La proteína antigéna puede derivarse de cualquier patógeno, que incluye protozoos, metazoos y bacterias, pero especialmente de virus. Son especialmente adecuados los antígenos de superficie protectora derivados de mixovirus, tales como el virus de la gripe A, B y C, el virus de la enfermedad de Newcastle y los tipos de parainfluenza 1, 2, 3 y 4, también otros virus tales como el virus del sarampión, el virus de las paperas, citomegalovirus y otros virus de herpes, el virus corona y capsómeros derivados de picornavirus tal como virus de la glosopeda, el virus de la poliome-  
25  
30

1 litis, rinovirus, los virus de wart y los enterovirus.

Se cree que los antígenos proteínicos están unidos a las microvesículas por unión hidrófoba, y cuando la proteína antigéna no posee por si misma una región hidrófoba expuesta o susceptible de estar expuesta, puede proporcionarse entonces un grupo hidrófobo, por ejemplo a los capsómeros de picornavirus, por reacción con un reactivo que proporcione dicho grupo, por ejemplo un grupo palmitilo, estearilo, laurilo, polialanilo u otra cadena alifática larga.

10 Las microvesículas pueden estar hechas de cualquier material lípido adecuado, convenientemente uno que sea biodegradable por si mismo y no antigéno. Los materiales convencionales tales como las lecitinas naturales o sintéticas u otros fosfolípidos son especialmente útiles. Pueden también incluirse otros lípidos tales como colesterol como reforzador, preferiblemente en una cantidad menor de 30% en moles p/p de la composición lípida total. Puede también incluirse un tercer material opcional para proporcionar una carga positiva o negativa. Los materiales que proporcionan una carga negativa incluyen el ácido fosfatídico, gangliosido de seso de vaca, fosfato de dicetilo, fosfatidil-serina, y fosfatidil-inositol; los materiales que proporcionan una carga positiva son estearilamina y otras aminas primarias.

25 Las microvesículas pueden encapsular opcionalmente un segundo coadyuvante tal como los coadyuvantes usuales conocidos en la técnica.

La proteína antigéna puede añadirse a los materiales lípidos antes o después de la formación de las microvesículas, pero preferiblemente después de eliminar la posibilidad de que la proteína sea encerrada dentro de los cuer-

1 pos en lugar de estar unida a las superficies exteriores.

Las microvesículas multilaminares (liposomas) pueden obtenerse por cualquier método conocido, y convenientemente disolviendo el(los) material(es) de partida lípido(s) en un disolvente y evaporando el disolvente. La capa lípida se dispersa luego con una solución salina acuosa o un tampón (si se pretende incorporar la proteína después de la formación de la microvesícula) o con una suspensión acuosa de la proteína (si se pretende incorporar la proteína antes de la formación de la microvesícula), y luego se agita la mezcla. La proteína puede añadirse a continuación cuando no está ya incorporada, y las microvesículas se agitan de nuevo.

Si se requieren microvesículas unilaminares, debe prolongarse a continuación la agitación inicial para disminuir el número de liposomas presente.

Un método alternativo es añadir el(los) material(es) de partida lípido(s) a una fase acuosa, y calentar lentamente la mezcla. A continuación se agita para formar los liposomas. La fase acuosa puede contener la proteína antigénica o puede añadirse subsiguientemente.

Otro método de preparar microvesículas (liposomas) comprende la inyección rápida de una solución etanólica de fosfolípido en solución salina acuosa o en un tampón que haya sido purgado previamente con nitrógeno. La preparación de liposoma resultante se concentra luego por ultrafiltración con agitación rápida bajo nitrógeno a baja presión para evitar la formación de liposomas no heterogéneos grandes. El etanol puede eliminarse de la fracción de liposoma por diálisis o lavando en un ultrafiltro. La proteína antigénica que se pretende unir al liposoma puede estar presente en la

1 solución acuosa, o alternativamente la fracción de liposoma  
obtenida después de la ultrafiltración puede someterse lige-  
ramente a ultrasonidos con la proteína antigéna.

5 Las preparaciones antigénas obtenidas de la forma  
descrita antes comprenden dispersiones acuosas de las micro-  
vesículas, y éstas pueden formularse en vacunas incorporán-  
dolas en una forma esterilizada en recipientes de una sola  
dosis o de varias dosis cerrados herméticamente. Pueden in-  
cluirse si se desean conservadores, estabilizadores y otros  
10 excipientes de vacuna convencionales.

Las vacunas así producidas pueden administrarse  
por los métodos usualmente empleados para la administración  
de la proteína o proteínas antigénas particulares en la va-  
cuna. Estas toman generalmente la forma de aplicación nasal,  
15 inyección intramuscular o subcutánea en los animales (inclu-  
yendo el hombre). La dosis depende naturalmente de la natu-  
raleza del antígeno, el animal receptor, el programa de va-  
cunación y el grado coadyuvancia conferido por la preparación,  
y naturalmente de la discreción del médico de cabecera o ci-  
20 rujano veterinario, según sea necesario.

En general puede administrarse una dosis de la va-  
cuna, en forma de una única unidad o como una multiplicidad  
de subdosis durante un período de tiempo.

Por consiguiente el invento proporciona lo siguien-  
te:

- 25 (a) Una preparación antigéna que comprende una pluralidad  
de microvesículas sobre la superficie exterior de las  
cuales está unida una proteína antigéna;
- (b) un procedimiento para obtener la preparación antigéna;
- 30 (c) formulaciones farmacéuticas que contienen la prepara-

1 ción antigéna;

(d) método de formar tales formulaciones farmacéuticas; y

5 (e) un método para la profilaxis de una infección en un mamífero, incluyendo el hombre, que comprende la administración de una cantidad no tóxica y profiláctica de la preparación antigéna.

Los Ejemplos siguientes se proporcionan como modo de ilustración del presente invento y no deben interpretarse como una limitación.

10 Ejemplo 1

A. Preparación de sub-unidades del virus de la gripe

Virus de la gripe PR8 muy purificados (de acuerdo con el método de J.J. Skehcle y G.C. Schield, Virology, 1971, 15 44, 396-408) con 12 mg de proteína de virus por ml se mezcló con detergente no iónico (Nonidet NP40) a una concentración de detergente final del 5% v/v y se extendió en capas sobre gradientes de 11 ml de cloruro de cesio de 24-45% p/v de cloruro de cesio (en tampón de fosfato de sodio 0,05M de pH 20 7,0) con capas de sacarosa de 0,3 ml. Los gradientes se centrifugaron a 100.000 g durante 3 horas o más, se fraccionaron y las fracciones se analizaron en cuanto a su actividad hemaglutinante. Se reunieron las fracciones de elevada actividad, se dializaron a vacío frente a una solución salina 25 tamponada con fosfato (PBS) y se extendieron en capas sobre un segundo gradiente de 20-60% p/v de sacarosa en PBS y se centrifugó a 100.000 g durante 16 horas. Las fracciones se analizaron de nuevo en cuanto a la actividad hemaglutinante, se reunieron las de valores altos y se dializó a vacío frente a PBS. La solución final tenía una concentración de pro-

30

1 teína de 1,76 mg/ml y una actividad hemaglutinante de aproximadamente  $10^6$  HAU/ml. Para la producción de liposomas la mezcla de sub-unidades se ajustó a una concentración de proteína final de 200  $\mu$ g/ml.

5 La solución salina tamponada con fosfato (PBS) tenía una composición de: cloruro de sodio 10 g/l; Cloruro de potasio 0,25 g/l; dihidrógeno-fosfato de potasio 0,25 g/l; e hidrógeno-fosfato de disodio 1,4375 g/l.

#### B. Preparación de liposomas

10 Se disolvieron fosfato de dicetilo (2,5 mg) y lecitina (22,5 mg) en cloroformo (aproximadamente 50 ml). La solución se evaporó hasta sequedad en un evaporador Buchi a un ligero vacío. La preparación antigénica viral (5 ml) en PBS se añadió a los contenidos del matraz y el matraz se  
15 agitó manual y mecánicamente hasta que el lípido se puso en suspensión en el fluido. La mezcla se transfirió a un vial y se sometió a ultrasonido durante 1,5 minutos empleando una sonda de 1 cm y una amplitud de 8  $\mu$ .

#### C. Ensayo de protección de ratones

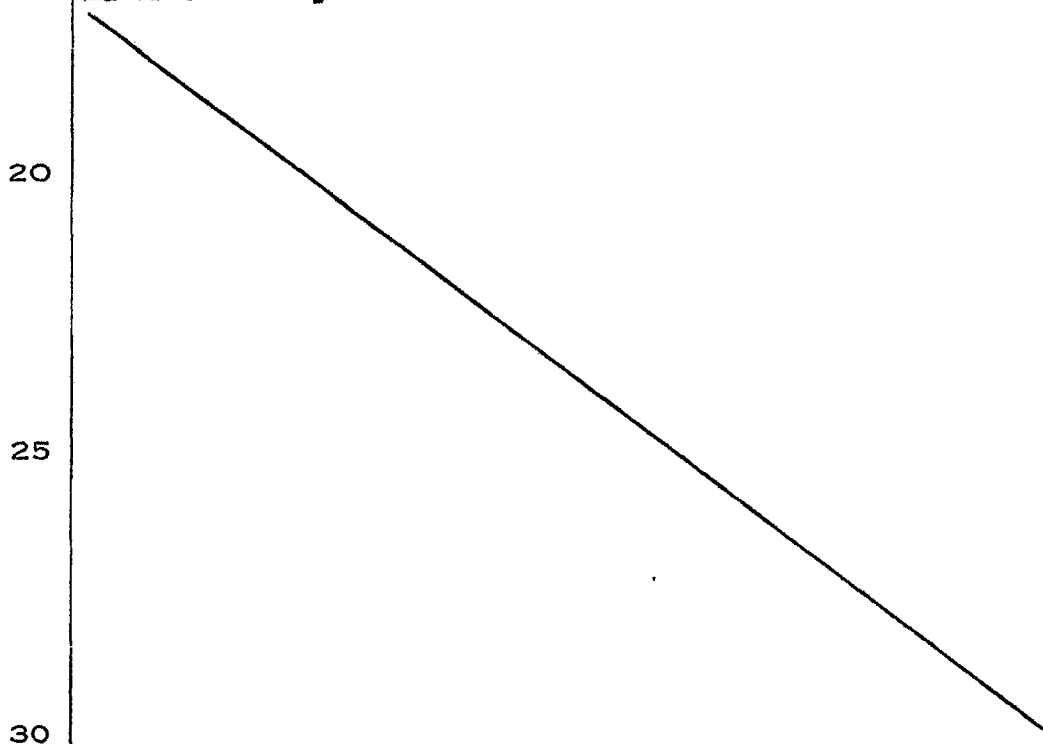
20 Las preparaciones de liposomas se ensayaron para la protección.

20 ratones se dividieron en cuatro grupos de cinco, y dos grupos fueron inyectados intraperitonealmente con las sub-unidades virales producidas como se ha descrito en el Ejemplo 1A anterior, dosificándose un grupo con 50  $\mu$ g/  
25 0,25 ml y el otro con 5  $\mu$ g/0,25 ml. El segundo y tercer grupos se dosificaron similarmente con los liposomas producidos como se ha descrito en el Ejemplo 1B anterior, recibiendo un grupo 5  $\mu$ g y el otro 50  $\mu$ g por 0,25 ml.

30 Diez días más tarde los ratones se enfrentaron

1 con virus vivos de la misma cepa y se extrajeron los pulmo-  
nes dos días más tarde. Los pulmones se homogeneizaron y so-  
metieron a ultrasonido para liberar cualquier virus que es-  
tuviera presente y las suspensiones se ensayaron por culti-  
5 vos de alantoides en conchas, como se ha descrito por Faze-  
kas de St. Groth y White (1958) Journal of Hygeine 56 151,  
(1958).

Los resultados se muestran en la Tabla. La dosis  
de 50  $\mu$ g de sub-unidades unidas al liposoma produjeron una  
10 protección sólida frente a los virus homólogos enfrentados  
diez días después de la inmunización. Solamente se detectó  
una traza de crecimiento de virus en los pulmones de uno de  
los cinco ratones de este grupo. La dosis de 5  $\mu$ g de los li-  
posomas produjo un nivel de protección similar al enfrentar  
15 que el que hizo la dosis de 50  $\mu$ g de sub-unidades sola, indi-  
cando un aumento 10 veces en el efecto protector debido al  
material de liposoma.



Tabla

ANTIGENO	DOSIS	RATON Nº	Valoración del virus en los pulmones (Log <sub>10</sub> )
Sub-unidades de PR8	5 µg i.p.	1	- 4,21
		2	
		3	
		4	
		5	
Sub-unidades de PR8	50 µg i.p.	6	- 3,39
		7	
		8	
		9	
		10	
Liposomas (Suspensión de sub-unidades de PR8 hecha por dilución 1/10 de la siguiente)	5 µg i.p.	11	- 3,4
		12	
		13	
		14	
		15	
Liposomas (PR8 Sub-unidades) 0,5% de lípido	50 µg i.p.	16	- 1,76 (sin desarrollo detectable de virus excepto 1/8 en uno de los pulmones de un ratón)
		17	
		18	
		19	
		20	

Ejemplo 2

A. Se disolvieron fosfato de dicetilo (2,5 mg) y lecitina (22,5 mg) en cloroformo (aproximadamente 50 ml). La solución se evaporó hasta sequedad como en el Ejemplo 1 y se añadió solución salina tamponada con fosfato (como se ha descrito antes) para proporcionar una concentración de lípidos de 16,6 µM/ml.

Esta mezcla se sometió a ultrasonidos durante 1,5

1 horas en un baño ultrasónico a una frecuencia de 50 KHz.

B. A la preparación resultante se añadió sub-unidades de virus de la gripe, preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 1A, a una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$ . Esta mezcla se sometió a ultrasonidos durante 15 minutos más en un baño ultrasónico a una frecuencia de 50 KHz.

C. El examen en el microscopio electrónico por la técnica de coloración negativa de los cuerpos microscópicos producidos de acuerdo con la sección A anterior, mostró que la mayor parte eran de estructura unilaminares pequeñas ligeramente contaminadas por estructuras multilaminares mayores (es decir liposomas). La mayoría de los discos de lípidos estaban en el intervalo de tamaño de 50 a 100 nm.

D. El examen en la misma forma de la preparación de la sub-unidad de la gripe empleada en el Ejemplo 2B reveló solamente las formas de estrella y rueda típicas asociadas con sub-unidades de hemaglutinina y neuraminidasa. No pudo encontrarse trazas de membranas virales.

E. El examen en la misma forma de la preparación resultante del procedimiento descrito en la sección B anterior, mostró que la mayoría de las sub-unidades estaban dispuestas ahora sobre la superficie de los cuerpos unilaminares, dando una apariencia muy similar a la del virus de la gripe. En la mayoría de los cuerpos microscópicos, los hechos sobresalientes fueron las sub-unidades de hemaglutinina, pero en algunas zonas podía verse la unión de las sub-unidades de neuraminidasa. En exámenes adicionales de estos cuerpos microscópicos por microscopio electrónico inmune, la adición del antisuero A de la gripe hiperinmune aglomeró a los cuerpos en grandes complejos.

1 Ejemplo 3

Preparación de liposomas de etanol

Lecitina de huevo (30 mg) en cloroformo se secó en un evaporador giratorio durante hora y media a vacío parcial.

5 Se añadió etanol (2 ml) para disolver el lípido seco y la solución resultante se recogió con una jeringa de 2 ml provista de una aguja hipodérmica de calibre 27.

Una solución de cloruro de potasio (30 ml, 0,16 M) se saturó de gas con nitrógeno durante una hora y la solución etanólica de lecitina se introdujo rápidamente con una jeringa por medio de una aguja de calibre 27 en la solución de cloruro de potasio.

10 La preparación de liposoma resultante se concentró por ultrafiltración hasta aproximadamente 3 ml empleando una célula de ultrafiltración Amicon modelo 52 provista de una membrana PM 30. [Lit.ref. B.B. Acta, 298 (1973) 1015-1019].

15 Ejemplo 4

Liposomas de etanol preparados por el método descrito en el Ejemplo 3, se mezclaron con un volumen igual de sub-unidades de virus de la gripe X 31 (250 µg/ml), y se sometieron ligeramente a ultrasonidos.

20 La preparación antigénica resultante se ensayó para protección, en el ensayo de protección de ratones, descrito en el Ejemplo 1(C).

25 Los resultados se muestran en la Tabla siguiente:

30

	ANTIGENO	DOSIS	RATON Nº	Valoración del virus en los pulmones (Log <sub>10</sub> )	
				Media	Error
1					
5	42µg sub-unidades en alcohol de liposomas X31	42 µg en 0,25ml	1	- 1,75	
			2	- 1,75	- 1,85
			3	- 1,75	± 0,22
			4	- 1,75	
			5	- 2,25	
10	42 µg X31 sub-unidades en PBS	42 µg en 0,25ml	16	- 3,31	
			17	- 2,63	- 2,95
			18	- 3,88	± 0,78
			19	- 3,13	
			20	- 1,81	
15	no inmunizado	-	21	- 4,06	
			22	- 4,50	- 4,42
			23	- 4,50	± 0,21
			24	- 4,56	
20			25	- 4,50	

Ejemplo 5Solución parenteral

	Lecitina/fosfato de dicetilo (9:1, p/p)	1 mg
25	Sub-unidades de proteínas del virus de la gripe X 31	50 µg
	Mertiolato de sodio	40 µg
	Solución salina tamponada con fosfato (pH 7,2)	0,2 ml

La solución salina tamponada con fosfato contiene:

30	Cloruro de sodio	10 g/litro
----	------------------	------------

1	Cloruro de potasio	0,25 g/litro
	Dihidrógeno-fosfato de potasio	0,25 g/litro
	Hidrógeno-fosfato disódico	1,4375 g/litro

Ejemplo 65 Liposomas con toxoide de la difteria incorporadoA. Preparación de liposomas

Se disolvieron fosfato de dicetilo (3 mg) y lecitina (27 mg) en cloroformo (4 ml) y se agitaron. Se añadió solución salina tamponada con fosfato (3 ml) y el matraz se unió a un evaporador giratorio Buchi. Las fases acuosa y no acuosa se mezclaron con agitación magnética y movimiento giratorio durante 1 hora bajo vacío (100 mm/Hg) a 20°C. El cloroformo se separó luego aumentando el vacío. La preparación de liposoma resultante se dejó luego en equilibrio durante 3 horas. Se añadió el toxoide de la difteria (0,3 ml) (9 mg/ml) (Wellcome Laboratories), y la mezcla se agitó de nuevo durante media hora para incorporar el toxoide de la difteria en la superficie de los liposomas. El toxoide en exceso se separó por centrifugación a 40.000 g durante 2 horas a 5°C y los liposomas se volvieron a poner en suspensión en solución salina tamponada con fosfato (3 ml) (Biochim. Biophys. Acta., 1972, 266, 320).

20 B. Efecto de los liposomas con toxoide de difteria incorporado en la respuesta inmune de los ratones.

25 Grupos de ratones machos 5-12 CBA y Porton Albino se inyectaron subcutáneamente en la espalda con dosis variables de toxoide de difteria o con dosis similares de liposomas con toxoide de difteria incorporado, a una concentración de lípidos de 1% (p/v). En cada ensayo, se incluyó un grupo de ratones no inyectados como testigo negativo. A los anima

30

1 les se les sacó sangre 21 días después y los sueros se ab-  
sorbieron para eliminar anticuerpos en glóbulos rojos de ove  
jas y macroglobulina  $\alpha_2$ . Los sueros se analizaron luego,  
por ensayos de hemaglutinación empleando glóbulos rojos de  
5 oveja sensibilizados con toxoide de la difteria. (J. Inmunol.  
1968, 100, nº 2, 274). El valor de la hemaglutinación se to  
mó como la dilución del suero para mostrar aglutinación dis  
tinta. Todos los ensayos se realizaron contra diluciones de  
un suero antidifteria patrón, de caballo como testigo posi-  
10 tivo y glóbulos sensibilizados sin suero como testigo nega  
tivo. Los grupos testigo sin inyectar dieron siempre una res  
puesta negativa. Los resultados se expresan como medias de  
los inversos de los valores de hemaglutinación de todos los  
animales en cada grupo y se muestran en las Tablas 1 y 2.

15 C. Efecto de los liposomas con toxoide de difteria  
incorporado, en la respuesta inmune de los cobayas.

Grupos de 5 cobayas machos Porcellus se inyecta-  
ron subcutáneamente el día 0 con toxoide de difteria (0,4  
 $\mu\text{g}$ ) o con liposomas con toxoide de difteria incorporado, a  
20 una concentración de lípidos de 1% (p/v). A los animales se  
les sacó sangre 21 días después. Ambos grupos se inyectaron  
en día 28 con toxoide de difteria (0,4  $\mu\text{g}$ ) solamente y se  
les sacó sangre 7 días más tarde. Se analizaron los sueros  
en ensayos de hemaglutinación como en la sección B y los re  
25 sultados se expresan como media del inverso de los valores  
de hemaglutinación de todos los animales en cada grupo. Los  
sueros tomados de los cobayas antes de la primera inyección  
sirven como testigos negativos y no muestran respuesta al  
toxoide de difteria. Los resultados se muestran en la Tabla  
30 3.

TABLA 1

Ensayo de hemaglutinación de los sueros de grupos de 5 ratones machos CBA 21 días después de la inyección subcutánea de toxoide de difteria o de liposomas con toxoide de difteria incorporado

Concentración de toxoide de difteria en $\mu\text{g}$	Valor de hemaglutinación: inverso		
	Testigo negativo	Toxoide de difteria solamente	Liposomas con toxoide de difteria incorporado
0	< 2	-	-
2,5	-	< 2	12,8
5,0	-	8,0	32
10,0	-	20,8	64

TABLA 2

Ensayo de hemaglutinación de sueros de grupos de 12 ratones machos Porton Albino a los que se sacó sangre 21 días después de inyección subcutánea de toxoide de difteria o de liposomas con toxoide de difteria incorporado

Concentración de toxoide de difteria en $\mu\text{g}$	Valor de hemaglutinación: inverso		
	Testigo negativo	Toxoide de difteria solamente	Liposomas con toxoide de difteria incorporado
0	< 2	-	-
8	-	< 2	11,3

TABLA 3

Ensayo de hemaglutinación de sueros de grupos de 5 cobayas

- i) 21 días después de la primera inyección de toxoide de dif-  
teria o de liposomas con toxoide de difteria incorporado.  
 ii) 7 días después de la inyección impulsadora de toxoide de  
difteria solamente

	Concentración de toxoide de difteria en $\mu\text{g}$	Valor de hemaglutinación: inverso	
		Toxoide de difteria	Liposomas con toxoides de dif- teria incorpo- rado
i) Respuesta primera	0,4	< 2	< 2
ii) Respuesta segunda	0,4	16	150

- REIVINDICACIONES -

Los puntos de invención propia y nueva que se pre-  
 sentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de  
 Invención en España, por VEINTE años, son los que se reco-  
 gen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Un procedimiento para la obtención de una  
 preparación antigénica, que contiene una pluralidad de micro-  
 vesículas, comprendiendo cada microvesícula al menos una bi-  
 capa lipídica en la superficie exterior de la cual está unida  
 una proteína antigénica derivada de un organismo patógeno, ca-  
 racterizado porque: (a) se agita un lípido en un medio acuoso

1 so para formar microvesículas, seguido por agitación de las  
microvesículas en presencia de la proteína antígena con lo  
que la proteína antígena se une a la superficie exterior de  
la bicapa lipídica de las microvesículas; o (b) se agita una  
5 mezcla de lípido, un medio acuoso y la proteína antígena  
con lo que la proteína antígena se une a la superficie exte  
rior de la bicapa lipídica de las microvesículas.

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-  
cación 1ª, caracterizado porque el material de partida lípi  
10 do se disuelve en un disolvente que se separa por evapora-  
ción subsiguientemente, y luego se dispersa la capa lipídica  
resultante en una solución acuosa y se agita seguido por  
adición de una proteína antígena a la solución que se agi-  
ta de nuevo.

15 3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-  
cación 1ª, caracterizado porque el material de partida lípi-  
do se añade a una solución acuosa calentada luego lentamen-  
te seguido por agitación, luego se añade la proteína antígena  
y se agita de nuevo la mezcla resultante.

20 4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-  
cación 1ª, caracterizado porque una solución alcohólica del  
material de partida lípido se inyecta rápidamente en una so-  
lución acuosa, se concentra la preparación de liposoma re-  
sultante por ultrafiltración, seguido por adición de la pro-  
25 teína antígena y agitación de la mezcla.

5ª.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindi-  
caciones 1ª a 4ª, caracterizado porque las microvesículas  
formadas son de estructura unilaminar.

30 6ª.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindi-  
caciones 1ª a 5ª, caracterizado porque las microvesículas

1 contienen lecitina.

7<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup>, caracterizado porque las microvesículas contienen colesterol como reforzador.

5 8<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup>, caracterizado porque la proteína antigénica se deriva de un microorganismo patógeno.

9<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup>, caracterizado porque la proteína antigénica se deriva de un virus.

10 10<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9<sup>a</sup>, caracterizado porque el virus es un virus de la gripe.

15 11<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup>, caracterizado porque la proteína antigénica se deriva de protozoos.

12<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup>, caracterizado porque la proteína antigénica se deriva de bacterias.

20 13<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup>, caracterizado porque la proteína antigénica está provista de un grupo hidrófobo capaz de unirse a las microvesículas.

25 14<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 13<sup>a</sup>, caracterizado porque las microvesículas encapsulan un coadyuvante adicional.

15<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 14<sup>a</sup>, caracterizado porque las microvesículas están en un intervalo de tamaño de 20 nm a 200 nm.

30 16<sup>a</sup>.- Un procedimiento según las reivindicaciones

1 1ª a 4ª, caracterizado porque la agitación se consigue por  
tratamiento con ultrasonidos.

5 17ª.- Un procedimiento según las reivindicaciones  
1ª a 4ª, y 16ª, caracterizado porque la solución acuosa es  
una solución tamponada con fosfato.

18ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª  
caracterizado porque el disolvente es cloroformo.

10 19ª.- Un procedimiento según la reivindicación 4ª  
caracterizado porque la solución alcohólica es una solución  
etanólica.

20ª.- Un procedimiento según las reivindicaciones  
4ª y 19ª, caracterizado porque la ultrafiltración se lleva  
a cabo en una atmósfera de nitrógeno y a baja presión.

15 21ª.- Un procedimiento para la obtención de una  
preparación antigénica.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-  
cede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veinte hojas escritas a má-  
quina por una sola cara.

20 Madrid, 28. OCT. 1976

P.A.

25 **Alberto de Elizaburu**  
Por Poder,