

PATENTE DE INVENCION

Your ref: 8998.

30 5277



*Memoria Descriptiva*  
*sobre*

"Procedimiento de preparación de una composición  
inyectable que contiene material antigénico"

*Solicitante:* NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION, entidad  
inglesa, residente en 1, Tilney Street, Londres, -  
W.1., Inglaterra.

Esta invención se relaciona con composi -  
ciones inyectables y mas particularmente con vacu-  
nas, formuladas como emulsiones empleando un coad-  
yuvante oleoso.

5. Se conoce la preparación de vacunas en -



30 5277

- forma de emulsiones de agua en aceite en las que el an  
tígeno está contenido dentro de la fase dispersa acuosa y tales vacunas con coadyuvantes se emplean ahora -  
tanto en medicina como en veterinaria. Las vacunas con
5. coadyuvantes son frecuentemente preferidas a las vacunas simples en forma de solución acuosa o suspensión -  
de antígeno, porque es posible conseguir el deseado -  
efecto inmunológico con una cantidad mas pequeña de an  
tígeno. Sin embargo, las vacunas con coadyuvantes en -
10. forma de emulsiones de agua en aceite son líquidos extremadamente viscosos y en la práctica no se envasan -  
en recipientes de dosis múltiples debido a la dificultad de extraer tales emulsiones del recipiente. Por -  
consiguiente, las vacunas con coadyuvantes en esta for  
ma se distribuyen ordinariamente en jeringas desechables o inserciones para jeringas, pero el uso de tales artículos desechables es costoso.

- Se ha descubierto ahora que los problemas de viscosidad asociados a las vacunas de emulsiones de -  
agua en aceite pueden vencerse y evitarse la necesidad
20. de recipiente desechables si la vacuna con coadyuvantes se prepara en forma de emulsión múltiple. Las emul  
siones múltiples se obtienen a veces cuando se somete una emulsión a condiciones de inversión y difieren de
25. las emulsiones ordinarias en que los glóbulos de la fa  
se dispersa contienen glóbulos mas pequeños de otra -  
fase dispersa dentro de ellos. Esta fase dispersa se  
cundaria, como es sabido, es normalmente el mismo componente que la fase continua, pero está por supuesto -
30. físicamente separada de la fase continua. Se han indi-

30 5277



5. cado también emulsiones múltiples que contienen fases dispersas terciarias y cuaternarias. Tales fases dispersas terciarias y cuaternarias se dispersan en las fases dispersas secundarias y terciarias respectivamente y presentar la forma de glóbulos que tienen diámetros extremadamente pequeños.

10. La presente invención proporciona una composición inyectable que contiene material antigéno - comprendiendo una emulsión múltiple aceite/agua en la que la fase continua es acuosa y la fase dispersa primaria es una fase oleosa en la que se dispersa una fase acuosa que contiene al material antigéno.

15. Las composiciones inyectables de la invención pueden prepararse a partir de cualquiera de los componentes ordinariamente empleados cuando se forman materiales antigénos con coadyuvantes oleosos, por ejemplo como vacunas. Así, la fase acuosa en la que ha de disolverse o suspenderse el material antigéno puede ser una solución salina fisiológica u otros medios -  
20. acuosos, tales como neutralizador fosfático o incluso agua destilada, dependiendo del uso a que haya de destinarse la composición final. El coadyuvante oleoso - puede ser cualquiera de los aceites minerales terapéuticamente aceptables que se emplean ya en la preparación de las conocidas vacunas de emulsión de agua en  
25. aceite. Ejemplos de tales aceites son el Drakeol 6VR y Bayol F. También es posible emplear ciertos aceites vegetales, tales como el de araquis.

30. Los aceites minerales son no metabolizables y en el caso de las conocidas vacunas por emulsión de



agua en aceite un depósito de vacuna tiende a permanecer en el punto de la inyección inmediatamente por debajo de la piel, lo cual produce con frecuencia al paciente cierta incomodidad. En el caso de las composiciones por emulsión múltiple, sin embargo, el aceite se dispersa en la fase acuosa continua y resulta disperso con gran rapidez en el organismo del paciente. Otra ventaja de las composiciones en emulsión múltiple es la posibilidad de emplear un volumen mínimo de aceite, justamente el suficiente para encerrar al material antígeno, mientras que el volumen total del material inoculado es todavía conveniente para su inyección mediante técnicas normales.

De acuerdo con otro aspecto de la invención,

15. un procedimiento de preparación de una composición inyectable que contiene material antígeno comprende la formación de una emulsión múltiple de aceite/agua en la que la fase continua es acuosa y la fase dispersa - primaria es una fase oleosa en la que se dispersa una

20. fase acuosa conteniendo material antígeno. Estas composiciones en emulsión múltiple pueden prepararse sometiendo una mezcla de (1) una emulsión de agua en aceite conteniendo material antígeno en la fase acuosa, - (2) un medio acuoso y (3) un agente emulsionador del

25. tipo que favorece la formación de emulsiones de aceite en agua, a condiciones de emulsión. Adecuados agentes emulsionadores incluyen a los compuestos de polietilén-éter no iónicos, tales como el "Tween 80" y las diversas gomas, tales como de acacia y arábica.

30. Para producir las composiciones de la inven-

30 00 17

24



- ción puede emplearse un método de preparación de emulsiones, por ejemplo puede pasarse la mezcla emulsionada a través de un homogeneizador mecánico o bien puede someterse a vibraciones ultrasónicas o someterse a las
5. necesarias fuerzas mecánicas pasando repetidamente la mezcla a través de una aguja hueca de taladro estrecho situada en el extremo de una jeringa, aunque este último método es evidentemente aplicable solo a una preparación a escala de laboratorio. En todos los casos, es
10. ordinariamente deseable que los componentes sean previamente mezclados, preferiblemente evitando la aireación, pasándolos luego directamente al emulsionador. La mezcla puede pasarse a través de cualquiera de los
15. emulsionadores mecánicos comerciales obtenibles, por ejemplo una máquina Weir o Guisti, con adecuadas precauciones para asegurar la esterilidad.

En el caso de emulsionado por vibración ultrasónica, la mezcla se enfría preferiblemente en hielo a 0°C. aproximadamente y se somete luego a una serie de

20. estallidos intermitentes de vibraciones entremezclados con vigorosa agitación. Han resultado ser adecuados - unas vibraciones ultrasónicas de una frecuencia del orden de 18.000 a 20.000 cps.

La estabilidad de la emulsión múltiple depende en cierto grado de la relación entre la emulsión de

25. agua en aceite y el medio acuoso y se obtienen los resultados mas satisfactorios cuando esta relación es - del orden de 3:1 a 1:10 sobre una base de volumen/volumen: usando por ejemplo las técnicas de vibración ultrasónica con una relación de 1:9 y empleando las técnicas

30.



mecánicas con una relación de 2:1, se han obtenido productos estables en los que no hay ninguna disminución en la respuesta anticuerpo incluso después de un almacenamiento prolongado, por ejemplo de 3 a 4 meses a -

5. temperaturas elevadas, por ejemplo de 37°C.

Se ha observado que las emulsiones en las que el diámetro medio de los glóbulos de aceite dispersos es de 10 a 50 micras y particularmente de 10 a 20 micras, medido mediante fotomicroscópica, son particu-

10. larmente deseables desde el punto de vista de la estabilidad e inmunogénico. En tales casos, el diámetro medio de la segunda fase acuosa dispersa es preferiblemente del orden de una a 7 micras, siendo esto particularmente conveniente cuando el material antigénico es de  
15. origen toxoide, rickettsiano o viral.

La cantidad de agente emulsionador necesaria para producir unos resultados óptimos depende de la relación entre la emulsión de agua en aceite y la fase acuosa, estando también influida en cierto modo por la  
20. cantidad de agente emulsionador presente en la emulsión original de agua en aceite, que naturalmente favorece la formación de emulsiones de agua en aceite. Es preferible que la cantidad de agente emulsionador sea tal que la potencia emulsionadora de dos agentes sea  
25. aproximadamente equivalente y la cantidad del segundo emulsionador, que favorece la formación de emulsiones de aceite en agua, será normalmente del orden del 0,25 al 5 % v/v, basado en el medio acuoso.

La estabilidad de las emulsiones se ha observado que puede mejorarse mediante la adición de agar y  
30.

30 5977



5. en los casos en los que se propone almacenar las composiciones durante prolongados periodos, es con frecuencia ventajoso incorporar en la composición aproximadamente un 1% p/v de agar, basado en el medio acuoso.

10. La emulsión original de agua en aceite que contiene al material antígeno a partir de la cual se produce la emulsión múltiple, puede prepararse por las técnicas conocidas y es con frecuencia conveniente emplear los mismos o similares homogeneizadores mecánicos para preparar ambas emulsiones, aunque los ajustes que controlan el lapso de emulsionado serán normalmente diferentes. Es preferible usar una concentración de material antígeno superior a la normal en la fase acuosa en la formulación de la emulsión de agua en aceite, de manera que el volumen de dosificación de la emulsión múltiple terminada pueda mantenerse bajo hasta el nivel normal. Como en un caso particular se conoce la relación entre emulsión de agua en aceite y fase acuosa, puede calcularse la concentración apropiada de material antígeno en la fase acuosa original.

25. El aceite mineral Drakeol 6VR se usa normalmente para preparar emulsiones inyectables de agua en aceite, siendo completamente adecuado para preparar la emulsión a emplear en la formación de las composiciones en emulsión múltiple. Un adecuado emulsionador, que favorece la formación de emulsiones de agua en aceite, es el Arlacel A y para los presentes fines puede emplearse en una proporción del 5 al 15% v/v

30 5274



aproximadamente, basado en el aceite.

La presente invención puede aplicarse a la formulación de todos los tipos de materiales antígenos cuya respuesta inmunogénica sea acentuada por la presencia de coadyuvantes oleosos. El material antígeno no puede ser pues un alérgeno o un material de origen toxoide, viral o bacteriano. El material antígeno puede derivar también de organismos clasificados dentro de otros grupos o subgrupos de estos tipos principales, por ejemplo organismos micoplasmáticos o richettsiano o tracomas. Típicos de los materiales antígenos que pueden formularse en las composiciones por emulsión múltiple de la invención, son los siguientes:

15. Antígenos bacterianos:

Bordetella pertussis

Salmonella antigens, tal como tifoide y paratifoide

20. Shigella antigens, tal como Shigella dysenteriae

Erucella abortus (viva y muerta)

P. pestis, como sustancia envolvente

Cholera

Chlostridial antigens

25. Antígenos micoplasmáticos  
(P.P.L.O.)

Pleuronemonia bovina contagiosa

Antígenos richettsianos

Tifus murídico

30. Fiebre localizada de las Montañas Rocosas

Antígenos virales

30 5277



- Influenza
- Sarampión
- Adenovirus
- 5. Poliomielitis
- Encefalitis Jap. B.
- Enfermedad del pie y la boca (fiebre aftosa)
- Peste bovina
- 10. Enfermedad de Newcastle

Antígenos toxoides

- Tétanos
- Difteria
- Botulinus
- 15. Sabido es que ordinariamente es muy ventajoso formular materiales antígenos derivados de los organismos mas pequeños, por ejemplo antígenos toxoides y virales, con coadyuvantes oleosos, lo cual es aplicable a la presente composición. No es esencial em -
- 20. plear sin embargo antígenos desmenuzados y en el caso de los antígenos bacterianos, por ejemplo, es con frecuencia ventajoso disociar la pared bacteriana y extraer y usar el antígeno activo. También es posible formular dos o mas materiales antígenos en la misma -
- 25. composición de emulsión múltiple y obtener una respuesta aceptable a cada antígeno.

- Como se menciona anteriormente, la producción de las composiciones en emulsión múltiple puede controlarse mediante técnicas fotomicroscópicas para
- 30. asegurarse de que la emulsión es en efecto múltiple y

30 12 1962

24 OCT 1962



que no ha tenido lugar ninguna inversión que produzca una emulsión ordinaria de aceite en agua. Mediante tales técnicas, puede controlarse la duración y naturaleza del procedimiento de emulsionado para asegurarse de que tiene lugar el deseado grupo de dispersión y de que no se produce una indebida extensión o esparcimiento de tamaños en los diámetros de los glóbulos de aceite, pues ello puede producir con frecuencia un desnatado.

10. La estabilidad de las composiciones en emulsión múltiple ha sido demostrada mediante el uso de un antígeno etiquetado para mostrar que no hay fuga de material antígeno de la fase acuosa dispersa, lo cual se describe con detalle en el siguiente ejemplo 3. También se ha demostrado la estabilidad con antígenos toxoides empleando placas de difusión "cuchterlony" en las que el pozo central contiene una antitoxina y los pozos exteriores contienen a la composición en emulsión múltiple y a las diversas composiciones de control.

25. Las composiciones o emulsión múltiple de la invención han sido sometidas al ensayo con ratón Berlin ("Annals of Allergy", 1962, 20, nº 7, 472-9) y las composiciones han demostrado satisfacer los requisitos de seguridad establecidos por aquel ensayo.

A fin de que la invención pueda comprenderse más plénamente, se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar la formulación de varios materiales antígenos en forma de emulsión múltiple.

30.



30 5277

EJEMPLO 1.

Este ejemplo muestra el uso de ovalbúmina como antígeno modelo.

- Se mezclan 9 partes de un aceite mineral -
5. "Drakel 6VR" con una parte del emulsionador "Arlacel -  
A". La ovalbúmina, purificada mediante cromatografía -  
de cambio iónico, se disuelve en un ml de salina al  
0,85% y se rocían porciones de esta en un ml de la mez  
cla oleosa a través de una aguja con un taladro de -
10. 0,5 mm desde una jeringa. Se recircula la mezcla a tra  
vés de la jeringa varias veces entre adiciones. Cuando  
se ha incorporado toda la solución antigénica en la emul  
sión, se ensaya goteando una porción de la misma en -  
agua helada para asegurar que es una perfecta emulsión
15. de agua en aceite.

- Se colocan 18 ml de salina normal en una am  
polla de plástico de pared delgada tapada y se añade -  
aproximadamente 0,2 ml del emulsionador "Tween 80" -  
(grado de cultivo T.B.). Se agita la mezcla y se vier  
ten dos ml de la emulsión de agua en aceite en la mis  
ma, se cubre la ampolla y se agita el conjunto. Esto -  
efectúa cierta dispersión de la emulsión de agua en -  
aceite en pequeñas gotas que rápidamente suben a la su  
perficie. Luego se rodea la ampolla con hielo y se in  
troduce la sonda de un desintegrador ultrasónico de la  
boratorio en la ampolla. Se ajusta la frecuencia de vi  
bración en 18.000 a 20.000 cps para dar una máxima agi  
tación al contenido. Al cabo de unos 5 a 10 segundos -  
se retira la ampolla y se agita a mano para dispersar
- 25.
30. cualesquiera gotas grandes que hayan subido a la super

30 5277



ficie. Se repiten alternativamente el tratamiento ultrasónico y la agitación unas 3 a 5 veces, hasta que resulta un producto uniforme lechoso. Luego se com - prueba el material bajo el microscopio para asegurarse

- 5. se de que se ha formado la emulsión correcta. La emulsión múltiple así formada es un líquido móvil diluido que fluye como el agua y puede tomarse fácilmente en una jeringa a efectos de inyección. La original emulsión de agua en aceite, por otra parte, es un líquido viscoso espeso cremoso que fluye solo a un ritmo extremadamente lento. La emulsión simple de agua en aceite y la emulsión múltiple fueron ensayadas en ratones a los que se inyectó, en grupos de 10, con equivalentes dosis de manera que cada ratón recibiese dos mg de ovalbúmina. La respuesta anticuerpo se determino mediante el ensayo de aglutinación celular bronceada en los sueros y los resultados comparativos (títulos medios geométricos) se muestran en la siguiente tabla:

Días	10	15	20	30	40	50	60	70	100	200
Vacuna en emulsión de agua - en aceite.	0.6	10	80	210	470	650	940	1,000	790	750
Vacuna en emulsión múltiple	2.3	40	150	740	1.700	2.800	4.100	4.800	4.000	1.800

30 5277



- Estos resultados demuestran que empleando ovalbúmina antigéna modelo, la vacuna por emulsión múltiple provoca una respuesta de anticuerpos bastante mejor en ratones a como lo hace la vacuna comparable de...
5. emulsión de agua en aceite. Si a efectos comparativos se inyectase un grupo similar de ratones con 2 mg de ovalbúmina, cada uno en una solución salina sólomente, los máximos títulos de anticuerpos no habrían alcanzado ni siquiera una unidad.
10. EJEMPLO 2.  
Vacuna de la influenza.  
Se prepara la vacuna empleando una vacuna para la gripe de salina comercialmente obtenible, "Munevan" como fuente del material antigéno. El "Munevan" contiene
15. 3 razas virales, A2/Singapore/1/57, A2/England/1/61 y B/England/939/59, que son exterminadas con formalina.
- La emulsión inicial de agua en aceite se prepara diluyendo un volumen de "Munevan" con 10 volúmenes de salina normal y rociando luego la vacuna diluída en un
20. volumen igual de aceite y emulsionador (Drakeol 6VR, 9 volúmenes, y Arlacel A, 1 volumen). La vacuna salina se incorpora en el aceite usando una jeringa hipodérmica con aguja de 0,5 mm de taladro, cuya punta se mantiene jústamente debajo de la superficie del aceite. El volumen total de vacuna de salina se añade en unas 5 porciones, agitándose vigorosamente la mezcla entre cada adición. Cuando se han efectuado dos o tres adiciones, se toma toda la mezcla en una jeringa a través de una aguja de un mm de taladro y se fuerza al exterior de nuevo a
25. través de una aguja de 0,5 mm de taladro. Luego se añade
- 30.



30 5277

- otra cantidad de vacuna de salina y se repite el anterior procedimiento hasta que se incorpora toda la vacuna de salina en el aceite. Finalmente, se somete la emulsión de agua en aceite a dos estallidos de vibración ultrasónica de 5 segundos a 20.000 cps aproximadamente, manteniéndose la emulsión en un recipiente enfriado con hielo, en el que se coloca la sonda ultrasónica. En esta etapa, la emulsión de agua en aceite es muy espesa y casi imposible de verter.
5. Se repite el anterior procedimiento para preparar una segunda emulsión de agua en aceite, con la excepción de que el "Munevan" se diluye con 3.3 volúmenes de salina normal. La resultante emulsión de agua en aceite es de nuevo muy viscosa e imposible de verter.
10. Se añade un volumen de esta emulsión de agua en aceite a dos volúmenes de "Tween 80" al 1% v/v en salina normal, se agita vigorosamente la mezcla y se somete luego a vibración ultrasónica intermitente (20.000 cps), durante un periodo total de unos 20 segundos. Se enfría de nuevo la emulsión en hielo durante la vibración ultrasónica y el producto resultante es una emulsión múltiple estable que tiene una viscosidad análoga a la del agua. Se examina la emulsión bajo el microscopio para confirmar que es múltiple y que se ha obtenido un grado adecuado de dispersión de la fase dispersa de agua en aceite.
20. La dilución del "Munevan" es tal que 0,2 ml. de la emulsión de agua en aceite terminada y emulsión múltiple contienen cada una de ellas 75 unidades HA de A2/Singapore/1/57 y 25 unidades HA de A2/England/1/61.

25. La dilución del "Munevan" es tal que 0,2 ml. de la emulsión de agua en aceite terminada y emulsión múltiple contienen cada una de ellas 75 unidades HA de A2/Singapore/1/57 y 25 unidades HA de A2/England/1/61.

30.

30 5277



Se inocularon subcutáneamente 2 grupos de 6 ratones cada uno con 0,2 ml de vacuna de emulsión de agua en aceite o de emulsión múltiple y se tomaron muestras de suero individuales inicialmente y en los días vigésimo-primo y trigésimo-quinto. Se titularon los sueros para determinar los anticuerpos inhibidores de hemoaglutinación mediante una modificación del método de placa plástica de la Organización Mundial de Salud empleando 4 - unidades HA del virus A2/Singapore/1/57. Los títulos medios geométricos se muestran seguidamente:

	D i a s		
	0	21	35
Emulsión de agua en aceite.	18,3	13,6	31,7
Vacuna en emulsión múltiple	13,6	40,0	100,0

Un exámen autópsico (día cuadragésimo-sexto) del punto de la inoculación mostró que en ratones tratados con emulsión de agua en aceite, había de 1 a 3 grandes depósitos de la emulsión, mientras que los tratados con vacuna en emulsión múltiple presentaban sólo algunas pequeñas gotas que parecían ser enteramente de aceite.

La vacuna en emulsión múltiple resultó ser totalmente estable al cabo de 14 semanas de almacenamiento a 4°C.



30 5277

EJEMPLO 3.

- A fin de demostrar la estabilidad de la vacuna en emulsión múltiple y en particular que el material antigéno quedaba retenido en la fase acuosa dispersa secundaria y no pasaba a la fase acuosa continua, se preparó una serie de vacunas en emulsión múltiple conteniendo albúmina de suero bovino como antigéno modelo. Se etiquetó el material antigéno con fluoresceína de manera que pudiese observarse el movimiento, si lo había, de material antigéno bajo el microscopio ultravioleta.
5. La emulsión inicial de agua en aceite se prepara mediante el método de la jeringa descrito en el ejemplo 2, incorporado una suspensión salina de albúmina de suero bovino (1 %) en una solución al 10% v/v de Arlacel A en Drakeol 6 VR. Mas adelante se muestran las diversas proporciones empleadas entre salina y aceite. La resultante emulsión espesa de agua en aceite, imposible de verter, se convierte luego en una emulsión múltiple mezclando un volumen de la emulsión de agua en aceite con
10. 9 volúmenes de salina normal conteniendo "Tween 80" como emulsionador (el porcentaje de Tween se muestra en la siguiente tabla) y sometiendo la mezcla fría a estallidos de vibraciones ultrasónicas intermitentes hasta que se obtuvo el deseado grado de dispersión.
15. En todos los casos, las vacunas en emulsión múltiple son líquidos lechos que fluyen con gran facilidad y pueden introducirse en jeringas con la misma facilidad que las vacunas de salina. Las vacunas en emulsión múltiple se almacenaron a 56°C. durante periodos de hasta 4 meses y se examinaron bajo el microscopio
20. 25. 30.

30 5277

24



ultravioleta para ver si algún material antigéno ete-  
tado había pasado a la fase acuosa continua. Las vacu-  
nas en emulsión múltiple resultaron ser extremadamente  
estables a esta elevada temperatura, como muestra la si-  
guiente tabla.

Tween %	Relación agua:acei- te v/v en la emul- sión primaria.	Estabilidad a 56°C.			
		1 mes	2 meses	3 meses	4 meses
1	1 : 1	N.L.	N.L.	N.L.	S.L.
1 †	1 : 1	N.L.	N.L.	N.L.	N.L.
1	1 : 3	N.L.	N.L.	N.L.	N.L.
1 †	1 : 3	N.L.	N.L.	N.L.	N.L.
4	1 : 1	N.L.	N.L.	N.L.	N.L.
4 †	1 : 1	N.L.	N.L.	N.L.	S.L.
4	1 : 3	N.L.	N.L.	S.L.	L.
4 †	1 : 3	N.L.	N.L.	S.L.	L.

† Estas composiciones contienen un 1%  
p/v de agar.

N. y L. = Sin fuga.

S. y L. = Ligera fuga.

L. = Fuga

En un caso, se formó la vacuna en emulsión -  
múltiple pasando la mezcla emulsionada de emulsión de  
agua en aceite/salina a través de un homogeneizador me-  
cánico. El homogeneizador usado es una cremadora domés-  
tica "Bel" modificada, en la que la mezcla a emulsionar



30 5277

se fuerza a través de un cilindro y al exterior a través de una pequeña abertura situada en el extremo del cilindro, bajo la acción de un pistón manualmente accionado.

- 5. Esta composición se dejó durante 5 meses entre 18 y 20°C. en una ampolla siliconizada sin descomponerse.

EJEMPLO 4.

- 10. Este ejemplo ilustra el uso de ovalbúmina como antígeno modelo y el empleo de acacia como agente emulsionador secundario.

- 15. Se prepara primeramente una espesa emulsión de agua en aceite rociando una solución de ovalbúmina purificada en salina normal sobre una mezcla oleosa que contiene 9 volúmenes de Drakeol 6VR y un volumen de Arlacel A. Esta emulsión primaria se prepara forzando porciones de salina en el aceite a través de una aguja de 0,5 mm de taladro con recirculación intermitente y sometiendo a vibración ultrasónica como se describe en el ejemplo 2, hasta que se incorpora toda la salina en el aceite. El producto es entonces una masa espesa imposible de verter, que contiene 20 mg de ovalbúmina por ml.

- 25. Se prepara una solución de acacia disolviendo 0,2 gramo de acacia B. F. en 2 ml de salina normal sobre un baño de agua a 56°C. y a esto se añade después de enfriarse a la temperatura ambiente un volumen igual de la emulsión espesa de agua en aceite. Se agita vigorosamente la mezcla y se enfría luego a 0°C, sometiendo se a una serie de estallidos de vibración ultrasónica -
- 30.

30 5277



de 5 a 10 segundos (20.000 cps) y vigorosa agitación, -  
alternativamente. Después de un total de unos 20 segun-  
dos de vibración ultrasónica, el producto es una emul -  
sión múltiple estable, como se demuestra por exámen mi-  
croscópico, que tiene una viscosidad análoga a la del  
5. agua y no muestra señal alguna de inversión, incluso al  
almacenarse durante 3 a 4 meses a 37°C. Esta emulsión -  
múltiple produce una aceptable respuesta de anticuerpos  
cuando se inyecta subcutáneamente en ratones.

10. EJEMPLO 5.

Vacuna de tétanos.

Se emplea como fuente de material antigéno -  
una solución de toxoide del tétanos diluída con una sa-  
lina neutralizadora de fosfato de Glaxo  $\frac{m}{100}$  (PBS)  
15. que contiene un 0,013 % de mertiolato  
(Thiomersal B.P., un agente antibacteriano) para dar  
una solución que contiene 200 unidades LF de toxoide -  
por ml. Se añaden 100 ml de esta solución a gotas a 100  
ml de una mezcla 9:1 v/v de Drakeol SVR/Arlacel A, con-  
20. tenida en un pequeño cono Giusti y se premezclan cuida-  
dosamente los componentes en este cono con una espátula  
destinada a evitar la formación de torbellinos y airea-  
ción en la mezcla. Esta se deja pasar luego a un homoge-  
neizador mecánico Giusti que se fija para que funcione  
25. a la velocidad 2 con un ajuste Clayton de 2. Se recogen  
aproximadamente 50 ml de la emulsión espesa de agua en  
aceite imposible de verter y se almacenan a 4°C.

Se prepara la solución de Tween-salina discl-  
viendo un 2% v/v de "Tween 80" en Glaxo PBS, esterili -  
30. zando y agitando el líquido mientras se enfría para

30 5277



evitar la precipitación. Cuando la solución está fría, se añade mertiolato para dar una concentración final - del 0,013%. Se mezclan luego 80 ml de esta solución sa lina con 160 ml de la solución espesa de agua en aceite descrita en el último párrafo. Esta mezcla se agita vi gorosamente para dispersar el aceite, y luego se premez cla en el cono Giusti y se pasa al homogeneizador, que se pone entonces en funcionamiento a la velocidad 2, - con un ajuste Clayton de 3,5. Se recogen 250 ml de un

5. líquido lechoso móvil que tiene una viscosidad análoga a la del agua. La composición, que contiene ahora 8 uni dades LF de toxoide por dosis de 0,25 ml, se examina ba jo el microscopio para confirmar que se ha obtenido la deseada emulsión múltiple.

10. La respuesta de anticuerpos a esta vacuna se determina mediante inyección subcutánea de porciones de 0,25 ml en 10 cerdos de Guinea. El título de antitoxina del tétanos se determinó al cabo de 4 semanas como si - gue:

20.	1 animal	8,0 unidades/ml		
	4 "	16,0	" "	
	3 "	32,0	" "	
	1 "	64,0	" "	
	1 "	>64,0	" "	

25. Se inyectaron otros 8 cerdos de Guinea después de que la vacuna había sido almacenada durante 6 meses a 4°C. Los títulos de antitoxinas 4 semanas después de la inyección fueron como sigue:

30 5277



1 animal	8,0 unidades/ml		
1 "	16,0	"	"
5 "	32,0	"	"
1 "	64,0	"	"

5. EJEMPLO 6.

Vacuna de la enfermedad de Newcastle.

Se emplea como fuente de material antigéno un fluido de cultivo de tejido del Glaxo Laboratory que contiene 3 veces la concentración normal de virus de la enfermedad de Newcastle usada en vacunas acuosas. Se añaden léntamente 50 ml del fluido de cultivo de tejido concentrado a 50 ml de una mezcla 9:1 v/v de Drakeol 6VR y Arlacel A. Luego se premezcla la mezcla en el cono de Giusti y se pasa a través del homogeneizador a la velocidad 2 y ajuste Clayton 2, como se describe en el ejemplo 5, para dar la emulsión espesa de agua en aceite. Luego se mezclan 2 volúmenes de esta emulsión con un volumen de la mezcla "Tween" /PBS descrita en el ejemplo 5 y se premezcla la mezcla en el cono y se pasa a través del homogeneizador a la velocidad 2 con el ajuste Clayton a 3,5.

La vacuna de emulsión múltiple lechosa que se recoge tiene una viscosidad análoga a la del agua y puede introducirse fácilmente en una jeringa a través de una aguja. El factor de dilución en el concentrado original es triple, de manera que el volumen de dosificación para la vacuna en emulsión múltiple es el volumen de dosificación habitual para las vacunas acuosas.

EJEMPLO 7.

30. Vacuna de la influenza.



Se repite el procedimiento de preparar primero una emulsión espesa de agua en aceite y luego una emulsión múltiple móvil descrito en los ejemplos 5 y 6, usando como fuente de material antigénico un concentrado de una vacuna de influenza acuosa. Esta vacuna acuosa contiene las siguientes razas: A/Singapore/1/64; para dar 18.000 unidades HA por ml, A/England/1/64, para dar 6.000 unidades HA por ml, B/England/939/59, para dar 12.000 unidades HA por ml y B/Taiwan/4/62, para dar 6.000 unidades HA por ml.

La vacuna por emulsión múltiple móvil produce una respuesta satisfactoria de anticuerpos y tiene una concentración tal que su volumen de dosificación es equivalente al de las vacunas coadyuvantes de agua en aceite comercialmente obtenibles.

EJEMPLO 8.

Este ejemplo ilustra la formación de 7 diferentes materiales antígenos en una vacuna en emulsión múltiple mediante las técnicas de homogeneizador mecánico descritas en los ejemplos 5 a 7. El medio acuoso que contiene al material antigénico se prepara mezclando los diversos antígenos seguidamente enumerados en las cantidades mencionadas, con una pequeña cantidad de la solución salina neutralizadora de fosfato Glaxo. La Berdetella pertussis se añade al final. Las cantidades se seleccionan de manera que la vacuna por emulsión múltiple final posea el aceptable volumen de dosificación de dosificación de 0,25 ml.



30 5277

Componentes de la fase acuosa.

mls

1.	Bordetella pertussis, a 40 x 10 <sup>9</sup> organismos/ml	25,0
2.	Tétanos a 1.000 unidades LF/ml	3,37
5.	3. Difteria a 6.800 unidades LF/ml	1,96
	4. Polio I a 85 unidades D/ml x 100 ml	98,1
	5. Polio II a 10 unidades D/ml x 100 ml	100,0
	6. Polio III a 10 unidades D/ml x 100 ml	100,0
	7. Sarampión (tratado con éter) a 100 unidades HA/ml x 100 ml	50,0
10.	Salina neutralizadora de fosfato	<u>38,6</u>
	Total .....	417,0

Esta fase acuosa que contiene al material an  
tígeno se formula luego primeramente en una emulsión -  
15. de agua en aceite usando un volúmen igual de la mezcla  
9:1 Drakeol/Arlacel y luego en la forma de emulsión -  
múltiple usando 2 volúmenes de emulsión de agua en -  
aceite por volúmen de mezcla "Tween 80"/ PBS. La re -  
sultante vacuna por emulsión múltiple es un líquido mó  
20. vil estable que muestra poca señal de descomposición,  
incluso tras un prolongado almacenamiento a elevada -  
temperatura.

N O T A

25. Descrita suficientemente la naturaleza del  
invento, así como la manera de realizarlo en la prácti  
ca, debe hacerse constar que las disposiciones ante -  
riormente indicadas son susceptibles de modificaciones  
de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamen  
tal. También se hace constar que el invento correspon-  
30. de a una solicitud de patente presentada en Inglaterra



con fecha 25 de Octubre de 1.963 bajo el número 42210/63  
acogiéndose, por lo tanto, a los beneficios que conce -  
den los Convenios Internacionales en vigor y siendo lo  
que constituye la esencia del referido invento y por lo

5. que se solicita Patente de Invención por 20 años, en  
España "Procedimiento de preparación de una composición  
inyectable que contiene material antigéno", caracterizán -  
dose por lo siguiente:

10. 1ª.- "Procedimiento de preparación de una com -  
posición inyectable que contiene material antigéno", ca -  
racterizado por comprender la formación de una emulsión  
múltiple de aceite/agua en la que la fase continua es -  
acuosa y la fase dispersa primaria es una fase oleosa en  
la que está dispersa la fase acuosa que contiene al mate -  
15. rial antigéno.

20. 2ª.- Procedimiento de preparación de una com -  
posición inyectable, caracterizado por comprender la su -  
jeción de una mezcla de (1) una emulsión de agua en -  
aceite que contiene material antigéno en la fase acuosa,  
25. (2) un medio acuoso y (3) un agente emulsionador del ti -  
po que favorece la formación de la emulsión de aceite en  
agua, a condiciones emulsionadoras, en virtud de lo cual  
se obtiene una emulsión múltiple en la que la fase conti -  
nua es acuosa y la fase dispersa primaria, es una fase -  
oleosa en la que se encuentra dispersa una fase acuosa -  
que contiene al material antigéno.

30. 3ª.- Procedimiento según la reivindicación -  
2ª, caracterizado porque la relación entre la emulsión -  
de agua en aceite y el medio acuoso es de 3:1 a 1:10 so -  
bre una base de volumen/volumen.

36 5277



- 4<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 2<sup>a</sup> ó 3<sup>a</sup>, caracterizado porque el medio acuoso contiene del 0,25 al 5 % v/v del agente emulsionador, basado en el medio acuoso.
5.                   5<sup>a</sup>.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup>, caracterizado porque el diámetro medio de los glóbulos de la fase oleosa dispersa es del orden de 10 a 50 micras y preferiblemente de 10 a 20 micras.
10.                   6<sup>a</sup>.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 5<sup>a</sup>, caracterizado porque el diámetro medio de la fase acuosa que contiene al material antígeno es del orden de 1 a 7 micras.
- 7<sup>a</sup>.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup>, caracterizado porque el material antígeno es de origen viral, tal como virus de la influenza o virus de la enfermedad de Newcastle.
15.                   8<sup>a</sup>.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup>, caracterizado porque el material antígeno es de origen rickettsiano o toxoide, tal como toxoide del tétanos.
20.                   9<sup>a</sup>.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup>, caracterizado porque hay más de un antígeno presente.
25.                   10<sup>a</sup>.- "Procedimiento de preparación de una composición inyectable que contiene material antígeno"; tal y como queda substancialmente descrito en la presente Memoria.

30 5277



Esta memoria consta de ventiseis hojas escritas a máquina por una sola cara.

24 OCT. 1964

Madrid,

NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT  
CORPORATION,

J. GOMEZ ACEBO Y MODET