

347412

PATENTE DE INVENCION

Ref: SC. 3016.



Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la preparación de una suspensión viral inactivada monovalente o polivalente".

=====

Solicitante: RHONE-POULENC S.A., entidad francesa, residente en 22, Avenue Montaigne, Paris-8e, Francia.

=====

Este invento se refiere a un procedimiento de preparación de una suspensión viral inactivada y de vacunas mono- o polivalentes contra la gripe y a las nuevas vacunas así obtenidas.

5. Los virus utilizados para preparar estas vacu

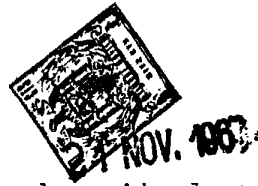


nas, son los virus gripales humano (tipos A, A₁, A₂ o B), equino, porcino o aviar.

- El procedimiento de preparación de acuerdo con este invento consiste en inocular uno u otro de los agentes virulentos antes descritos, en la cavidad alantoides de huevos de gallina con embrión, en incubar los huevos así inoculados, en recoger la suspensión viral y en inactivar esta última por un método adecuado. La suspensión obtenida, emulsionada con un auxiliar oleaginoso de composición determinada, proporciona emulsiones oleaginosas estables de virus gripales inactivados, susceptibles de administrarse a los seres humanos o a los animales, para protegerlos contra las afecciones gripales provocadas por los virus correspondientes a cada una de estas especies.
- 5.
- 10.
- 15.

- En la práctica, las partículas de virus gripal de los distintos tipos antígenos mencionados anteriormente, se cultivan de acuerdo con técnicas habituales en la cavidad alantoides del huevo de gallina con embrión y, después de la incubación durante 2 a 3 días aproximadamente, se retiran los líquidos alantoides y se purifican por centrifugación diferencial y filtración. Así se obtienen suspensiones virales, apropiadas para la inactivación.
- 20.

- La inactivación de esta suspensión viral se realiza por tratamiento con éter etílico de acuerdo con la técnica descrita especialmente por F.M. DAVENPORT y Coll., J. Lab. Clin. Med. 63, 5 (1964), para obtener sub-unidades hemoaglutinantes, antigenas pero no infecciosas, de las partículas virales. El tratamien
- 25.
- 30.



- to con éter etílico se lleva a cabo agitando a una temperatura próxima a 0°C la mezcla obtenida por adición de éter a la suspensión viral purificada anteriormente obtenida y separando luego por decantación la suspensión de sub-unidades hemoaglutinantes. En estas condiciones, la actividad neuramidínica de los virus se conserva. Se comprueba inmediatamente, de acuerdo con las técnicas corrientes, que esta suspensión está exenta de virus gripal infeccioso, y de pirógenos. En la técnica de inactivación, debe sustituirse ventajosamente el éter etílico por el acetato de etilo.
- 5.
- 10.

- Para el empleo humano o veterinario, por vías subcutáneas o intramuscular, la suspensión acuosa de partículas virales inactivadas así obtenida se emulsiona en una mezcla de aceite vegetal o mineral o de triglicérido natural hidrófilo y de un emulsionante adecuado, a fin de obtener suspensiones estables y fácilmente administrables. Como aceite vegetal se utiliza, con preferencia, el aceite de soja, pero pueden convenir también los aceites de sésamo, de aráquis o de oliva. Como triglicérido natural hidrófilo, se utilizan, por ejemplo triglicéridos oléicos polioxietilenados, o triglicéridos palmitoestearícos polioxietilenados. Como emulsionante, se utiliza, con preferencia, el oleato de manitol.
- 15.
- 20.

- La emulsión se obtiene de acuerdo con los procedimientos corrientes, por ejemplo agitando rápidamente la mezcla de la suspensión viral inactivada y de dos adyuvantes oleaginosos, a una temperatura próxima a 0°C. Así se obtiene una emulsión de sub-unidades hemoaglutinantes que puede utilizarse para la inmunización de los
- 25.
- 30.



21 NOV. 1957

seres humanos o de los animales. Esta emulsión constituye una vacuna que puede administrarse por vía subcutánea o intramuscular.

5. La suspensión viral inactivada puede utilizarse también directamente, especialmente administradas por vía nasal después de nebulización por cualquier medio apropiado. En especial puede acondicionarse en frascos nebulizadores o en recipientes con un propulsor gaseoso o líquido apropiado con objeto de poder obtener una dispersión en forma de pequeñas gotitas o de aerosoles. Para la utilización por vía rectal, la suspensión acuosa de partículas virales inactivadas se incorpora en un excipiente común, para supositorios.

10. El procedimiento anteriormente descrito, se aplica a vacunas monovalentes contra la gripe; es evidente que si se desean vacunas polivalentes, basta mezclar las suspensiones de sub-unidades hemoaglutinantes monotípicas obtenidas separadamente, después de incorporarlas en el adyuvante oleaginoso como antes se indicó.

15. El procedimiento de preparación descrito anteriormente permite obtener nuevas vacunas contra la gripe que, por su excelente actividad inmunizante, la duración de la inmunidad producida, su facilidad de administración (subcutánea, intramuscular, nasal o rectal) y su ausencia de efecto pirógeno, constituyen una mejora importante en este campo.

Los ejemplos siguientes, facilitados a título no limitativo, indican de qué modo puede aplicarse este invento en la práctica.

20. EJEMPLO 1 - La cepa A₂/Inglaterra/1/66 de virus gripal



- A₂, o la cepa B/Rumania/2/66 de virus gripal B, o la cepa Ann Arbor/1/57 de virus gripal A₁ o cualquier otra cepa de virus gripal humano de tipos antígenos A, A₁, A₂ ó B obtenidas de la colección del World Influenza Centre de Londres, se cultiva en la cavidad alantoides de huevos de gallina con embrión, con 10 días de incubación. Los huevos inoculados se incuban a 37°C durante 48 a 72 horas y luego se refrigeran a 4°C durante 18 horas, cuidando de eliminar previamente los huevos cuyos embriones han muerto. Después de la refrigeración, los líquidos alantoides de los huevos inoculados se retiran asépticamente por succión mediante una trompa de vacío y se reúnen para formar una mezcla de 500 a 1000 cm³. La cantidad de virus presente en esta mezcla se determina por la reacción de hemoaglutinación y por titulación "in ovo". Haciendo variar de acuerdo con la cepa utilizada la dilución del inóculo y la duración de incubación de los huevos inoculados, se procura obtener fondos comunes con teniendo entre 512 y 2048 unidades hemoaglutinantes por cm³ (UHA/cm³.) de virus.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

- Estos fondos comunes se clarifican a continuación por centrifugación a pequeña velocidad (1000 g aproximadamente) durante 15 minutos; el producto que sobrenada se centrifuga durante 60 minutos a 40 000 g en una ultra centrifugadora preparadora. El asiento obtenido se coloca nuevamente en suspensión de modo homogéneo en un volumen de fosfato isotónico tampón pH 7,2; ver R. DULBECCO y M. VOGT, J. Exp. Med. 99, 167 (1954) 7.
- 25.

- Esta suspensión concentrada se purifica a continuación por centrifugación en gradientes de densidad de
- 30.



tartrato de potasio o de sacarosa [ver C.E. SCHWERDT y F.L. SCHAFFER, *Virology* 2, 665 (1956); J.F. McCREA y Colab., *Nature* 189, 220 (1961) 7], utilizando una ultracentrifugadora preparadora. Las zonas de gradiente que

5. contengan la proporción más elevada de UHA/cm³, se reúnen para obtener una suspensión viral que contenga por lo menos 5.000 UHA/mg de proteína. Esta suspensión puede diluirse luego en fosfato isotónico tampón de tal modo que contenga de 1000 a 2000 UHA/cm³ de virus.

10. Para el tratamiento con éter etílico, se añaden a un volumen de la suspensión viral purificada obtenida anteriormente, 2 volúmenes de éter etílico exento de peróxido, y un mg/cm³ de monooleato de polioxietilensorbitol (Tween 80). Esta mezcla se coloca en un baño de hielo
15. fundente y se agita de modo continuo por medio de un agitador de paletas, durante 5 horas, realizándose la operación en condiciones de asepsia. El éter y la suspensión viral, compuesta en estas condiciones de sub-unidades hemoaglutinantes, se separan por decantación, y el éter residual se evapora en vacío. La proporción de UHA/cm³
20. se determina, por el método habitual, después de este tratamiento: en general se comprueba que es ligeramente superior a la proporción primitiva. La suspensión de sub-unidades hemoaglutinantes se filtra a continuación, para eliminar toda contaminación, sobre membranas de éster
25. de celulosa (dimensión media de los poros: 0,45 micras).

- Los ensayos de esterilidad bacteriana y fungicida se realizan de acuerdo con las técnicas corrientes en caldo tioglicolato, medio nutritivo gelosado National
30. Institute of Health, medio nutritivo gelosado de Sabou-



NOV. 1957

5. raud y caldo de enriquecimiento especial para Mycoplasma. La ausencia de virus gripal infeccioso residual después del tratamiento con éster se determina por dos pasos sucesivos, a diluciones distintas, en la cavidad alantoides del huevo de gallina con embrión. La ausencia de efecto pirógeno se establece de acuerdo con la técnica usual, por inyección intravenosa en el conejo.

10. La suspensión, bacteriológicamente estéril, exenta de virus gripal infeccioso y de pirógenos, se conserva a 4°C en ampollas selladas, después de la adición de mertiolato de sodio a la concentración final de 1 por 10 000.

15. La emulsión de la suspensión obtenida anteriormente de sub-unidades hemoaglutinantes de virus gripal en el adyuvante oleaginoso, se realiza del modo siguiente: a 30 cm³ de esta suspensión se le añaden los 27 cm³ de aceite de soja, 3 cm³ de oleato de manitol y 0,5 cm³ de monocoleato de polioxietilensorbitol (Tween 80), previamente esterilizados. (Los aceites vegetales se esterilizan por filtración en membranas de éster de celulosa; el oleato de manitol y el monocoleato de polioxietilensorbitol, se esterilizan en autoclave). Manteniendo esta mezcla en un baño de hielo fundente, se introduce en ella asepticamente el vástago de un dispersor de turbina (tipo Ultra-Turrax) que se hace funcionar durante 5 minutos. Se obtiene una emulsión blanca, cremosa, homogénea y estable, que se conserva a 4°C en frascos tapados con caucho y provistos de cápsulas metálicas.

20.

25.

30. La vacuna monovalente así obtenida, se destina a la administración al hombre por vía intramuscular o



NOV. 1961

- 8 -

subcutánea, en un volumen de 1 cm³ (via intramuscular) o de 0,4 cm³ (via subcutánea).

EJEMPLO 2 - Operando como en el ejemplo 1, a partir de

5. la misma cepa, pero utilizando el acetato de etilo como agente de inactivación, se obtiene una suspensión de sub-unidades hemoaglutinantes del virus de partida, cuyos controles se realizan como en el ejemplo 1.

EJEMPLO 3 - Para la preparación de vacunas polivalentes

10. destinadas a la administración al hombre por via intramuscular o subcutánea, las diversas cepas de virus gripal de tipos A, A₁, A₂ y B que se desee incorporar en la vacuna, se cultivan "in ovo", se purifican por centrifugación y se tratan con éter etílico o acetato de etilo, como se describe en los ejemplos 1 y 2. Las distintas suspensiones monotípicas así obtenidas, se mezclan a continuación de tal modo que la suspensión final contenga de 100 a 500 UHA/cm³ de cada tipo antígeno presentado. Los controles de esterilidad, de ausencia de virus infeccioso residual y de ausencia de pirógenos, la emulsión en el adyuvante oleaginoso y el acondicionamiento de la vacuna, se realizan como en el ejemplo 1.
- 15.
- 20.

EJEMPLO 4 - La preparación de vacuna antigripal destinada a la inmunización de la especie porcina,

25. se realiza del modo siguiente. La cepa A/Swine S₁₅ de virus gripal porcino, se cultiva "in ovo" y el virus se purifica como en los ejemplos 1 y 2, limitando, sin embargo, la purificación a la primera etapa (centrifugación a 40 000 g. durante 60 minutos). El tratamiento por éter etílico, se lleva a cabo como en el ejemplo 1. La
- 30.



- suspensión final ha de contener de 500 a 1000 UHA/cm³ de virus. Los controles de esterilidad y de ausencia de virus infeccioso residual, se realizan como en el ejemplo 1. La emulsión en el adyuvante oleaginoso, se realiza igualmente como en el ejemplo 1, pero se agrega a la mezcla, antes de su dispersión, 5 % de un triglicérido natural interesterificado [tal como el Labrafil M 1944 o el Labrafil M 2735 (Gattefosse)] 7. Esta vacuna se destina a la administración por vía intramuscular, en un volumen de 5 cm³.
- 5.
- 10.
- EJEMPLO 5 - La preparación de vacuna antigripal destinada a la inmunización de la especie caballar, se realiza del mismo modo que en el ejemplo 4, pero utilizando como cepas de virus, los virus gripales equinos A/Equi/Praga y A/Equi/Miami, o cepas antigénicamente emparentadas con éstas. La vacuna es bivalente, que comprende una cepa de cada una de estas dos últimas. Como en el caso de la vacuna porcina, el adyuvante oleaginoso (aceite vegetal + oleato de manitol) contiene 5 % de un triglicérido natural interesterificado. La vacuna se destina a la administración por vía intramuscular, en un volumen de 5 cm³.
- 15.
- 20.
- EJEMPLO 6 - La preparación de vacuna antigripal, destinada a la inmunización de los pavos, se lleva a cabo como en los ejemplos 4 y 5, pero utilizando como cepa de virus, el virus gripal aviar Turquía/Inglaterra/63 (Langham). El adyuvante oleaginoso, como en el caso de las vacunas porcina y equina, contiene 5 % de un triglicérido natural interesterificado. La vacuna se destina a la administración por vía intramuscular
- 25.
- 30.



NOV. 1961

(bajo un volumen de 1 cm³) o subcutánea en la membrana alar (bajo un volumen de 0,2 cm³).

EJEMPLO 7 - La preparación de vacuna antigripal desti-

- nada a la inmunización de seres humanos
5. por vía intranasal se realiza como en los ejemplos 1 y 2 en lo que se refiere al cultivo de virus "in ovo", a su concentración, a su purificación, a su tratamiento con éter etílico o con acetato de etilo y a la mezcla de capas humanas representativas de los tipos A, A₁, 10. A₂ y B, para obtener una vacuna monovalente o polivalente. Los ensayos de esterilidad y de ausencia de virus infeccioso residual, son los mismos de los ejemplos 1 y 2. Después del tratamiento por el éter etílico o el acetato de etilo, se omite la adición de mertiolato a 15. las suspensiones de sub-unidades hemoaglutinantes. Se comprueba que éstas han conservado una actividad enzimática neuraminidásica, haciendo reaccionar una parte alícuota con una preparación de mucoproteínas extraídas de la glándula sub-maxilar de buey y determinando la liberación de ácido N-acetilneuramínico a partir de este sus- 20. trato.

- La suspensión acuosa, mono- o politípica, de sub-unidades hemoaglutinantes no se emulsiona en un adyuvante oleaginoso, como en los ejemplos anteriores: se coloca en un aparato nebulizador, bajo presión de nitrógeno y se administra por nebulización en las ventanas nasales. 25.

EJEMPLO 8 - Del modo siguiente se preparan suposito-

- rios destinados a la inmunización de seres humanos por la vía rectal: los virus tipo A, A₁, A₂ y B 30.



- se cultivan "in ovo", se concentran, se purifican y se desintegran por el éster etílico o el acetato de etilo, como en los ejemplos 1 a 3. Las suspensiones acuosas, mono- o politípicas, de sub-unidades hemoaglutinantes,
5. no adicionadas de mertiolato, se liofilizan y el producto seco obtenido se incorpora a una preparación de aceite de palma hidrogenada interesterificada [tipo Labrafil N 2273-C (Gattefosse)] previamente fundida a 38°C, que inmediatamente se deja solidificar en moldes adecuados para darle la forma de supositorios.
- 10.

- La proporción de suspensión liofilizada de sub-unidades hemoaglutinantes añadida a la masa para supositorios que acaba de describirse, se calcula para que cada uno de estos contenga como mínimo 1000 unidades hemoaglutinantes de cada cepa de virus representada en la vacuna.
- 15.

- N O T A -

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica,
20. debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente presentada en Francia, con fecha 21 de noviembre de 1966, bajo el número FV. 84.337; acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en
25. España, sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE
- 30.



UNA SUSPENSION VIRAL INACTIVADA MONOVALENTE O POLIVALENTE"; caracterizándose por lo siguiente:

5. 1a.- "Procedimiento para la preparación de una suspensión viral inactivada monovalente o polivalente", mediante inactivación de suspensiones de virus gripales humanos, equinos, porcinos o aviares, cultivados en la cavidad alantoides del huevo de gallina con embrión y purificados por centrifugación diferencial, susceptible de formularse en forma de vacuna para su administración por vía subcutánea o intramuscular, por vía intranasal y por vía rectal bajo preparados inyectables, aerosoles y supositorios respectivamente, caracterizado porque la citada inactivación de los virus se realiza mediante tratamiento con un compuesto elegido del grupo consistente en éter etílico y acetato de etilo, en condiciones de conservación de la actividad neuraminidásica de estos virus.

10. 2a.- "Procedimiento para la preparación de una suspensión viral inactivada monovalente o polivalente", tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 12 hojas escritas a máquina por una sola cara.

25. Madrid

RHONE-POULENC S.A.

21 NOV. 1967

J. GÓMEZ ACEBO Y MODEY
p. p. Firmado: F. Hernández Ruiz