



21 OCT

271398

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

por VEINTE años en España, por "UN METODO DE PREPARAR UNA VACUNA ESTABLE DE VIRUS VIVOS".

a favor de

BAYLOR UNIVERSITY COLLEGE OF MEDICINE

domiciliado en Houston, TEXAS, EE.UU.

PRIORIDAD: sol. Pat. EE.UU. nº 128.953 del 3-8-61

INVENTORES: Joseph Louis Melnick, y Craig Wallis, ambos de nacionalidad norteamericana.

MVE

271398



21 OCT

5 Este invento trata de ciertos virus del tipo que contiene ácido ribonucleico (RNA) y de las vacunas que con ellos se preparan, y especialmente de las vacunas a base de virus vivos de poliomielitis. Se refiere además a métodos destinados a estabilizar ciertos virus RNA y vacunas preparadas con ellos, y a métodos de separar virus foráneos que se incorporan inadvertidamente en los virus cosechados para la preparación de la vacuna. La presente solicitud es en parte continuación de la solicitud estadounidense nº 128.953 presentada el 3 de agosto de 1961.

10 Con posterioridad a la introducción de los procedimientos de cultivo en células vivas se han cultivado cepas atenuadas de muchos virus. Estas cepas han perdido la capacidad de producir síntomas clínicos, pero retienen la virtud de multiplicarse, y cuando se utilizan en la preparación de una vacuna protegen al huésped contra una infección subsiguiente causada por cepas virulentas del mismo virus. La infectividad del virus es indispensable para que la vacuna ejerza su acción y por lo tanto para que la vacuna a base de virus vivos atenuados resulte eficaz.

15 El problema que entraña la conservación de la infección del virus antes de utilizarse presenta grandes dificultades. Existen generalmente ciertos requisitos especiales respecto de la refrigeración, que es preciso satisfacer si las vacunas obtenidas han de tener siquiera un corto período de vida utilizable. Los gastos de la refrigeración elevan considerablemente el costo de esos productos. Pero lo que aumenta aun más el costo de las vacunas es el hecho de que a causa del corto período de vida utilizable, muchas veces, cuando se mantienen a temperaturas superiores a las de la congelación, hay que devolver las vacunas al fabricante sin poder utilizarlas.

20 El problema que entraña la conservación de la infección del virus antes de utilizarse presenta grandes dificultades. Existen generalmente ciertos requisitos especiales respecto de la refrigeración, que es preciso satisfacer si las vacunas obtenidas han de tener siquiera un corto período de vida utilizable. Los gastos de la refrigeración elevan considerablemente el costo de esos productos. Pero lo que aumenta aun más el costo de las vacunas es el hecho de que a causa del corto período de vida utilizable, muchas veces, cuando se mantienen a temperaturas superiores a las de la congelación, hay que devolver las vacunas al fabricante sin poder utilizarlas.

25 Entre los procedimientos empleados en el arte anterior para conservar la infección de las vacunas preparadas a base de vi-

30

271398



rus vivos, sobre todo de la vacuna contra la viruela figuran, fuera del
almacenaje en forma congelada, el almacenaje en seco, el almacenaje en
frío combinado con el uso de glicerol, y la adición de cloruro de
sodio, cloruro de potasio o cloruro de amonio en soluciones concen-
5 tradas. Estos métodos, excepto el del almacenamiento bajo refrigera-
ción, que tiene solo una utilidad limitada, aunque son adecuados para
virus del tipo DNA (ácido desoxirribonucleico), por ejemplo, el de la
viruela, resultan menos adecuados para virus del tipo RNA, los cuales
tienden a ser menos estables que el virus de la viruela. Los virus
de poliomielitis, en las suspensiones que se utilizan para vacunas de
10 administración oral, son especialmente propensos al deterioro, sobre
todos si están secos o, aunque estén en estado líquido, cuando se
mantienen a temperaturas superiores a la congelación, comparados con
los extractos de tejidos crudos infectados que se utilizan para la va-
cuna contra la viruela.
15

Otro problema que surge con motivo de la preparación de
vacunas de virus cultivados en células vivas es el que plantea la in-
corporación inadvertida de virus que se hallan presentes como contami-
nantes espontáneos en los cultivos de células que producen cosechas
de virus con que se prepara la vacuna. Tratándose de vacunas de virus
20 vivos de poliomielitis, que generalmente se desarrollan en cultivos
de tejido de riñón de mono, el virus contaminante puede hallarse mez-
clado con el virus que sirve para preparar la vacuna y abrirse paso
hasta la vacuna final. Resulta, pues, que muchos lotes de vacuna de
virus vivos de poliomielitis, especialmente de los procedentes de cul-
25 tivos en riñón de mono rhesus (Macaca mulatta), contienen concentra-
ciones relativamente altas de virus vacuolantes (en proporciones de
hasta 10^5 TCD₅₀ por mililitro de vacuna).

Uno de los objetos de este invento es ofrecer un método
30 poco dispendioso y sencillo que permite aumentar el período durante

271398



5 el cual las vacunas de virus vivos de poliomiélitis retienen toda su
viabilidad e infectividad, aun a temperaturas de 50°C. y proporcionar
vacunas de virus vivos de poliomiélitis capaces de utilizarse por es-
pacio de varios meses o durante un tiempo mayor cuando se refrigeran
a las temperaturas superiores a la de congelación que se emplean gene-
ralmente para productos biológicos, y durante semanas, cuando se
mantienen a la temperatura ambiente. Otro objeto del invento es pro-
porcionar un modo de eliminar los virus foráneos que se hallan pre-
sentes en cosechas de virus que se obtienen para la producción de va-
cunas, a la vez que se estabiliza el virus deseado, que sirve para
preparar la vacuna.

15 Hemos hecho el sorprendente descubrimiento de que los
cationes de metales bivalentes, como los cationes de magnesio, cal-
cio, zinc, cobalto o manganeso, en altas concentraciones, retardan
el deterioro de los Tipos 1, 2 y 3 de cepas atenuadas y virulentas del
virus de poliomiélitis a temperaturas comprendidas entre 0°C, y más
de 50°C., mientras que no alteran los indicadores d y t (ret/40°C.)
o las propiedades bajas de neurovirulencia en el mono, característi-
cas de las cepas atenuadas. Además, si bien la presencia de estos ca-
tiones de metales bivalentes estabilizan los virus RNA de la polie-
mielitis que son especialmente sensibles, no ejercen efecto estabili-
zante en los virus foráneos que se hallan presentes como contaminan-
tes en las suspensiones de virus que se obtienen de los cultivos en
riñón de mono, permitiendo así inactivar estos últimos. Y algo que
es muy sorprendente, hemos descubierto también que la estabilización
del virus RNA lograda por medio del catión bivalente es independien-
te del anión de la sal agregada.

25 De acuerdo con este aspecto el invento se lleva a la prác-
tica mediante adición de soluciones concentradas que contienen catio-
nes de metales bivalentes, especialmente de magnesio, en forma de clo-
30

271398



1961

5
10
ruro de magnesio, a las suspensiones del virus vivo deseado hasta que la concentración final sea por lo menos 0,4 molar, y, de preferencia 0,5 molar, aproximadamente, a soluciones saturadas. La suspensión de virus resultante puede utilizarse como vacuna de administración oral en esta forma, con otros aditivos o sin ellos, preservativos, extendedores u otros aditivos análogos, o bien puede tratarse con el fin de inactivar los virus foráneos que se hallen presentes, calentando la suspensión a una temperatura de 50°C. por espacio de una o dos horas y emplearse luego con los aditivos antes mencionados, o sin ellos, etc.

15
En relación con otro aspecto del invento, hemos hecho el sorprendente descubrimiento de que los cationes trivalentes atóxicos, por ejemplo, el aluminio trivalente, protegen también los tipos 1, 2 y 3 de virus atenuados de poliomielitis contra la inactividad térmica, sin alterar su viabilidad e infectividad. El aluminio trivalente se utiliza de preferencia en forma de cloruro de aluminio o de sulfato de aluminio, empleándose concentraciones finales de como 0,0001 molar a 0,1 molar.

20
25
30
En esta fase del invento, por ejemplo, cuando se agrega cloruro de aluminio a cepas de poliomielitis empleadas para vacunas de administración oral, de modo que la concentración del catión de aluminio trivalente sea de 0,0001 a 0,1 molar, la suspensión puede calentarse hasta una temperatura de 48°C. durante una hora, sin pérdida de la infectividad. A estas concentraciones, la sal trivalente aumenta el deterioro térmico de los virus que se hallan a veces presentes como contaminantes en las células de cultivos en tejidos vivos en que se desarrolla la cepa utilizada para la vacuna contra el virus de la poliomielitis. Esta fase del invento permite también la fácil destrucción de virus contaminadores foráneos en la suspensión de virus de poliomielitis.

271308



Por ejemplo, el cloruro de aluminio que se agrega da lugar a las concentraciones indicadas de las suspensiones de virus de poliomiелitis atenuado, preparadas en cultivos de riñón de mono, centáminadas con el virus vacuolante SV₄₀ y la suspensión resultante, calentada por espacio de una hora a la temperatura de 48°C destruye el virus vacuolante SV₄₀, dejando intacto y completamente infeccioso el virus de poliomiелitis que se desea utilizar.

En otra fase del invento hemos comprobado que las mezclas de cationes de metales bivalentes y de cationes de metales trivalentes atóxicos, cuando se agregan a suspensiones del virus vivo en cantidades suficientes para formar las concentraciones indicadas, producen suspensiones de virus de poliomiелitis estabilizado, exentas de virus foráneos viables distintos del de la poliomiелitis. A fin de suprimir los virus infecciosos foráneos, las suspensiones que contienen mezclas de cationes bivalentes y trivalentes puede dejarse a cualquier temperatura, hasta 50°C. durante períodos de más de una hora y utilizarse como vacuna de administración oral en esta forma, con otros aditivos, preservativos, extendedores y otros aditivos análogos, o sin ellos.

Los ejemplos que siguen se ofrecen con el fin de ilustrar el invento y no deben considerarse como limitativos del mismo, pudiendose efectuar muchas variaciones posibles sin apartarse del espíritu o alcance del invento.

EJEMPLO I

Se disolvió cloruro de magnesio (MgCl₂.6H₂O) en agua destilada, preparándose una solución 2 molar. La solución se esterilizó luego en una autoclave durante 15 minutos a 15 libras (1,054 kg./cm²) de presión. Cuando se hubo enfriado la solución, se mezcló un volumen igual de una cepa atenuada de virus de poliomiелitis adecuada para vacunas, con un volumen igual de la solución 2 molar, preparándose

271398



una suspensión de virus estabilizado, capaz de utilizarse como vacuna, que contenía cloruro de magnesio en una concentración 1 molar.

EJEMPLO II

5 Se calentó la vacuna del Ejemplo I a una temperatura de 50°C. y se mantuvo a esa temperatura por espacio de 1 hora, con lo que se inactivó el virus vacuolante infeccioso SV₄₀ que se hallaba presente como contaminante.

EJEMPLO III

10 Como en el Ejemplo I, se agregó una solución estéril de cloruro de magnesio 2 molar a una vacuna de virus vivos de poliomi-
15 elitis del tipo 2. Esta solución se agregó también a una vacuna de virus vivos de poliomi-
elitis del tipo 3 y a una mezcla de vacuna de virus de poliomi-
elitis de tipos 1, 2 y 3. Esto dió lugar a la esta-
bilización de las suspensiones de virus, capaces de utilizarse como vacunas y que contenían cloruro de magnesio en una concentración 1 molar.

EJEMPLO IV

20 Las suspensiones de virus estabilizado, las vacunas del Ejemplo III, se trataron en la forma que indica el Ejemplo II, con lo que se inactivó el virus vacuolante infeccioso.

EJEMPLO V

25 En este ejemplo, se agregó una solución estéril de cloruro de magnesio 1 molar, preparada como indica el Ejemplo I, a un volumen igual de las vacunas de virus de poliomi-
elitis de los Ejem-
plos I y II. Ello dió lugar a la estabilización de suspensiones de virus, utilizables como vacunas, que contenían cloruro de magnesio en una concentración 0,5 molar.

EJEMPLO VI

30 Las suspensiones de virus estabilizado, las vacunas del Ejemplo V, se calentaron en la forma indicada en el Ejemplo II, con lo que se inactivó el virus vacuolante infeccioso SV₄₀, presente co-

271398



mo contaminante.

EJEMPLO VII

5 En este ejemplo se diluyó 1 parte de las vacunas de los Ejemplos I y III con 10 partes de una solución saturada, estéril, de cloruro de magnesio, preparada en la forma que indica el Ejemplo I. Ello dió por resultado la estabilización de las suspensiones de virus, utilizables como vacunas, que contenían cloruro de magnesio en saturación de 10 a 11.

EJEMPLO VIII

10 Las suspensiones de virus estabilizado, las vacunas del Ejemplo VII, se trataron del modo que indica el Ejemplo II, con lo que se inactivó el virus vacuolante infeccioso SV₄₀, presente como contaminante.

EJEMPLO IX

15 En este ejemplo se prepararon soluciones estériles de sulfato de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de zinc, sulfato de manganeso y cloruro de cobalto, de acuerdo con las concentraciones y en las concentraciones indicadas y se agregaron a las vacunas de virus de poliomiелitis a que se refieren los Ejemplos I, III, V y VII. Se
20 obtuvo la estabilización de las suspensiones de virus, capaces de utilizarse como vacunas en las concentraciones indicadas.

EJEMPLO X

25 Las suspensiones de virus estabilizados, las vacunas del Ejemplo IX, se trataron como indica el Ejemplo II, e inactivaron el virus vacuolante infeccioso presente como contaminante.

Los volúmenes de vacuna de virus de poliomiелitis y de la solución de sal estabilizadora pueden variarse según se desee, siempre que la concentración final de la sal sea más de 0,4 molar.

30 Es significativo el hecho de que calentando la suspensión de virus estabilizado, es decir, la vacuna, se inactiva el virus va-

271398 21



cuolante infeccioso, ya que calentando la vacuna de virus de poliomi-
litis sin el catión de metal bivalente no se inactiva el virus vacuo-
lante infeccioso. La suspensión de virus de poliomiélitis puede calen-
tarse de 0°C a 50°C, o bien puede prescindirse del calentamiento, si
5 se desea. Al calentarse la suspensión de virus de poliomiélitis a
50°C, durante una hora, por lo menos, se inactiva el virus vacuolante
infeccioso, según se ha mencionado antes. De preferencia, a altas tem-
peraturas, como la de 50°C, el período de calentamiento no debe exoe-
der de dos horas, pues el calentamiento prolongado a tales temperatu-
10 ras produce pérdida de la eficacia de la suspensión de la vacuna. El
calentamiento a la temperatura de 50°C puede durar también de como
cinco minutos a una hora, pues una cantidad considerable de virus va-
cuolantes infecciosos se inactivan en cinco minutos. Se prefiere apli-
car el calentamiento a 50°C durante una hora más o menos, pues de
15 esa manera se logra la inactivación de los virus vacuolantes infec-
ciosos que se hallan presente como contaminantes, sin destruir la efi-
cacia de la suspensión de virus estabilizado.

EJEMPLO XI

Se disolvió cloruro de aluminio en agua destilada y se
20 filtró para preparar una solución estéril 0,2 molar. Se mezcló un
volumen igual de vacuna de tipo 1 de cepas de virus de poliomiélitis
atenuados, con un volumen igual de esta solución, lo que dió por re-
sultado la estabilización de la suspensión, utilizable como vacuna, que
contiene cloruro de aluminio a una concentración 0,1 molar.

EJEMPLO XII

25 Se calentó la vacuna del Ejemplo XI a una temperatura de
48°C y se mantuvo a esa temperatura durante una hora, con lo que se
inactivaron los virus vacuolantes infecciosos presentes como contami-
nantes.

271398



EJEMPLO XIII

5 Se agregó, como en el Ejemplo XI, una solución estéril de cloruro de aluminio 0,2 molar a la vacuna de virus vivos de poliomiélitis de tipo 2 y también a la vacuna de virus vivos de poliomiélitis de tipo 3 y a una mezcla de vacunas de virus de poliomiélitis de tipos 1, 2 y 3. Se obtuvo la estabilización de las suspensiones de virus, utilizables como vacunas, que contienen una concentración de cloruro de aluminio 0,1 molar.

EJEMPLO XIV

10 Las suspensiones de virus estabilizado, las vacunas del Ejemplo XIII, se trataron según el procedimiento del Ejemplo XII, con lo que se inactivó el virus vacuolante infeccioso presente como contaminante.

EJEMPLO XV

15 En este ejemplo, se agregó cloruro de aluminio en una concentración 0,0002 molar y también en una concentración 0,2 molar, a vacunas de virus vivos de poliomiélitis, según se describe en los Ejemplos XI a XIV, inclusive. Ello dió por resultado la estabilización de suspensiones de virus capaces de utilizarse como vacunas,
20 que contenían concentraciones de cloruro de aluminio de 0,0001 y 0,1 molar utilizables como vacunas y cuando se trataron de la manera expuesta, las vacunas estaban exentas del virus vacuolante infeccioso SV₄₀. A una concentración 0,04 molar o mayor, se inactivó el virus vacuolante SV₄₀, dejando permanecer la suspensión de virus a
25 temperaturas inferiores de 48°C.

EJEMPLO XVI

30 En este ejemplo se empleó sulfato de aluminio en vez de cloruro de aluminio de los Ejemplos XI a XV en las concentraciones indicadas. Ello dió por resultado la estabilización de suspensiones de virus utilizables como vacunas en las mismas concentraciones indi

271338



oadas, y cuando se calentaron en la forma descrita, inactivaron el virus vacuolante infectivo.

EJEMPLO XVII

5 En este ejemplo se agregó una mezcla de los cationes bivalentes y trivalentes de los ejemplos anteriores, en las concentraciones indicadas, en proporciones iguales, a las vacunas de virus de poliomielitis de que se habla en los ejemplos anteriores y de acuerdo con los mismos. Ello dió por resultado la estabilización de suspensiones de virus, utilizables como vacunas, en concentraciones de 10 0,0001 a 0,1 molar de aluminio, y de 0,4 molar hasta la saturación de magnesio, calcio, zinc, manganeso y cobalto. También en este caso se inactivaron los virus vacuolantes infecciosos al someterse las mezclas de virus y sales a temperaturas de 50°C o más bajas, por ejemplo 25°C durante una hora.

15 Así, pués, pueden utilizarse también cationes trivalentes, solos o combinados con cationes bivalentes, para proporcionar vacunas estabilizadas, exentas de virus contaminantes inconvenientes.

20 Si bien para los fines de esta exposición, la memoria descriptiva se ha dirigido principalmente a la estabilización de virus de poliomielitis y de las vacunas con ellos preparadas, pueden estabilizarse otros virus RNA en las condiciones expuestas; por ejemplo, los virus Coxsackie, los virus ECHO y los Reovirus.

25 El presente invento es por lo tanto adecuado y se adapta para poner en práctica los objetos indicados y posee las ventajas mencionadas, así como otras ventajas que le son inherentes.

REIVINDICACIONES

En resumen: la Patente de Invención cuyo registro se solicita recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

30 1. Un método de preparar una vacuna estable de virus vivos, caracterizado por el hecho de agregarse a una suspensión de

271398



5 virus vivos que contienen RNA (ácido ribonucleico) ²¹ con sal soluble escogida de entre el grupo que consiste en un catión de un metal bivalente, a una concentración final de por lo menos 0,4 y un catión atóxico de un metal trivalente, a una concentración final de como 0,0001 a como 0,1 molar.

2. El método, según se expone en la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la suspensión de virus vivos RNA es una suspensión de virus de poliomielititis.

10 3. El método expuesto en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que la vacuna de virus resultante se calienta a una temperatura no mayor de 50°C por un período de tiempo suficiente para inactivar los virus foráneos, y detener luego el calentamiento.

15 4. El método expuesto en la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que se emplea un catión de un metal bivalente escogido de entre el grupo que abarca el magnesio, calcio, zinc, cobalto y manganeso.

20 5. El método expuesto en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que se emplea un catión de un metal bivalente en una concentración final, de 0,5 molar hasta la saturación.

25 6. El método expuesto en la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que se emplea un catión trivalente atóxico, escogido de entre el grupo que consiste en cloruro de aluminio y sulfato de aluminio.

30 7. El método expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 6, caracterizado por el hecho de que se emplea un catión trivalente atóxico y se calienta la vacuna de virus resultante a una temperatura no mayor de 48°C por un período de tiempo suficiente para inactivar los virus foráneos, suspendiéndose luego el calenta-



271398 21 OCT

miento.

8. El método expuesto en las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por el hecho de agregarse una mezcla de la sal soluble de un catión bivalente y de un catión trivalente atóxico.

5 9. Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención cuyo registro se solicita:
"UN METODO DE PREPARAR UNA VACUNA ESTABLE DE VIRUS VIVOS".

Todo conforme queda descrito en la presente Memoria que consta de trece páginas mecanografiadas.

Madrid, 21 de octubre 1961

ALFONSO UNGRIA

PP
[Handwritten signature]