

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

Revisar 1976

19 ES 21 22

NUMERO	461415	10 A2
FECHA DE PRESENTACION	6 Agosto 1976	

CONCEDIDA
PRIMER

CERTIFICADO DE ADICION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
76 24 124	6 Agosto 1976	Francia
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	61 PATENTE A LA CUAL SE ADICIONA
	A61K 39/02; C12N 1/20	446.637
54 TITULO DE LA INVENCIÓN		
"Mejoras en el objeto de la patente 446.637, por Procedimiento para la preparación de vacunas acelulares"		
71 SOLICITANTE (S)		
PIERRE FABRE S.A.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
125, rue de la Faisanderie, 75016 París, Francia		
72 INVENTOR (ES)		
Lucien Dussourd d'Hinterland, Gérard Normier, Anne Marie Pinel y Jacques Durand		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
M. Curell Suñol		

329 488
EX-FR

UNE A-4 MOD 3107

UTILICESE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

20 JUN. 1976

1^{er} C E R T I F I C A D O D E A D I C I O N

solicitado en España a favor de PIERRE FABRE S.A., de nacionalidad francesa, domiciliada en 125, rue de la Faisanderie, 75016 París, Francia, por "Mejoras en el objeto de la patente 446.637, por Procedimiento para la preparación de vacunas acelulares", con prioridad de la solicitud francesa 76 24 124 de fecha 6 Agosto 1976. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención, realizada en el Centro de Investigación Pierre Fabre, tiene por objeto unas nuevas vacunas del tipo de las descritas en la patente francesa nº 5. 75 10252 titulada "Preparación de vacunas a base de ácidos nucleicos ARN asociados a unos polisacáridos extraídos de gérmenes microbianos", que corresponde a la patente española nº 446.637 relativa a "Procedimiento para la preparación de vacunas acelulares". - - - - -

10. Más particularmente, la presente invención se refiere a unas nuevas vacunas a base de fracciones ribosomales asociadas a unas fracciones sacarídicas membranas

constituidas por polisacáridos y por lipopolisacáridos membranarios. - - - - -

5. Las vacunas antiguas, constituidas por gérmenes muertos atenuados o de lisados microbianos, tienen un poder vacunante inferior al de los gérmenes vivos. Se han buscado por tanto nuevas vacunas que tengan una mejor actividad antigénica que la de las vacunas conocidas. - - - - -

10. La presente invención ha salido de trabajos que muestran que los ribosomas de las células bacterianas llevan la actividad vacunante y que esta última no se manifiesta más que con un adyuvante de inmunidad. En el caso presente, este adyuvante soluble se extrae de las membranas celulares de las bacterias en forma de fracción sacarídica.

15. La presente invención propone por lo tanto unas mejoras en el objeto de la patente principal caracterizadas porque: - - - - -

- a) se extrae la fracción ribosomal de por lo menos una cepa de bacterias patógenas correspondiente a la afección a tratar o a prevenir, - - - - -
- 20. b) se extrae la fracción sacarídica de las membranas de las bacterias de por lo menos una cepa bacteriana elegida entre los géneros *Klebsiella*, *Serratia* y *Corynebacterium*, y - - - - -

c) las dos fracciones obtenidas se disponen en un excipiente farmacéuticamente aceptable. - - - - -

La presente invención se refiere, particularmente, a un procedimiento para la preparación de una vacuna en la cual la fracción sacarídica se extrae de las membranas de las bacterias de por lo menos una cepa bacteriana elegida entre los géneros: - - - - -

- 5. Klebsiella pneumoniae

Klebsiella rhinoscleromatis
- 10. Serratia corallina

Serratia indica

Serratia keilensis

Serratia kiliensis

Serratia marsescens
- 15. Serratia plymuthica

Corynebacterium avidum

Corynebacterium bovis

Corynebacterium enzymicum

Corynebacterium equi
- 20. Corynebacterium fascians

Corynebacterium flaccumfaciens

Corynebacterium flavidum

Corynebacterium fusiforme

Corynebacterium granulosum
- 25. Corynebacterium helvolum

- 5. Corynebacterium hypertrophicans
Corynebacterium insidiosum
Corynebacterium liquefaciens
Corynebacterium parvum
Corynebacterium parvum infectiosum
Corynebacterium paurometabolum
Corynebacterium pyogenes
Corynebacterium tumescens
Corynebacterium xerosis

10. En un modo de realización preferido del procedimiento según la presente invención, la fracción sacarídica utilizada como adyuvante se extrae de las membranas de *Klebsiella pneumoniae*. - - - - -

15. En un modo de realización particular de la invención se utiliza como adyuvante, además de la fracción sacarídica membranaria precedente, una fracción sacarídica membranaria extraída de las bacterias que corresponden a los ribosomas utilizados. - - - - -

20. En las vacunas según la presente invención, la relación en peso entre la fracción ribosomal y la fracción sacarídica está comprendida, preferentemente, entre 0,5 y 1.

La dosis unitaria de vacuna podrá, desde luego, variar en función de las necesidades del tratamiento o del modo de administración. - - - - -

Se dan, a continuación, unos ejemplos de dosificación que no son, desde luego, limitativos, así, la invención se refiere en particular a: - - - - -

- una vacuna bronco-ORL que tiene la composición siguiente:

5.	<u>Fracciones ribosomales</u>	
	. Ribosomas de Klebsiella pneumoniae	3,5 µg
	. Ribosomas de Diplococcus pneumoniae	3,0 µg
	. Ribosomas de Streptococcus pyogenes grupo A ₁₂	3,0 µg
	. Ribosomas de Hemophilus influenzae	0,5 µg
		<u>10,0 µg</u>
10.	<u>Adyuvante soluble</u>	
	. Fracción sacarídica membranaria de Klebsiella pneumoniae	<u>15,0 µg</u>
	1 dosis	25,0 µg
15.		de principio activo puro.

- una vacuna dental que tiene la composición siguiente: -

20.	<u>Fracciones ribosomales</u>	
	. Ribosomas de Actinomyces viscosus	1,2 µg
	. Ribosomas de Rothia dentocariosus	1,2 µg
	. Ribosomas de Streptococcus mutants	0,8 µg
	. Ribosomas de Streptococcus salivarius	1,0 µg
25.	. Ribosomas de Lactobacillus casei	<u>1,2 µg</u>
		5,4 µg

Adyuvante soluble

	. Fracción sacarídica membranaria de Klebsiella pneumoniae	9,6 µg
5.	1 dosis	15,0 µg
		de prin cipio activo puro.

- una vacuna veterinaria que tiene la composición siguiente:

10. Fracciones ribosomales

	. Ribosomas de Pasteurella hemolytica H ₁	3,0 µg
	. Ribosomas de Pasteurella multocida A ₁ - 1048.	3,0 µg
	. Ribosomas de Pasteurella multocida A ₃ - A13 .	3,0 µg
		<u>9,0 µg</u>

Adyuvante soluble

15.	. Fracción sacarídica membranaria de Klebsiella pneumoniae	13,5 µg
	. Fracción sacarídica membranaria de Pasteurella hemolytica H ₁	1,0 µg
20.	. Fracción sacarídica membranaria de Pasteurella multocida A ₁ - 1048	1,0 µg
	. Fracción sacarídica membranaria de Pasteurella multocida A ₃ - A13	1,0 µg
		<u>16,5 µg</u>
	1 dosis	25,5 µg
25.		de prin cipio activo puro.

En las vacunas según la presente invención, la fracción sacarídica se obtiene, por ejemplo, por extracción

de una suspensión acuosa de membranas con ayuda de fenol, siendo los sacáridos extraídos en la fase acuosa después de eliminación de la fase fenólica. Esta extracción fenólica se conduce, preferentemente, a una temperatura comprendida entre 60 y 70°C y preferentemente a 65°C con una solución de fenol al 90%. - - - - -

La suspensión acuosa de membranas utilizada para la realización de la extracción precedente puede obtenerse, como se ha descrito en la patente principal, a partir de un cultivo bacteriano que es molido y después centrifugado a fin de sedimentar selectivamente las membranas, las cuales son a continuación puestas de nuevo en suspensión en una solución acuosa. La sedimentación de las membranas puede realizarse, por ejemplo, por centrifugación bajo una aceleración del orden de 30.000 g después de eliminación de los desechos celulares. - - - - -

En lo que concierne a la fracción ribosomal, ésta puede prepararse por extracción de las células bacterianas molidas por un tampón salino ácido que contiene ácido clorhídrico, $MgCl_2$, NaCl y dodecilsulfato de sodio que conduce a una solución acuosa que se precipita con polietilenglicol y alcohol etílico, conteniendo el precipitado la fracción ribosomal. A fin de completar la purificación se toma de nuevo el precipitado, preferentemente, en un tampón que contiene ácido clorhídrico, $MgCl_2$, NaCl y dodecilsulfa-

to de sodio y se precipita de nuevo esta fase acuosa con al
cohol etílico, preferentemente alcohol etílico al 95%. - -

5. El precipitado así obtenido podrá servir de base
a las vacunas según la invención mezclándolo, según propor-
ciones que han sido definidas y que aparecerán más clara-
mente con la lectura de la descripción, con la fracción sa
carídica precedente. - - - - -

10. Desde luego, las vacunas según la presente inven-
ción pueden ser utilizadas según sus elementos constituyen-
tes, como es conocido en el campo de las vacunas, para el
tratamiento o la prevención de diferentes enfermedades, así,
la vacuna bronco-ORI, tal como ha sido definida precedente-
mente, puede permitir tratar o prevenir las rinotraqueobron-
15. quitis crónicas, los asma intrincados de bronquitis, las
bronquiectasias, las neumopatías virales sobreinfectadas
así como las sinusitis y las rinofaringolaringitis. - - - -

En lo que concierne a la vacuna dental, permite
prevenir las principales afecciones bucales comunes. - - -

20. Las vacunas según la presente invención se presen-
tan, preferentemente, en forma de aerosoles. Sin embargo,
es posible prever otras formas médicas. Así, algunas de las
vacunas según la invención deben ser utilizadas por vía pa-
renteral, por ejemplo por inyección. - - - - -

No es, desde luego, necesario aquí dar de nuevo la lista de los componentes que pueden entrar en la composición del excipiente de la vacuna según la invención, se trata de enseñanzas de la técnica de las vacunas o de la farmacología médica que son bien conocidas. - - - - -

5.
En general, los dos componentes de la vacuna serán conservados en forma de solución pero pueden ser liofilizados cuando tiene lugar la preparación de la vacuna, es suficiente mezclar los diferentes componentes de la vacuna en las proporciones determinadas. - - - - -

10.
Las normas analíticas del producto obtenido pueden ser determinadas de la forma siguiente: el título de ribosomas de la fracción ribosomal se ha calculado a partir del título de ARN de la forma siguiente: título de ribosomas = $\frac{\text{título de ARN} \times 100}{70}$. - - - - -

15.
El título de ARN es por su parte medido por dosificación espectrofotométrica del complejo fosfomolíbdico por comparación con un ARN patrón de Klebsiella de título conocido, determinado a su vez por dosificación del fósforo. - - - - -

20.
El título en proteínas de la fracción ribosomal está determinado por colorimetría al biuret en comparación con una gama de albúmina patrón. - - - - -

El porcentaje de ARN en la suma ARN + proteínas varía de 55 a 65% aproximadamente. - - - - -

5. El título en sacáridos del adyuvante está determinado a partir del título en glucosa medido por dosificación colorimétrica con la antrona de la forma siguiente: - - - -

$$\text{título de sacáridos} = \frac{\text{título de glucosa} \times 100}{50}$$

Una preparación patrón de sacáridos muy purificada ha servido para determinar el título en glucosa de los sacáridos, que es de 50% por este método de dosificación. -

10. A título de ejemplo se describe, a continuación, el modo de realización preferido del procedimiento según la presente invención. - - - - -

Preparación de una solución acuosa de ribosomas

15. Se cultivan de forma conocida las diferentes cepas de las cuales se desea extraer los ribosomas, en unos medios de crecimiento apropiados, en unos fermentadores. -

20. Las células bacterianas se recogen, después de cultivo, en un aparato de centrifugación Westfalia o Sharples y después se lavan por centrifugación con suero fisiológico frío a una temperatura del orden de 4°C. - - - - -

El concentrado bacteriano así obtenido puede ser

conservado congelado a -20°C si no se utiliza inmediatamente. - - - - -

5. Como para la extracción de los sacáridos, la extracción de los ribosomas puede conducirse en una mezcla de las diferentes cepas, pero se prefiere tratar cada cepa separadamente de manera que se facilite el control del producto obtenido, en este último caso los ribosomas y/o los sacáridos serán mezclados al final de la extracción para constituir la vacuna. - - - - -

10. Se efectúa sobre el concentrado bacteriano obtenido una extracción que permite determinar el peso seco de células después de desecación en la estufa (la relación células secas/células húmedas varía de 20 a 25%). - - - - -

15. Otra extracción está destinada al control de pureza del cultivo y a la identificación de la cepa. - - - - -

El concentrado bacteriano obtenido precedentemente es a continuación desintegrado, para ello se opera de la forma siguiente: - - - - -

20. Para una pequeña cantidad de células húmedas (inferior a 50 g) las células son dispersadas a razón de 1 g (peso húmedo) en 4 ml del tampón siguiente: - - - - -

tris-HCl-M/100, pH 7,2 que contiene: MgCl_2 , 6 H_2O 0,01 M

NaCl	9 g/l
dodecilsulfato de sodio	5 g/l

5. Cuando la suspensión es bien homogénea se somete a una desintegración por ultrasonidos durante 3 veces 10 minutos manteniéndola en un baño de hielo, se utiliza, por ejemplo, un aparato de ultrasonidos Sonnimasse 500 T. - - -

10. Para cantidades de células más importantes (superiores a 50 g) las células descongeladas son dispersadas en el mismo tampón que anteriormente y en las mismas proporciones, después son homogeneizadas por agitación viva 10 minutos en un reactor a gran velocidad. - - - - -

15. Las mismas son a continuación sometidas a un molido con el Manton-Gaulin en frío (5 ciclos para cada cepa). Se eliminan los desechos celulares más grandes por paso en un aparato Sharples y después el sobrenadante es sometido a una centrifugación a 4°C durante 30 minutos a 30.000 g (centrifugadora Beckman 521-B con rotor 6 x 250 ml JA 14).-

20. El residuo de centrifugación es eliminado y el sobrenadante que contiene los ribosomas es conservado a 4°C.

Extracción de los ribosomas

Al sobrenadante precedente se adicionan 100 g/l de polietilenglicol 4.000 (PEG 4.000 - Merck), a continua-

ción, después de disolución completa, un volumen de alcohol etílico 95% a -20°C. - - - - -

5. Se deja descansar a continuación 20 minutos en frío y después se recoge el precipitado en Sharples a 4°C (el sobrenadante es eliminado). - - - - -

10. El precipitado es entonces tomado de nuevo en solución en el mismo volumen del tampón utilizado para el molido (tris-HCl, MgCl₂, NaCl, SDS 0,5%) por agitación en el reactor a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos. (El lavado a temperatura ambiente tiene por función eliminar las proteínas no ribosomales). - - - - -

0,8 del volumen de alcohol etílico 95% a -20°C es a continuación adicionado y se deja precipitar durante 30 minutos a 10°C. - - - - -

15. El precipitado de ribosomas es recogido en Sharples y el sobrenadante eliminado. (Sin refrigeración para impedir la precipitación del SDS). El residuo de ribosomas es tomado de nuevo en tampón (MgCl₂ 0,02 M; KCl 0,02 M; pH 7) a 4°C a razón de 2 ml para un gramo de células húmedas de partida (agitación media 2 a 4 horas). - - - - -

20.

La nueva toma precedente es sometida a una centrifugación de 45 minutos a 30.000 g y a 0°C (eliminación del SDS residual). - - - - -

El residuo es eliminado y el sobrenadante es conservado. - - - - -

5. Se realiza una extracción (1 a 2 ml) sobre la cual se determina el título en ARN, el título en proteínas y el número de dosis por ml. - - - - -

Se conservan los ribosomas en frascos de plasma estériles a -20°C esperando utilizarlos. - - - - -

Preparación de una suspensión acuosa de membranas

10. Las células, después de cultivo, se recogen por centrifugación en Westfalia o Sharples y después se lavan por centrifugación con suero fisiológico frío. El concentrado bacteriano obtenido puede ser conservado a -20°C. - - -

15. Sobre una extracción se determina el residuo seco por desecación en estufa y se realizan controles bacteriológicos de pureza y de identidad. - - - - -

Las células descongeladas se suspenden en tampón frío a razón de 1 g de células en 4 ml de tampón. - - - - -

La fórmula del tampón es la siguiente: - - - - -

20.	tris-HCl	0,01 M, pH 7
	NaCl	9 g/l
	MgCl ₂ ,6 H ₂ O	0,01 M

El molido se realiza en Manton-Gaulin (3 ciclos a la presión máxima). Las células intactas así como los desechos celulares se eliminan por paso sobre Sharples y el sobrenadante es conservado a 4°C. - - - - -

5. Las membranas son entonces recogidas por centrifugación, 45 minutos a 30.000 g a 4°C (Beckman J 21 - B - rotor JA 14). - - - - -

10. El sobrenadante es eliminado (una fracción puede ser conservada para la preparación de ARN ribosomal patrón para la analítica). El residuo es conservado para la extracción del adyuvante soluble. Los residuos son puestos de nuevo en suspensión en agua destilada a razón de 2,5 ml por g de células húmedas de partida (homogeneización con el Turrax en 1 a 2 minutos). - - - - -

15. Extracción de los sacáridos

Se adiciona a la suspensión acuosa obtenida precedentemente un volumen de fenol-agua (al 90% de fenol) previamente termostatado a \simeq 80°C y después se lleva la mezcla, durante 5 minutos, a 65°C agitando vigorosamente. - - - - -

20. Se enfría enseguida rápidamente hacia 0°C. - - -

Para pequeños volúmenes, se separa la fase acuosa por centrifugación, 5 minutos a 5.000 r.p.m. a 0°C, en bo-

tes inoxidables. La fase acuosa superior es a continuación recogida. Para los volúmenes más importantes, se separa la fase acuosa por paso por separador líquido-líquido Westfalia o Sharples. - - - - -

5. La fase fenólica es eliminada. - - - - -

El fenol residual de la fase acuosa es eliminado por diálisis contra agua corriente durante 24 a 48 horas, o bien en un tubo de diálisis para pequeños volúmenes, o bien en un dializador de placa (tipo Sartorius) para los volúmenes más importantes. - - - - -

10.

Las ligeras precipitaciones que se forman durante la diálisis son a continuación eliminadas por una centrifugación a 10.000 g de 30 minutos a 0°C. - - - - -

15.

El sobrenadante es conservado congelado a -20°C en frascos plasma estériles. - - - - -

Se realiza una extracción de 1 ó 2 ml para el control analítico. - - - - -

Las vacunas según la presente invención son útiles tanto en medicina humana como en medicina veterinaria.

20.

1) Estudio del poder inmunogénico de la vacuna veterinaria citada precedentemente

Este estudio tiene por objeto controlar la apari-

ción y la persistencia de los anticuerpos específicos en el suero de las ratas vacunadas. - - - - -

5. Se utilizan unas ratas hembra de raza Swiss que pesan 20 ± 2 g mantenidas en unas jaulas para 10 con una nutrición en forma de tapones (régimen UAR ratas) y agua de bebida, en una sala para animales a la temperatura constante de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, con 40 a 60% de humedad. - - - - -

Inmunización de los animales

10. Por vía subcutánea se inyecta a cada animal la dosis de vacuna con un volumen de 0,2 ml. - - - - -

El ritmo de las inyecciones es el siguiente: - -

- . 5 inoculaciones en 15 días (o sea una inyección cada 3 días), - - - - -
- . un reposo de una semana, - - - - -
- 15. . 2 inoculaciones en 8 días (inyección de recuerdo), - - - - -
- . punción por los senos retroorbitales, 10 días como mínimo y 15 días como máximo después de la última inyección de recuerdo. - - - - -

20. Método de búsqueda de los anticuerpos

El suero de cada rata vacunada es estudiado enin-

munolectrodifusión según la técnica de Laurell. - - - - -

5. Cada suero de animal es estudiado contra el antígeno de la Pasteurella de la cual han salido los sacáridos membranarios: Pasteurella hemolítica H₁ y Pasteurella multocida A₃. - - - - -

De la misma manera se estudia cada suero contra el conjunto de las Pasteurella, de las cuales se han extraído los ribosomas de la preparación. - - - - -

10. El antígeno elegido se incorpora a un gel de agarosa al 1%, en tampón veronal pH 8,6. Este gel es colado sobre una placa de vidrio de 1,5 x 90 x 110 mm. - - - - -

Se depositan 7 µl del suero de cada rata en los huecos previamente vaciados en el gel. - - - - -

15. El depósito se efectúa en el cátodo. La migración dura 9 horas bajo corriente continua con una diferencia de potencial de 2 a 3 volts/cm. - - - - -

Al final de la migración las placas se lavan y se secan y los inmunoprecipitados son revelados por coloración con azul de Coomassie brillante. - - - - -

20. Resultados

Se observa la presencia de inmunoprecipitados espe

cíficos entre los anticuerpos del suero de las ratas tratadas y el antígeno revelador en forma de "rocket", cuya altura es representativa de la cantidad de anticuerpos contenida en el suero de los animales vacunados. - - - - -

5. Aquí se observan, en todas las placas, resultados altamente significativos con el suero de las ratas vacunadas, con respecto a los sueros de las ratas testigo, que confirman el alto poder vacunante de las composiciones según la invención. - - - - -

10. 2) Estudio del poder inmunogénico de la vacuna dental citada precedentemente

De la misma manera que en 1 se utilizan unas ratas hembra de raza Swiss que pesan 20 ± 2 g mantenidas en jaulas para 5 con una nutrición en forma de tapones (régimen UAR ratas) y agua de bebida en una sala para animales a la temperatura constante de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con 40 a 60% de humedad. - - - - -

Inmunización de los animales

20. Por vía subcutánea se inyecta a cada animal la dosis de vacuna con un volumen de 0,2 ml. (Es preciso notar que ensayos efectuados con relaciones de fracción ribosomal/fracción sacarídica de 1:1, 1:1,5 y 1:2 han mostrado que la composición citada anteriormente, 1:1,5, daba los mejores

resultados). - - - - -

El ritmo de las inyecciones es el siguiente: - -

- . 5 inoculaciones en 15 días (o sea una inyección cada 3 días), - - - - -
- 5. . un reposo de una semana, - - - - -
- . dos inoculaciones en 8 días (inyección de recuerdo), - - - - -
- . punción por los senos retroorbitales, 10 días como mínimo y 15 días como máximo después de la
- 10. última inyección de recuerdo. - - - - -

Método de búsqueda de los anticuerpos

El suero de cada rata vacunada es estudiado en inmunolectrodifusión según la técnica de Laurell. - - - -

- 15. El antígeno correspondiente a cada germen del cual han salido los ribosomas es incorporado a un gel de agarosa al 1% en tampón veronal pH 8,6. Este gel es colado sobre una placa de vidrio de 1,5 x 90 x 110 mm. - - - - -

Se depositan 7 μ l del suero de cada rata en los huecos previamente vaciados en el gel. - - - - -

El depósito se efectúa en el cátodo. La migración dura 9 horas bajo corriente continua con una diferencia de potencial de 2 a 3 volts/cm. - - - - -

5. Al final de la migración las placas se lavan y se secan y los inmunoprecipitados son revelados por coloración con azul de Coomassie brillante. - - - - -

Resultados

10. Se observa la presencia de inmunoprecipitados específicos entre los anticuerpos del suero de las ratas tratadas y el antígeno revelador en forma de "rocket" cuya altura es representativa de la cantidad de anticuerpos contenida en el suero de los animales vacunados. - - - - -

15. Se observan en todas las placas resultados altamente significativos con el suero de las ratas vacunadas, con respecto a los sueros de las ratas testigos, que muestran el alto poder vacunante de las vacunas según la invención. - - - - -

20. A los efectos consiguientes se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las reivindicaciones que siguen. - - - - -



REIVINDICACIONES

1.- Mejoras en el objeto de la patente 446.637, por Procedimiento para la preparación de vacunas acelulares, caracterizadas porque: - - - - -

5. a) se extrae la fracción ribosomal de por lo menos una cepa de bacterias patógenas que corresponde a la afección a tratar o a prevenir, - - - - -
- b) se extrae la fracción sacarídica de las membranas de las bacterias de por lo menos una cepa bacteriana elegida entre los géneros Klebsiella, Serratia y Corynebacterium, y - - - - -
10. c) las dos fracciones obtenidas se disponen en un excipiente farmacéuticamente aceptable. - - - - -

2.- Mejoras según la reivindicación 1, caracterizadas porque la fracción sacarídica se extrae de las membranas de por lo menos una cepa bacteriana elegida entre: - -

20. Klebsiella pneumoniae
Klebsiella rhinoscleromatis
Serratia corallina
Serratia indica
Serratia keilensis
Serratia kiliensis

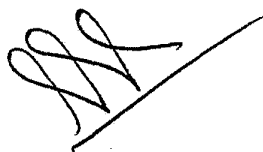


- Serratia marsescens
- Serratia plymuthica
- Corynebacterium avidum
- Corynebacterium bovis
- 5. Corynebacterium enzymicum
- Corynebacterium equi
- Corynebacterium fascians
- Corynebacterium flaccumfaciens
- Corynebacterium flavidum
- 10. Corynebacterium fusiforme
- Corynebacterium granulosum
- Corynebacterium helvolum
- Corynebacterium hypertrophicans
- Corynebacterium insidiosum
- 15. Corynebacterium liquefaciens
- Corynebacterium parvum
- Corynebacterium parvum infectiosum
- Corynebacterium paurometabolum
- Corynebacterium pyogenes
- 20. Corynebacterium tumescens
- Corynebacterium Xerosis. - - - - -

3.- Mejoras según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizadas porque la vacuna se dota, además, de la fracción sacarídica extraída de las membranas de las bacterias de las cuales se extraen los ribosomas. - - -

25.

4.- Mejoras según cualquiera de las reivindicacio



nes 1 a 3, caracterizadas porque la relación en peso entre la fracción ribosomal y la fracción sacarídica está comprendida entre 0,5 y 1. - - - - -

5. 5.- Mejoras según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizadas porque la fracción sacarídica se extrae de las membranas de *Klebsiella pneumoniae*. - - - - -

6.- Mejoras según la reivindicación 5, caracterizadas porque se procede de manera que se obtenga una vacuna bronco-ORL que comprende la fracción ribosomal extraída de:

- 10. *Klebsiella pneumoniae*
- Diplococcus pneumoniae*
- Streptococcus pyogenes* grupo A₁₂
- Hemophilus influenzae*. - - - - -

15. 7.- Mejoras según la reivindicación 5, caracterizadas porque se procede de manera que se obtenga una vacuna dental en la cual las fracciones ribosomales se extraen de:

- Actinomyces viscosus*
- Rothia dentocariosus*
- Streptococcus mutans*
- 20. *Streptococcus salivarius*
- Lactobacillus casei*. - - - - -

8.- Mejoras según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, caracterizadas porque se procede de manera que se



obtenga una vacuna veterinaria que comprende a título de fracción ribosomal unos ribosomas extraídos de: - - - - -

- Pasteurella hemolytica H₁
- Pasteurella multocida A₁ - 1048
- 5. Pasteurella multocida A₃ - A13. - - - - -

9.- Mejoras según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizadas porque la fracción sacarídica se obtiene por extracción de una suspensión acuosa de membranas con la ayuda de fenol, siendo los sacáridos extraídos en la fase acuosa. - - - - -

10. 10.- Mejoras según la reivindicación 9, caracterizadas porque la extracción se conduce a una temperatura comprendida entre 60 y 70°C. - - - - -

15. 11.- Mejoras según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizadas porque la fracción ribosomal se prepara por extracción de las células bacterianas molidas por un tampón que contiene HCl, MgCl₂, NaCl y dodecilsulfato de sodio y precipitación de la fase acuosa homogénea obtenida por polietilenglicol y alcohol etílico, estando los ribosomas presentes en el precipitado. - - - - -

20. 12.- Mejoras según la reivindicación 11, caracterizadas porque el tampón comprende ácido clorhídrico M/100, MgCl₂, 0,01 M, NaCl 9 g/l y dodecilsulfato de sodio a 5 g/l.



13.- Mejoras según cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, caracterizadas porque el precipitado obtenido es a continuación tomado de nuevo en un tampón que contiene HCl, $MgCl_2$, NaCl y dodecilsulfato de sodio y después es reprecipitado con ayuda de alcohol etílico. - - - - -

5.

14.- "MEJORAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE 446.637, POR PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE VACUNAS ACELULARES". - - - - -

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

MADRID - 5 AGO 1977

P.A. M. CURELL SUÑOL



maf.