

227680

P.-14.361

Case Núm. 41.779.-

12 JUN 1956

227680



1956

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar
e n

E S P A Ñ A

1er. CERTIFICADO DE ADICION

a nombre de PARKE, DAVIS & COMPANY, entidad norteamericana,
establecida en Detroit, Michigan, Estados Unidos de América.
por:

"MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE
PRINCIPAL" número 227.679 solicitada el 3 de Abril
de 1956, por: "Un procedimiento de producción de
una vacuna de virus de poliomiélitis"

Esta invención se refiere a vacunas, ésto es, a
substancias capaces de producir una respuesta antigénica en
el ser humano y en otros mamíferos, y a los métodos para pre-
parar a la misma a partir de virus capaces de provocar enfer-
medad. Más particularmente, la invención se refiere a vacunas

5

12



227680

contra la poliomiелitis y a métodos para prepararlas a partir de virus vivos de poliomiелitis.

5 Hasta el presente, los productos de vacuna
contra el virus de la poliomiелitis han sido preparados
por inactivación de virus de poliomiелitis mediante tra-
tamiento con formaldehído y con luz ultravioleta. El
propósito de tal tratamiento es convertir virus en no
infeccioso matándolo pero al mismo tiempo, sin destruir
substantialmente su propiedad antigénica inherente, vale
10 decir, la propiedad del virus de provocar la producción
de anticuerpos cuando se introduce en la sangre o tejido
del ser humano o de otros mamíferos. Una de las dificul-
tades que presenta el método conocido de matar los virus
de poliomiелitis mediante formaldehído se debe al margen
15 relativamente estrecho de seguridad entre la concentra-
ción de formaldehído necesaria para matar el virus y la
concentración que destruye la propiedad antigénica del
virus. Se ha informado también que el método de formalde-
hído produce resultados variados y en ciertos casos mata
20 en forma incompleta al virus. De un modo similar el méto-
do que emplea solo la irradiación ultravioleta produce
resultados variados puesto que falla ya sea en la inac-
tivación satisfactoria de la totalidad del virus o
tiende a destruir la propiedad antigénica del virus. Por
25 lo tanto, si la irradiación se emplea en el grado requeri-
do para una inactivación completa del virus, se destruye
esencialmente la totalidad de la antigenicidad.



227680

5 En vista de lo que precede, resulta necesario en la actualidad un procedimiento aplicable en forma general para obtener productos de virus polio, que poseen un alto grado de antigenicidad; que se hallan exentos de virus vivos y que son adecuados para su uso en la inmunización contra la infección provocada por virus vivos de poliomielitis.

10 Uno de los objetos de la presente invención es proporcionar un método seguro y efectivo para matar virus vivos de la poliomielitis con menos destrucción de la propiedad antigénica de los virus que la que normalmente existe en los procedimientos conocidos actualmente.

15 Otro objeto de la invención es proporcionar un método para producir productos de virus de poliomielitis que se hallen exentos de agentes tóxicos, que poseen un alto grado de antigenicidad y que son adecuados para la inmunización contra infecciones causadas por virus vivos de poliomielitis.

20 Otros objetos y ventajas de la invención se evidenciarán en la descripción que sigue a continuación:

25 De acuerdo con la invención los objetos anteriores se logran sometiendo un medio acuoso que contiene virus vivos de poliomielitis a tratamiento con una combinación de irradiación ultravioleta y calor y/o calor y formaldehído bajo condiciones tales que el primer tratamiento de inactivación de la combinación es suficiente para matar una proporción alta, pero no la totalidad de



227680

los virus vivos de poliomielitis presentes en el medio acuoso original, y que el tratamiento o tratamientos de inactivación siguientes de la combinación son suficientes para matar la totalidad de los virus vivos de poliomielitis residuales presentes en el medio sin que ninguno de dichos tratamientos de inactivación, si se aplica individualmente al medio acuoso original sea capaz de inactivar completamente la totalidad de los virus vivos de poliomielitis presentes en dicho medio. El producto de vacuna obtenido por éste método no solo está exento de virus vivos de poliomielitis sino que también posee un grado mayor de antigenicidad que el que se obtiene por métodos conocidos. Este resultado es sumamente impre-

5

10

15

20

25

visto puesto que los métodos conocidos que emplean la irradiación ultravioleta solamente o el calor solamente producen la pérdida casi completa de la antigenicidad cuando se emplean con la intensidad requerida para la inactivación completa del virus. La presente vacuna además de poseer un grado mayor de antigenicidad que el de una vacuna comparable en la que se ha inactivado mediante formaldehído tiene la ventaja adicional de que el virus muerto de poliomielitis presente en la vacuna no muestra tendencia a reactivarse cuando está en almacenamiento.

El orden en que se emplean los tratamientos de inactivación de la combinación no es particularmente crítico y no tiene, hasta donde ha sido posible determinarlo,



227680

ningún efecto material sobre los resultados obtenidos.
 Por ejemplo, se puede someter primeramente el medio acuoso
 que contiene el virus vivo de poliomielitis a la acción
 de irradiación ultravioleta y luego calor o se puede so-
 meter primeramente el medio a la acción del formaldehído
 y calor luego a la irradiación ultravioleta. Se puede
 también someter primeramente el medio a la acción de
 formaldehído y calor, luego a la irradiación ultravioleta
 y finalmente al calor solamente. Si se desea, se puede
 someter primeramente el medio a la acción de irradiación
 ultravioleta y luego a la acción de calor y formaldehído.

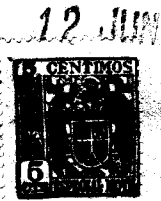
La invención es aplicable en forma amplia al
 virus de la poliomielitis y puede ser utilizada sobre los
 virus ya sea en forma simple o en combinación. Los virus
 de la poliomielitis empleados más comúnmente son los de
 los tipos 1, 2 y 3, y, en general, cada tipo de virus se
 trata por separado y la vacuna resultante se combina des-
 pués con la vacuna o vacunas preparadas a partir de otro
 tipo o tipos.

El medio acuoso que contiene el virus vivo de
 poliomielitis que se emplea como material de partida del
 procedimiento es susceptible de una variación considera-
 ble. Desde un punto de vista práctico es generalmente
 cualquier medio acuoso en el que el virus puede propagar-
 se mejor, un diluyente del mismo o un extracto acuoso de
 suspensión de tejidos en el que el virus de la poliomielitis



227680

puede propàgarse mejor. Un medio acuoso adecuado es un fluido de cultivo de tejido, por ejemplo el medio de cultivo de tejido "199" infectado con virus de poliomieli-
tis. Un ejemplo de un fluido de cultivo de tejido tal es
5 el que se obtiene por filtraci3n de un cultivo de virus de poliomielitis en tejido de riñ3n de mono preparado segun lo descripto por Dulbecco y otros en el "Journal of Experimental Medicine", Volumen 99, p3gina 167, (1954). De acuerdo con este m3todo, se tripsinizan teji-
10 dos macerados de riñ3n de mono para separar tejido extraño, dejando que se multipliquen c3lulas residuales, se inocular el medio con virus de poliomielitis, se incuba la mezcla y se cosecha el fluido. Aun cuando este m3todo se prefiere, la etapa de tripsinizaci3n puede
15 omitirse si se desea. En este 3ltimo caso, sin embargo, el contenido en prote3na de la vacuna puede ser excesivamente elevado y debe ser ensayado antes de su uso para evitar la producci3n de vacunas que pueden producir reac-
ciones de prote3na. En la preparaci3n de vacunas mixtas,
20 3sto es, vacunas que contienen m3s de un tipo de virus de poliomielitis, se pueden juntar o mezclar los fluidos cosechados que contienen los varios tipos antes de llevar a cabo el procedimiento de la invenci3n, pero, segun se ha indicado anteriormente, es generalmente preferible
25 juntar o mezclar las vacunas individuales despu3s de llevar a cabo el procedimiento. Con un prop3sito pr3ctico, y en el inter3s de emplear un material de partida de vi-



227680

rus que posee alta antigenicidad, el título de infecti-
vidad del medio acuoso debe ser de un orden elevado, es
decir, por lo menos 10^{-5} . En términos generales un me-
5 dio que contiene un título de infectividad en el orden de
 10^{-5} o mayor puede ser empleado. Bajo condiciones normales
de almacenamiento, el medio acuoso se mantiene bajo refri-
geración, por ejemplo, a una temperatura dentro del orden
de -5° a 10°C . Durante la manipulación posterior, de acuer-
do con la invención, el medio se torna más cálido, depen-
10 diendo de las condiciones de temperatura empleadas duran-
te el tratamiento. El medio acuoso que contiene el virus
de poliomielitis activo se produce, en general, bajo con-
diciones asépticas y es bacteriológicamente estéril. Sin
embargo, en la práctica general la esterilidad bacteriana
15 se asegura sometiendo al medio a una filtración bacteriana
antes de emplearlo en el procedimiento. En forma adicional
se puede concentrar y/o purificar parcialmente el virus
vivo y emplear dichas suspensiones o soluciones como mate-
riales de partida para el procedimiento. Se conviene en
20 que dichas suspensiones o soluciones habrán de quedar in-
cluidas dentro de la expresión "medios acuosos que contie-
nen virus vivo de poliomielitis" tal como se utiliza aquí.

Tal como se ha indicado previamente se utiliza
en la producción de las vacunas de la invención una com-
25 binación de irradiación ultravioleta y calor y/o calor
más formaldehído. La fase de irradiación ultravioleta
del procedimiento se lleva a cabo exponiendo una película



227680

delgada o una corriente del medio acuoso que contiene
al virus vivo de poliomielitis a la luz ultravioleta
con una longitud de onda comprendida entre 2.000 y 3.000
unidades angstrom y que tiene una intensidad suficiente-
5 mente alta como para reducir el título de infectividad
a un valor extremadamente bajo en un corto período de
tiempo. Para asegurar los resultados deseados, el espe-
sor promedio de la película o corriente que se expone
debe ser, en general, no mayor que 100 micrones y prefe-
10 rentemente 50 micrones o menos. Un espesor algo mayor
que 100 micrones puede ser empleado, pero en este caso
se requieren exposiciones mayores y la pérdida resultan-
te de antigenicidad es correspondientemente mayor. La
fuente de luz ultravioleta empleada debe emitir una pro-
15 porción elevada, preferentemente tan elevada como 95 %,
de energía en una longitud de onda de 2.537 unidades
angstrom. Las fuentes de luz que emiten una proporción
de energía algo menor a esta longitud de onda deseada
son satisfactorias pero menos eficientes. Para resulta-
20 dos se emplea una fuente de luz uniforme que emite un
95% de energía en una longitud de onda de 2.537 unidades
angstrom y que tiene una potencia de salida total de 10
a 25 wattios. La fuente de luz se emplea en forma con-
veniente a una distancia de aproximadamente 1 cm de la
25 superficie del medio acuoso que debe ser expuesto. En tér-
minos de intensidad de irradiación para las necesidades
ordinarias, la fuente de luz debe ser tal que proporcione



227680

5 desde aproximadamente 12.500 a 32.000 micro-wattios por
cm² de la zona de superficie de película bajo exposición.
Cuando se utiliza un medio acuoso de virus que tiene un
título de infectividad dentro del orden de 10^5 a 10^8
10 como material de partida, y las condiciones de irradia-
ción indicadas, se mata una proporción extremadamente
elevada de organismos activos dentro del término de
unos pocos segundos de exposición. La duración de la ex-
posición puede ser variada considerablemente pero en ge-
neral se desea reducir a un mínimo la duración de la ex-
posición para evitar cualquier destrucción in debida de
la antigenicidad del virus. El periodo preferido de ex-
posición es menor que 10 segundos y para los ~~mejores resul-~~
15 ~~tados~~ es aproximadamente de 0,5 a 2 segundos. Por ejemplo,
cuando se emplea luz ultravioleta en una longitud de onda
de 2.537 unidades angstrom que tiene una intensidad de
aproximadamente 25.000 microwatts por cm² la exposición
del medio de virus vivo en una película que tiene un es-
pesor promedio de 50 micrones durante un segundo reduce
20 el título de infectividad de 10^7 a aproximadamente 10^1 .
En general las condiciones de exposición deben ser tales
como para reducir el título de infectividad dentro de un
orden de $10^{-0,5}$ a $10^{-2,5}$. Un aparato que se prefiere pa-
ra la práctica de la invención es un dispositivo forma-
25 dor de película centrífugo descrito en la patente norte-
americana No. 2.725.482.

Este aparato está constituido por varias partes



227680

un tubo rotativo externo levemente cónico, de aproximada-
mente 40 cm. de largo con una inclinación hacia afuera
de 42 desde el extremo cerrado del fondo y de un diáme-
tro interno en la parte superior de 9,5 cm.; un tubo de
5 entrada de fluido suspendido en el centro del tubo exter-
no que tiene su abertura cerca del fondo del tubo externo;
seis lámparas tubulares ultravioletas de aproximadamen-
te 30 cm. de longitud efectiva suspendidas en el tubo
externo que rodea al tubo de entrada de fluido y dispues-
10 tas de modo tal que su superficie externa se halla den-
tro de aproximadamente 1 cm de la pared interna del tubo
rotativo externo; y un vaso adecuado que rodea la par-
te superior del tubo rotativo externo para captar y es-
currir hacia afuera el fluido que es expulsado fuera de
15 la parte superior del tubo externo que gira rápidamente
durante el funcionamiento del aparato. El aparato posee,
por supuesto, medios mecánico adecuados para hacer girar
rápidamente el tubo exterior. Durante el funcionamiento,
el líquido que debe ser irradiado, introducido a través
20 del tubo de entrada de fluido, fluye hacia el fondo del
tubo externo que gira rápidamente y es impulsado hacia
afuera y hacia arriba en la forma de una película más
allá de las lámparas ultravioletas. La película de lí-
quido es continuamente impulsada hacia arriba debido a
25 la introducción de más material a través del tubo de
entrada de fluido, hasta que el líquido finalmente se
derrama hacia afuera dentro del vaso que rodee la parte



227680

5 superior del tubo rotativo externo y se recoge el líquido. Otro aparato, que es adecuado, está descrito en la Patente Norteamericana Nº 2.588.716. Se da por entendido que es adecuado para llevar a la práctica a la invención cualquier medio comparable para exponer películas o corrientes delgadas a la luz ultravioleta durante periodos cortos de tiempo.

10 La temperatura del medio acuoso durante la irradiación no es crítica. A menos que se aplica calor exterior, el medio estará ordinariamente a la temperatura ambiente o menor. Sin embargo, se obtiene resultados mejores cuando la irradiación se lleva a cabo en medios acuosos que tienen una temperatura comprendida entre 30 y 42°C, preferentemente 35-40°C, y es por lo tanto preferible llevar a cabo la fase de irradiación del procedimiento después de caldear el medio a la temperatura antes indicada.

15 La fase de calentamiento del procedimiento, en los casos en los que es empleada, se lleva a cabo calentando o incubando el medio acuoso a una temperatura de 30 a 50°C durante aproximadamente 2 a 20 días. El orden preferido de la temperatura de incubación es aproximadamente de 35 a 40°C, y el tiempo preferido de incubación está entre 3 a 10 días. Para obtener el efecto de inactivación máximo es deseable colocar prontamente el medio acuoso bajo incubación, es decir, dentro de 2 ó 3 horas después de que ha sido sometido a irradiación



227680

o calor más formaldehído y someter luego a irradiación.

5 La fase de calor más formaldehído del procedimien-
to en el caso de ser empleada, se lleva a cabo agregando
formaldehído al medio acuoso en un órden de concentración
de aproximadamente 1:2.000 a 1:12.000, preferentemente
en el orden de 1:3.000 a 1:5.000 y calentando la mezcla
resultante a una temperatura entre 30 y 42°C. La tempera-
tura de calentamiento preferida está entre 35 y 40°C y el
tiempo preferido de calentamiento está entre 2 a 6 días.
10 Si se aplica esta fase del procedimiento al medio acuoso
original, el título de infectividad se reduce al orden
de 10^{-1} o menos. La presencia de cantidades no tóxicas de
formaldehído en el producto final es deseable para evitar
posibles reacciones de degradación enzimática nocivas y
15 para evitar la formación de levaduras, mohos, bacterias,
etc. El formaldehído se agrega preferentemente al medio
en la forma de una solución acuosa estéril, en frío, con
agitación total.

20 En la descripción precedente acerca del modo
en que se llevan a cabo las fases de irradiación ultravio-
leta, calor y calor más formaldehído del procedimiento,
la descripción ha sido limitada por razones de simplici-
dad, al tratamiento del medio acuoso que contiene al vi-
rus vivo de poliomiélitis. Debe entenderse, sin embargo,
25 que las observaciones precedentes se aplican con igual
fuerza y efecto a medios acuosos que ya han sido sometidos
a uno o más de éstos tratamientos de inactivación. Por



227680

ejemplo, las observaciones que se refieren a la fase de calor más formaldehído se aplican a medios acuosos que contienen virus vivo de poliomielitis que no ha sido sometido a ningún tratamiento de inactivación, a medios acuosos que han sido ya sometidos a la fase de irradiación ultravioleta, a medios que han sido ya sometidos a ambas fases de calor y de irradiación ultravioleta, etc.

5

Al llevar a cabo el procedimiento se ha descubierto que los mejores resultados se obtienen si el medio acuoso original que contiene el virus vivo de la poliomielitis se somete, ya sea, a una filtración bacteriana, es decir, filtración Seitz, o a filtración con vidrio ultrafino concrecionado, o a un tratamiento de precalentamiento justamente antes de llevar a cabo las fases de irradiación ultravioleta y/o el calentamiento más formaldehído.

10

Si se utiliza un tratamiento de precalentamiento la temperatura preferida está en el orden de 48 a 52°C. y calentamiento se lleva a cabo durante un periodo de 5 minutos hasta varias horas. Este tratamiento de precalentamiento o de filtración, dispersa aparentemente las partículas individuales de virus vivo que normalmente tienden a conglomerarse y agruparse, facilitando así la exposición posterior de las partículas individuales a una intensidad máxima de irradiación o concentración de formaldehído.

15

El tratamiento de precalentamiento no hace bajar, hasta donde ha sido posible determinarlo, el título o potencia de la vacuna y en realidad parece ser

20

25

227680

que en última instancia aumenta la potencia de la vacuna. Además pueden emplearse ventajosamente filtraciones bacterianas del tipo antes mencionado y/o precalentamiento entre las diferentes fases del procedimiento.

5 Si se desea, pueden ser incorporados a los productos de vacuna de la invención agentes germicidas y/o estabilizadores. Por ejemplo, puede agregarse cloruro de bencetonio a los productos de vacuna en una concentración de aproximadamente 1:20.000 a 1:50.000; preferentemente 1:40.000.
10 Si se desea puede agregarse también una pequeña cantidad de formaldehído, es decir, en una concentración de 1:9.000 a 1:20.000, a los productos de vacuna que aún no contienen formaldehído.

15 Los productos de vacuna de esta invención no contienen virus de poliomielitis vivos. Son también estériles en todos los demás aspectos, es decir, no contienen bacterias, levaduras o mohos vivos. Los productos son capaces de producir, por administración a mamíferos susceptibles a infección con virus vivos de poliomielitis, una inmunidad
20 en los mamíferos contra infección por el correspondiente virus vivo. La palabra "administración" tal como se la utiliza aquí y en la reivindicaciones anexas, significa inyección subcutánea, intradérmica o intramuscular. Los productos de vacuna pueden ser utilizados ya sea para la
25 producción de otros productos de vacuna de virus de poliomielitis tales como productos de vacuna de virus precipitados mediante alumbre o fosfato de aluminio o ellos pueden



227680

ser administrados a mamíferos con el propósito de inducir la inmunidad. Los productos pueden ser administrados, si se desea, sin dilución, pero en la mayoría de los casos es preferible diluirlos con una cantidad razonable, vale decir, 1 a 4 volúmenes de un medio acuoso estéril adecuado. Algunos ejemplos de diluyentes adecuados son la solución Hank estéril, solución salina estéril y agua destilada estéril.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos:

EJEMPLO 1.

Se preparan células para el cultivo de virus de poliomiелitis por el método de Dulbecco, Journal of Experimental Medicine, 99, pág.167, (1954). En pocas palabras, este procedimiento consiste en preparar primeramente una suspensión de células epiteliales de mono (ver Dulbecco, Proc. Nat. Acad. Sci. 38, pág. 747, (1952) por tratamiento de tejido de riñón de mono macerado de monos *Cynomolgus* o *Rhesus* sanos con tripsina para separar el material extraño y liberar las células individuales. Se deja multiplicar a estas células sobre una superficie de vidrio adecuada en cualquier medio de cultivo elegido de una cantidad de éstos. La hoja de células de riñón cultivada, así producida, se inocular entonces con un cultivo de siembra de virus de poliomiелitis Tipo 1 (cepa Mahoney) y la mezcla se incuba a 36-37°C hasta que se completa la destrucción de las células y se hayan liberado grandes cantidades de virus nuevo. El líquido que contiene al virus se cosecha y se pasa a través de una bujía de vi-



227680

drio ultra fino fritado. El filtrado que contiene el virus vivo de poliomielitis Tipo 1 se ensaya para determinar su contenido en virus, su esterilidad bacteriana y su pureza de cepa, se prepara del mismo modo un filtrado que contiene virus vivo Tipo 2 (cepa MEF-1), y un filtrado que contiene Tipo 3 (cepa Saukett) y los tres filtrados se combinan.

Los filtrados combinados que contienen los Tipos 1, 2 y 3 de virus de poliomielitis y que tienen un título de infectividad de $10^{-7,9}$ se pasan a través de un dispositivo formador de película centrífugo a un régimen de 600 ml por minuto bajo exposición a la radiación ultravioleta con una salida de 20 watts. El aparato formador de película centrífugo empleado del tipo descrito en la patente norteamericana N^o 2.725.482 y producido por la División del Laboratorio de Investigaciones de General Motors Corporation, Detroit, Michigan, comprende una cámara capsular cilíndrica rotativa dispuesta verticalmente, medios para hacer rotar a la cámara a la velocidad normal de funcionamiento de 1700 revoluciones por minuto y un conjunto tubular de 6 lámparas ultravioletas espaciadas uniformemente ubicadas en sentido axial dentro de la cámara. El diámetro interno del borde superior de la cámara es aproximadamente 9,5 cm y la pared interna de la cámara tiene una inclinación hacia adentro desde la parte superior en un ángulo de 4° con respecto de la vertical. La altura fija de la pared interna de la cámara es aproxima-

12 1956

227680

damente 40 cm. La superficie exterior del conjunto de lámparas está espaciada a una distancia de 1 cm. de la pared interna de la cámara y la intensidad efectiva de irradiación ultravioleta en la superficie interna de la cámara es aproximadamente 25.000 microwatts por cm^2 . El espesor promedio de la película del medio expuesto a la radiación es de aproximadamente 75 micrones y el tiempo completo de exposición es 1 segundo. El título de infectividad del medio después de la exposición es aproximadamente $10^{-1,8}$. Una parte alícuota del medio irradiado se incuba entonces inmediatamente a 37° durante 10 días y el título de infectividad del medio después de la incubación es 0, es decir que el medio está completamente exento de virus vivo de poliomiелitis. El producto así irradiado e incubado posee un alto orden de antigenicidad según se ha indicado a continuación. La antigenicidad de los productos obtenidos arriba se determina del siguiente modo: Se inoculan monos Rhesus con tres dosis de 1 ml. de la vacuna a intervalos semanales. Los animales son sangrados una semana después del término del curso de inoculación, se prepara un suero a partir de la sangre recogida y se determina el número de anticuerpos en el suero. Esta determinación se hace mediante dilución seriada del suero con solución salina y mezclando las partes alícuotas diluidas así obtenidas con una solución normalizada que contiene un número conocido de unidades infecciosas del tipo dado del virus de poliomiелitis. Por ejemplo, si se analiza la poten-

227680

cia del Tipo 1 se utiliza una solución normalizada que contiene un número conocido de unidades infecciosas de virus de poliomielitis Tipo 1; para análisis de la potencia del Tipo 2 o Tipo 3, se utiliza una solución normalizada de virus infeccioso Tipo 2 o Tipo 3. El punto final de la titulación es la dilución en la cual el suero contiene suficientes anticuerpos para neutralizar exactamente, vale decir, combinarse con y convertir en no infecciosas, el número conocido de unidades infecciosas del virus en la solución normalizada. Se utiliza una cantidad de monos en el análisis de la potencia de cada tipo de virus de poliomielitis. Los resultados así obtenidos se disponen en una forma para una comparación conveniente y valoración estadística tomando el logaritmo en base 2 del punto final de dilución del suero para cada mono, promediando estas cantidades y tomando luego el antilogaritmo se denomina título medio geométrico de las vacunas y es por supuesto, diferente para cada tipo de virus presente en la vacuna. Dado que el título medio geométrico depende de la potencia de la solución normalizada del virus infeccioso de poliomielitis utilizado en la prueba, es necesario especificar el número de unidades infecciosas del virus de poliomielitis presente en la solución normalizada para reflejar el significado propio del título medio geométrico. El método para calcular el título medio geométrico se expone en detalle en la Enmienda Número 2 al Minimum Requirements of Poliomyelitis Vaccine, publicado el 20 de Mayo de 1954 por el Departamento de Sanidad, Educación y Bienestar de los Estados Unidos de Norte América.



227680

Los resultados de la determinación de la antigenicidad del producto de vacuna obtenida seguida de incubación a 37°C se dan a continuación en la table 1.

Tabla 1.

Muestra Probada	Viros Tipo	Número de Monos usados	Titulo medio geométrico	No. de unidades Infecciosas de Virus Neutralizadas.
Producto de vacuna producido por irradiación e incubación de acuerdo con el método del ejemplo 1.	1	5	7	$10^{1,1}$
	2	5	330	$10^{1,4}$
	3	5	16	$10^{1,8}$

x Potencia de la solución normalizada utilizada en las pruebas.

227680



12



227680

EJEMPLO 2

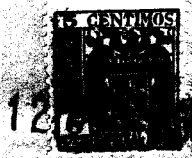
Flúidos de filtrados de cultivos de virus de poliomiélitis que contienen los Tipos 1, 2 y 3 de virus de poliomiélitis (Título de infectividad: $10^{-6,83}$) se exponen a la luz ultravioleta durante 1 segundo a un régimen de 400 ml por minuto (espesor de la película: 50 micrones) empleando un aparato formador de película centrífugo tal como el descrito en el ejemplo 1 bajo las mismas condiciones de funcionamiento. El título de infectividad del medio después de la exposición es aproximadamente $10^{-0,7}$. Una parte alícuota del medio se incubaba a 45°C durante tres días. La vacuna incubada resultante así obtenida está completamente exenta de virus vivos y posee un alto grado de antigenicidad. La tabla siguiente muestra una comparación, con respecto a la antigenicidad, de los productos precedentes, con un producto de vacuna producido por el método del formaldehído a partir de los mismos flúidos de cultivo de virus. El formaldehído se empleó en una concentración de 1 a 4.000 y la mezcla fué incubada a 37°C durante 14 días.

TABLA 2.

Muestra probada	Virus Tipo	Número de Monos usados	Título medio geométrico	No. de Unidades Infecciosas de virus neutralizadas ^x
Producto de vacuna producido por irradiación e incubación durante 3 días de acuerdo con el método del ejemplo 3.	1	3	10	10 ^{2,25}
	2	3	1.378	10 ^{2,33}
	3	3	475	10 ^{2,5}
Producto de vacuna producido por el método común que emplea formaldehído en una concentración de 1 a 4.000 a 37°0 durante 14 días.	1	3	7,5	10 ^{2,25}
	2	3	8	10 ^{2,33}
	3	3	8	10 ^{2,5}

^xPotencia de la solución normalizada utilizada en las pruebas.

227680



12 JUN 1951

227680

EJEMPLO 3.

60 litros de un medio acuoso que contiene los Tipos 1, 2 y 3 de virus vivos de poliomielitis (título de infectividad: $10^{-6,5}$) se preparan de acuerdo con el método expuesto en el ejemplo 1. Una parte alícuota del medio se expone a la luz ultravioleta durante 1 segundo a un régimen de flujo de 600 ml por minuto del modo indicado en el ejemplo 1. El medio, que tiene un título de infectividad después de la irradiación de $10^{-1,84}$ se incuba a 37°C durante tres días.

Otra parte alícuota se irradia de modo similar, se mezcla con una solución acuosa estéril de formaldehído de modo de obtener una concentración de formaldehído de 1:4.000 y se incuba luego a 37°C. durante tres días.

Otra parte alícuota se calienta a 52°C durante aproximadamente una hora, se enfria a aproximadamente 37 a 40°C, se irradia entonces de modo similar y entonces se incuba. Se calienta de modo similar otra parte alícuota, se enfria, se irradia y se mezcla con una solución acuosa estéril de formaldehído de modo de obtener una concentración de formaldehído de 1:4.000 y se incuba a 37°C durante tres días.

La antigenicidad de los productos de vacuna obtenidos y de los medios acuosos no tratados que contienen al virus activo de poliomielitis, se determina esencialmente por el mismo método expuesto en el ejemplo 1, empleando cobayos en lugar de monos Rhesus, como animales

12 JU



227680

5 de prueba. Las únicas diferencias de procedimiento en los dos métodos de prueba fueron de que a los cobayos se les inyectó porciones de la vacuna de 0,5 cm³ en lugar de porciones de 1 cm³ y de que las inyecciones se realizaron por vía intradérmica en lugar de intramuscular. Los resultados de la determinación de la antigenicidad se suministran en la tabla 3 que sigue a continuación:

TABLA 3.

Virus Tipo	Número de Cobayos utilizados	Título medio geométrico	No. de Unidades infecciosas de Virus neutralizadas *
Producto de vacuna producido por irradiación e incubación.	4	47	$10^{1,35}$
	4	211	$10^{1,44}$
	4	14	$10^{1,35}$
Producto de vacuna producido por irradiación y formaldehído más calor	3	40	$10^{1,35}$
	3	158	$10^{1,44}$
	3	22	$10^{1,35}$
Producto de vacuna producido por precalentamiento, irradiación e incubación	4	99	$10^{1,35}$
	4	233	$10^{1,44}$
	4	33	$10^{1,35}$
Producto de vacuna producido por precalentamiento, irradiación y formaldehído más calor	4	62	$10^{1,35}$
	4	168	$10^{1,44}$
	4	16	$10^{1,35}$
Material de partida no tratado	2	30	$10^{1,35}$
	2	89	$10^{1,44}$
	2	14	$10^{1,35}$

227680

* Potencia de la solución normalizada utilizada en las pruebas.

12
61
56

227680

EJEMPLO 4.-

30 litros de un medio acuoso que contiene virus vivo de poliomiелitis Tipo 1 (título de infectividad $10^{-6,7}$) preparados según se ha descrito en el ejemplo 1, se filtran a través de un filtro bacteriano de vidrio ultra fino concresionado. Se agrega suficiente formalina a la solución fría, con agitación, para alcanzar una concentración de formaldehído de 1:4.000 y se incuba la mezcla a 37°C durante cuatro días. La suspensión resultante que tiene un título de infectividad menor que 10^{-1} , se centrifuga en una centrífuga de tipo cónico (Clarificador De Laval) a un régimen de 600 ml por minuto y el efluente claro se expone a la luz ultravioleta empleando el aparato formador de película descrito en el ejemplo 1. El régimen de flujo utilizado es de 600 ml por minuto con una salida incidente de energía ultravioleta de 16-18 watts. El espesor de la película durante la exposición es aproximadamente 50 micrones y el tiempo de exposición es levemente menor que un segundo. Los microwatts de energía ultravioleta incidente son aproximadamente 21000 por cm^2 de película. Si se utiliza un régimen de flujo de 150 ó 300 ml por minuto, la energía debe ser reducida en correspondencia. La solución de virus resultante se filtra nuevamente a través de un filtro bacteriano de vidrio ultra fino concresionado y se somete una muestra a las pruebas de standard de seguridad. En este punto, la vacuna no contiene ningún virus vivo según lo indica un resultado negativo en la

12
10

227680

prueba de seguridad. No obstante, la suspensión filtrada es luego incubada a 37°C durante tres días y se somete otra muestra a pruebas de seguridad. Las pruebas de esta muestra también demostraron la completa ausencia de virus vivos.

5
30 litros de un medio acuoso que contiene virus vivo de poliomielitis Tipo 2 (título de infectividad $10^{-7,7}$) se prepararon según lo descrito en el ejemplo 1 y se sometieron al mismo proceso descrito arriba.

10
30 litros de un medio acuoso que contiene virus vivo de poliomielitis Tipo 3 (título de infectividad $10^{-6,5}$) se prepararon según se ha descrito en el ejemplo 1 y se sometieron al mismo proceso que el descrito arriba, con excepción de que en la fase de irradiación se utilizó un régimen de flujo de 600 ml por minuto juntamente con una salida de energía incidente de 14 a 16 watts.

15
Las tres suspensiones de vacuna preparadas del modo descrito arriba se mezclan conjuntamente y se diluyen luego con tres volúmenes de solución de Hank estéril. El producto de vacuna que contiene virus muertos de poliomielitis Tipos 1, 2 y 3 se somete a pruebas de seguridad antes y después de la dilución. En ambos casos las pruebas de seguridad indicaron la completa ausencia de virus vivos. Se agrega suficiente cloruro de bencetonio en la forma de una solución acuosa fría, con agitación eficiente para alcanzar la concentración final de 1:40.000 y el producto de vacuna resultante se prueba para determinar su potencia con respecto de cada tipo de virus de



227680

5 poliomyelitis en monos, empleando la prueba standard del Instituto Nacional de Sanidad de los Estados Unidos de Norte América, que involucra una comparación con respecto de una referencia de sueros 2 A del Instituto Nacional de Sanidad. Los resultados de ésta prueba se exponen en la tabla siguiente:

TABLA 4

Muestra Probada.	Virus tipo	Número de monos utilizados	Factor de potencia en mono ^x (Norma de comparación INS, Ref. Sueros) 2 A.
10 Producto de vacuna producido por irradiación y formaldehído más calor	1	12	1,0
	2	12	2,0
	3	12	2,4

15 ^x El factor de potencia en mono se calcula en cada caso dividiendo el título medio geométrico de los sueros de mono que se están probando para un tipo particular de virus por el título medio geométrico de la referencia Sueros 2A del Instituto Nacional de Sanidad con respecto al mismo tipo de virus. Los factores mínimos aceptables en mono para los varios tipos de virus de poliomyelitis son: 1-0,29; Tipo 2-0,25; y Tipo 3-0,16 (para mayores detalles ver Minimum Requirements of National Institute of Health, 11 de Noviembre de 1955).

20

12



227680

Después de haber completado las pruebas de potencia y seguridad, la vacuna preparada antes, se carga en ampollitas bajo condiciones estériles y se cierran las ampollitas. Una cantidad de las ampollitas preparadas de este modo se eligen al azar y los contenidos se someten a la prueba de seguridad. Esta prueba de seguridad indicó la completa ausencia de virus vivos de poliomiélitis. El producto de vacuna así producido es adecuado para su uso para inmunizar seres humanos contra la infección por virus vivos de poliomiélitis Tipos 1, 2 y 3. Si se desea, el producto de vacuna puede ser también utilizado en la producción de otros productos de vacuna, por ejemplo, vacunas contra la poliomiélitis precipitadas con alumbre o fosfato de aluminio.

EJEMPLO 5.

30 litros de un medio acuoso que contiene virus vivo de poliomiélitis Tipo 1 (título de infectividad $10^{-6,7}$), preparados según se ha descrito en el ejemplo 1, se filtra a través de un filtro bacteriano de vidrio ultra fino concrecionado. Se agrega suficiente formalina a la solución fría, con agitación, para alcanzar una concentración de formaldehído de 1:4000 y la mezcla se incuba a 37°C durante 4 días. La suspensión resultante, que tiene un título de infectividad menor que 10^{-1} se centrifuga en una centrifuga de tipo cónico (clarificador De Laval) al régimen de 600 mililitros por minuto y el efluente claro se expone a la luz ultravioleta empleando el aparato formador de película



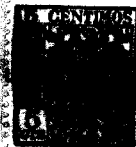
227680

5 centrifugo descrito en el ejemplo 1. La fuente de luz ultravioleta tiene una salida de energía incidente de 20 watts y se utiliza un régimen de flujo 600 ml por minuto. El espesor de la película durante la exposición es aproximadamente 50 micrones y el tiempo de exposición es levemente menor que 1 segundo. Los microwatts de energía ultravioleta incidente son aproximadamente 21.000 por cm^2 de película. 600 ml del producto de vacuna así obtenido se someten a las pruebas standard de seguridad y se ha descubierto que no contienen virus vivo de poliomielitis.

10 30 litros de un medio acuoso que contiene virus vivo de poliomielitis tipo 2 se preparan según se han descrito en el ejemplo 1 y se tratan según se ha descrito arriba. Las pruebas de seguridad realizadas sobre el producto de vacuna resultante demuestran que no contiene virus vivo de poliomielitis.

15 30 litros de un medio acuoso que contiene virus vivo de poliomielitis Tipo 3 se preparan según se ha descrito en el ejemplo 1 y se trata según se ha descrito arriba. Las pruebas de seguridad registradas sobre el producto de vacuna resultante demostraron que no contiene virus vivo de poliomielitis.

20 Los tres productos de vacuna preparados según se ha descrito arriba se mezclan conjuntamente y después de separar una muestra de 900 ml para pruebas de seguridad, la mezcla se diluye con 3 volúmenes de solución de Hank estéril. Una muestra de 900 ml de la vacuna diluida fué so-



227680

5 metida a una prueba de seguridad junto con la muestra no diluida y se descubrió que ambas estaban completamente exentas de virus vivo de poliomielitis. Se agrega suficiente cloruro de bencetonio al producto de vacuna para alcanzar la concentración de 1:40000. El producto resultante se prueba para determinar su potencia en monos utilizando el procedimiento a que se ha hecho referencia en el ejemplo 4. Los resultados de la prueba se muestran en la table 5.

TABLA 5.

10

Muestra Probada	Virus tipo	Número de monos utilizados	Factor de Potencia en no (Norma de comparación INS Ref. Sueros 2A)
Producto de vacuna producido por irradiación y formaldehído más calor.	1	12	6.7
	2	12	4.5
	3	12	3.6

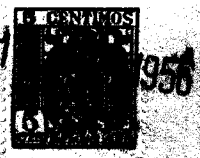
15

20

Después de haber completado las pruebas de potencia y seguridad, el producto de vacuna se carga en ampollitas bajo condiciones estériles y se cierran las ampollitas. El producto así producido es adecuado para su uso para inmunizar seres humanos contra la infección por virus vivo de poliomielitis Tipos 1, 2 y 3.

25

Aun cuando en la descripción que precede ciertas realizaciones de la invención han sido expuestas en detalle, debe entenderse, por parte de los entendidos en la materia que puede llevarse a cabo una considerable variación en dichos detalles sin por ello apartarse del espíritu de la invención.



227680

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 20 de Febrero de 1.956, bajo el número 566.374, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Industrial.

5

----- N O T A -----

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, son los siguientes:

10

19- Mejoras introducidas en el objeto de la Patente principal, o sea, en un procedimiento para producir una vacuna de virus de la poliomielitis que consiste en someter un medio acuoso que contenga virus de poliomielitis vivos a tratamiento con una combinación de irradiación ultravioleta y formaldehído más calor o irradiación ultravioleta, calor y formaldehído más calor en cualquier orden en condiciones tales que el primér tratamiento mortífero de la com-

15

12
10
11

227680

binación sea suficiente para matar una elevada proporción de virus de poliomiелitis vivos presentes en el medio acuoso original pero no todos y que el tratamiento o tratamientos mortíferos siguientes de la combinación sean suficientes para matar todos los virus de poliomiелitis vivos restantes presentes en el medio, no siendo ninguno de los citados tratamientos mortíferos, aplicado por sí solo al medio acuoso original, capaz de matar completamente todos los virus de poliomiелitis vivos presentes en el medio.

5

10

2^a.- Mejoras de acuerdo con la reivindicación 1, según las cuales el medio acuoso que contiene el virus de poliomiелitis vivo se incuba primeramente con formaldehído a una temperatura elevada, luego se somete a irradiación ultravioleta y finalmente se incuba a una temperatura elevada.

15

3^a.- Mejoras de acuerdo con la reivindicación 1, según las cuales el medio acuoso que contiene el virus de poliomiелitis vivo se somete primeramente a irradiación ultravioleta y luego se incuba con formaldehído a una temperatura elevada.

20

4^a.- Mejoras de acuerdo con la reivindicación 1, según las cuales el medio acuoso que contiene el virus de poliomiелitis vivo se incuba primeramente con formaldehído a una temperatura elevada y luego se somete a irradiación ultravioleta.

25

5^a.- Mejoras de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, según las cuales la exposición



227680

a la irradiación ultravioleta se realiza exponiendo el medio que contiene los virus de poliomielitis vivos o parcialmente muertos en forma de una película que tiene un espesor de menos de 100 micrones durante un periodo de menos de dos segundos a irradiación ultravioleta en la cual la energía a 2537 unidades angstrom está comprendida entre 12500 y 32000 microvatios por centímetro cuadrado.

6º.- Mejoras de acuerdo con la reivindicación 5, según las cuales la temperatura del medio durante la irradiación ultravioleta está comprendida entre 30 y 42°C. y, preferiblemente, entre 35 y 40°C.

7º.- Mejoras de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, según las cuales la incubación con formaldehído a una temperatura elevada se realiza empleando formaldehído a una concentración comprendida entre 1:3000 y 1:5000 y la temperatura se mantiene entre 30 y 42°C. durante dos a seis días.

8º.- Mejoras de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, según las cuales la incubación a una temperatura elevada se realiza a 30-50°C. durante dos a veinte días y, preferiblemente, a 35-40°C. durante tres a diez días.

9º.- Mejoras de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, según las cuales el medio acuoso que contiene el virus de poliomielitis vivo tiene un título de poder infeccioso de por lo menos 10^{-5} con respecto a cada tipo de virus de poliomielitis presente en dicho medio.

10º.- Mejoras de acuerdo con cualquiera de las

15 JUN 1956
12 JUN 1956

227680

reivindicaciones precedentes, según las cuales el medio acuoso que contiene los virus de poliomielitis vivos o parcialmente muertos se somete a un tratamiento de filtración bacteriana o a un tratamiento de pre-calentamiento a 40-52°C. durante un periodo de cinco minutos a varias horas antes de someter el medio a irradiación ultravioleta y también antes de someter el medio a calor más formaldehído o a calor.

11.- Mejoras de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, según las cuales el proceso se realiza en un medio acuoso que contiene virus de poliomielitis vivo del tipo 1, en un medio acuoso que contiene virus de poliomielitis vivo del tipo 2 y en un medio acuoso que contiene virus de poliomielitis vivo del tipo 3 y las vacunas resultantes se mezclan después para producir un producto para vacuna capaz de inmunizar contra los virus de poliomielitis de los tipos 1, 2 y 3.

12.- Mejoras de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, según las cuales una pequeña cantidad de un agente estabilizador, tal como cloruro de bencetonio, se incorpora al producto para vacuna.

13.- Mejoras introducidas en el objeto de la Patente principal núm. 227.679.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta y cinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 12 JUN. 1956

Alberto de Elizaburu
Por Poderes