

350690

P-37.631

ES/GSAS/A313

Memoria descriptiva



3 ABR. 1968

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED

entidad / de nacionalidad británica

con domicilio en 183-193, Euston Road, Londres, Inglaterra.

por: "UN METODO PARA LA CONCENTRACION Y PURIFICACION DE -
LOS VIRUS DEL GRUPO DE LA INFLUENZA" (Clase Interna-
cional C12k)



Este invento se refiere a la producción de vacunas que contienen virus de influenza, y en particular a suspensiones purificadas y concentradas de tales virus.

Se ha conocido que los virus del grupo de la influenza, tales como Mixovirus influenzae-A., influenzae B., o influenzae-C pueden ser hechos crecer por ejemplo, en un cultivo de tejido de embrión de pollo, de riñón de mono o de riñón de ternero, o convenientemente en huevos de gallina embrionados. Los fluidos de cultivo de tejido o fluidos alantoicos, según son recogidos, contienen cantidades considerables de proteínas no virulentas, y se han desarrollado muchos esfuerzos de investigación para crear medios de separar el virus de estos otros materiales. Además, la concentración de los virus debe lograrse con el fin de crear suficiente antígeno de virus en una dosis de vacuna conveniente.

Métodos que utilizan la ultracentrifugación, la absorción con sulfato de bario, o la precipitación con sulfato de amonio o disolventes orgánicos, han sido sugeridos o utilizados, por ejemplo, para obtener el virus en una forma concentrada y preferiblemente purificada, apropiada para ser utilizada en una vacuna después de inactivación. Sin embargo, la ultracentrifugación requiere equipos especiales muy costosos, y preferiblemente la utilización de gradientes de densidad para una satisfactoria separación, y estos no pueden ser desincrustados sin un gasto adicional considerable. Ni la adsorción ni la precipitación son fuertemente selectivas, ya que grandes cantidades de diversas proteínas tienden a ser adsorbidas, eluidas o precipitadas juntamente con el vi-



rus, que es también una sustancia proteínica.

5 Se ha encontrado ahora que virus del grupo -
particular de la influenza pueden ser precipitados con-
venientemente a partir de suspensiones acuosas crudas -
por medio de diálisis. Inesperadamente, la eliminación -
de algunos "materiales cristaloides" reduce la estabili-
dad del virus de una manera selectiva, haciendo posible
que el virus precipite en primer lugar, y sea separado -
de esta manera de las otras impurezas proteínicas subsi-
10 guientemente precipitadas. En este texto, el término "ma-
teriales cristaloides" ha de significar materiales en la
suspensión de virus cruda, que pueden difundirse a tra-
vés de una membrana semipermeable. Estos materiales in-
cluyen sales inorgánicas y probablemente impurezas orgá-
15 nicas de bajo peso molecular. Aparantemente, los materia-
les cristaloides influyen sobre la solubilidad de partí-
culas de mayor peso molecular, tales como virus, y su -
cantidad relativa puede estar indicada por la conductivi-
dad de la solución.

20 Así, la separación conveniente y selectiva y -
la purificación del virus se logran por la eliminación -
de dichos materiales cristaloides en la cantidad que hace
posible que las partículas de virus precipiten desde la
solución. El virus puede ser recogido entonces en una --
25 fracción que representa una décima parte a una cincuenta
va parte del volumen original con una proporción de acti-
vidad de virus a proteína aumentada en un factor de al -
menos 10.

30 Una mejora adicional puede obtenerse ajustando
la concentración de cationes bivalentes en el líquido de



diálisis, tales como calcio, magnesio, bario, o cobalto hasta un valor dentro de un margen especificado. Se ha encontrado que la precipitación de los virus es más completa, si estos cationes no son eliminados completamente del medio que contiene los virus.

5

De acuerdo con el presente invento, por lo tanto, en un aspecto, se crea un método para la concentración y purificación de los virus del grupo de influenza, que comprende dializar una suspensión del virus hasta un grado suficiente para permitir que el virus forme un precipitado y separe la fracción que contiene el virus de la solución flotante. En un aspecto particular, el método, tal como se ha definido anteriormente, comprende ajustar la concentración de cationes metálicos bivalentes en el líquido de diálisis hasta un valor desde 0,003 hasta aproximadamente 0,012 M. En un aspecto adicional, el método anteriormente definido se utiliza en el procedimiento para producir la vacuna que contiene dichos virus de influenza purificados.

10

15

20

25

Para los fines del presente invento se puede utilizar cualquier medio de crecimiento apropiado para crear la suspensión inicial del virus, pero se han preferido los fluidos alantoicos obtenidos de huevos de gallina embrionados. El fluido es clarificado usualmente por centrifugación a baja velocidad (1600 g; g= aceleración de la gravedad) para eliminar la materia en forma de partículas y las células de sangre, antes de la diálisis.

30

El líquido de diálisis es usualmente agua ajustada con un tampón a un valor de pH apropiado, que preferiblemente tiene un contenido de cationes metálicos biva-



lentes, tal como se define anteriormente. Convenientemente se puede utilizar agua corriente, cuyo valor de dureza corresponde al margen especificado. Se obtuvieron los mejores resultados con una concentración ajustada a aproximadamente 0,01 M. Los aniones que acompañan a estas --
5 cationes pueden ser cualquier anión inocuo, tal como cloruro, sulfato, etc.

Se puede utilizar para la diálisis cualquier --
equipo apropiado. En una pequeña escala es satisfactorio
10 un tubo de celofán semi-permeable, y en mayor escala la máquina denominada del riñón artificial, diseñada originalmente para purificar la sangre ha sido encontrada convenientemente la utilización. La proporción de la superficie de dialización al volumen de líquido era de aproximadamente 1,6 cm^{-1} en el caso del tubo de celofana, y de
15 4,5 cm^{-1} para la máquina de riñón artificial. El agua corriente ajustada a un pH entre 5 y 9 con un tampón de Sørensen es hecha circular fuera de la membrana y se mide o vigila regularmente la conductividad de la suspensión de --
20 virus, o cualquier otra propiedad física relacionada con la conductividad, si es necesario.

El tiempo de la diálisis depende de la superficie de la membrana disponible y de la temperatura de la --
suspensión. Cuando se utiliza el equipo antes mencionado
25 a la temperatura ambiente, se encontró que eran adecuadas 3 a 4 horas para recuperar más de 80 a 90% de la actividad de virus del precipitado. Entre tanto, la conductividad de la suspensión de virus desciende desde la magnitud inicial de 10^4 $\mu\text{mho}/\text{cm}$ hasta el margen por debajo --
30 de 3×10^3 , o frecuentemente hasta el margen de 2 a 10 --



veces 10^2 μ mho/cm. El contenido de cloro del anterior fluido alantoico es reducido correspondientemente desde 4,25 mg/ml hasta 1,3 mg/ml o menos, y es conveniente observar esto en lugar de la conductividad de la solución, con tal que se hayan normalizado las condiciones de tratamiento y se hayan establecido los valores equivalentes para los dos ensayos. La concentración de iones calcio y magnesio en la suspensión puede ser también vigilada, y el procedimiento puede ser interrumpido después de unas pocas horas, cuando esta alcanza el equilibrio con la del líquido de diálisis.

Se deja reposar la suspensión después de la diálisis mientras tiene lugar la lenta sedimentación del virus, o preferiblemente es centrifugada para acelerar la sedimentación. El fluido flotante es eliminado acto seguido, y el depósito que representa la fracción rica en virus es suspendido de nuevo por medio de un tampón salino de fosfato o de citrato de pH 7 a 8, o con una solución al 1% de tripsina en solución salina tamponada con fosfato. El volumen de la solución acuosa utilizada para volver a suspender el depósito de virus es ajustado apropiadamente de manera que la suspensión de virus purificada pueda representar todavía al menos una concentración de 10 veces comparada con el volumen original. El virus presente en el concentrado representa usualmente al menos 70%, y frecuentemente más de 90% de la actividad original de virus expresada en unidades de HA (hemaglutinación).

Resulta que la sedimentación es más rápida y más selectiva cuando se ajusta la concentración de catión bivalente del líquido de diálisis tal como se ha sugerido.



El sedimento separado puede ser lavado con agua que tiene calcio 0,1 M, y puede ser dejado sedimentar de nuevo antes de la nueva suspensión.

5 Convenientemente, el sedimento de virus precipitado puede ser suspendido de nuevo en tampón de citrato de triamonio, que tiene preferiblemente una concentración 0,2 M y un pH desde 5,6 a 7,2. Se puede utilizar 1 ml de dicha solución por cada 10 ml de volumen de la suspensión de virus original, para obtener una concentración de 10 veces. El virus suspendido de nuevo puede ser inactivado entonces por medio de agentes químicos o físicos y puede ser utilizado como vacuna después de experimentación apropiada.

15 El método de acuerdo con el presente invento - separa y concentra convenientemente y con rapidez los virus de influenza por medios simples, sin contaminar la suspensión de virus con sales u otros agentes, y sin pérdida apreciable de actividad de virus. A una gran escala, el método puede llevarse a cabo en dos o más etapas separadas que proporcionen dos o más fracciones que representan diversos grados de pureza. Las últimas fracciones, -
20 menos preferidas, pueden ser sometidas después a una ulterior purificación o pueden ser recirculadas al procedimiento.

25 La vacuna concentrada es ensayada en cuanto a la actividad y capacidad de infección y se ajusta su concentración a un valor que cumple las regulaciones establecidas. La actividad es expresada usualmente en Unidades Internacionales de Hemaglutinación, y la potencia de la -
30 vacuna es el valor por ml. La unidad y el procedimiento -



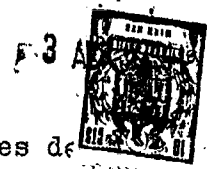
para llevar a cabo el ensayo han sido definidos en "Final Report of the Experts Committee on Influenza, 1953" -- (World Health Organisation Technical Report Nº 64). La inactivación del virus se efectúa usualmente después de la purificación, pero también se puede aplicar el método de acuerdo con el presente invento después que han sido inactivados los virus en una etapa anterior del procedimiento.

Los siguientes ejemplos ilustran el invento.

Ejemplo 1. - El fluido alantoico que contiene la cepa de Influenza B/Eng/66, cultivada en un embrión de pollo de 10 días de edad, fue clarificado por centrifugación con una aceleración de 1600 veces la de la gravedad en una centrífuga Multex M.S.E. (a 2500 revoluciones por minuto) durante 10 minutos. Después, el fluido - fué dializado en un tubo "Visking Tubing", (celofan, diámetro aproximado 2,5 cm) suministrado por el Scientific Instrument Centre, frente a agua corriente a 37°C.

Se recogieron muestras a intervalos de una hora hasta la cuarta hora. Estas fueron centrifugadas igual que anteriormente durante 10 minutos y se recogieron después separadamente los líquidos flotantes y los depósitos.

Ambas fracciones fueron ensayadas en cuanto a la concentración de hemaglutinina por el micrométodo de Takatsy normalizado. Los contenidos totales de proteínas fueron determinados por el método de Lowry y otros, J. - Biol. Chem., 1961 193, 265-275. El depósito fue obtenido a partir de muestras que fueron suspendidas de nuevo hasta el volumen de partida original en una solución salina



de tampón de fosfato Dulbecco (P.B.S. "A") con fines de ensayo.

Se determinó la conductividad de la solución flotante y los resultados fueron los siguientes:

Horas de des- lización a - 37°C.	Unidades Internaciona- les de Hemaglutinación ml		Proteínas mg/ml.		Conductividad µmho/cm.
	Flotante	Depósito	Flotante	Depósito	
0	1280	80	4,39	0,135	98 x 10 ²
1	320	320	3,94	0,135	14 x 10 ²
2	320	640	3,95	0,222	10,5 x 10 ²
3	320	1280	3,90	0,289	8,4 x 10 ²
4	160	1280	3,74	0,318	7,3 x 10 ²
Testigo 4 ho- ras no diali- zado	640	80	4,35	0,106	96 x 10 ²

20. Prácticamente, se recuperó toda la actividad - de virus en el depósito, habiéndose eliminado aproximada- mente 93% de otras proteínas. El factor de purificación era de 14 veces, expresado como el aumento de la propor- ción de virus a proteínas.

25. Ejemplo 2.- Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó agua destilada para la diálisis en el anterior ejemplo 1, y cuando el fluido alantoico de hue- vos embrionados inoculados con la cepa Influenza A/Eng/ - 1966 y el fluido amniótico que contenía la cepa de in- fluencia C Taylor fueron tratados de acuerdo con el método del Ejemplo 1.

30. Ejemplo 3.- La influencia tipo A₂/Eng/1966 fué cultivada en el fluido alantoico de huevos embrionados de 11 días de edad y se cosechó dos o tres días más tarde el



fluido alantoico infectado.

2,0 litros de fluido alantoico infectado son dializados contra agua corriente circulante a la temperatura ambiente por circulación a través de un serpentín de doble helice de tubo de diálisis (Rifón de serpentín desechable de Baster Laboratories "Chronacoil") que tiene una capacidad de 500 ml y un área total de 9000 cm². El fluido fue hecho circular a una velocidad de 200 ml/minuto durante 4 horas. Durante este tiempo la conductividad del fluido alantoico descendió desde $65 \times 10^2 \mu\text{mho/cm}$ hasta $25 \times 10^2 \mu\text{mho/cm}$, y tuvo lugar la precipitación. El precipitado fue recogido por centrifugación y fue suspendido de nuevo en una cantidad de 1/14 del volumen original de solución salina tamponada con fosfato que contenía 1% en peso/volumen de tripsina.

El fluido alantoico original tenía una concentración de HA de 32 y contenía 1,25 mg de proteína/ml medido por valoración con ácido tricloroacético. El concentrado tenía una concentración de 4096 y tenía un contenido de proteínas de 2,5 mg/ml. El rendimiento de virus, medido por HA, era de 100% y el concentrado mostró un factor de purificación de 64 veces.

Ejemplo 4.- 1,0 litros de fluido alantoico que contenía influenza tipo A₂/Eng/66 cultivada como en el Ejemplo 3, fue dializado tal como se describe durante 3 horas. El fluido original dió una concentración de 1024 y un concentrado de 25 veces, preparado como en el Ejemplo 3, dió una concentración de 50.000.

Ejemplo 5.- 1,5 litros de fluido alantoico que contenía virus de influenza tipo B/Eng/66, fueron tratados



tal como se describe en el Ejemplo 3. La diálisis se efectuó durante 3 horas. La concentración original era de 256 y el concentrado de 20 veces dió una concentración de - 4096.

5 Ejemplo 6.- La suspensión de virus concentrado obtenida en los ejemplos 1 a 5 fue inactivada por medio de formaldehído de acuerdo con métodos conocidos, y fue ajustada hasta una concentración de 2.500 a 5000 unidades HA/ml. Las vacunas creadas de esta manera mostraron ser satisfactorias en la experimentación.

10 Ejemplo 7.- Se realizaron experimentos adicionales de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, siendo ajustado el líquido de diálisis para tener una -- cierta concentración de catión metálico bivalente. Los - resultados fueron tabulados de la siguiente manera:

Concentración de catión bivalente en el líquido de diálisis.	Unidades Internacionales de Hemaglutinación/ml		Proteínas mg/ml	
	Flotante	Depósito	Flotante	Depósito
0,01M Ca^{++}	32	1024	1,1	0,13
0,005M Ca^{++}	33	1024	1,09	0,13
0,01M Mg^{++}	4	256	2,01	0,35
0,01M Ba^{++}	15	128	1,79	0,24
0,01M Co^{++}	8	256	2,11	0,31

25 Se utilizaron calcio, magnesio y bario en forma de cloruro para ajustar el líquido de diálisis, y el cobalto en forma de un sulfato.

30 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, con fecha 21, de Febrero de 1967, bajo en número 8232/67, se acoge a los beneficios del Ar-



título 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

- N O T A -

10

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

15

1.- Un método para la concentración y purificación de los virus del grupo de la influenza, que comprende dializar una suspensión del virus en una cantidad suficiente que hace posible que el virus forme un precipitado y separe la fracción que contiene el virus desde la solución flotante.

20

2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende ajustar la concentración de cationes metálicos bivalentes en el líquido de diálisis hasta un valor desde 0,003 hasta aproximadamente 0,012 M.

25

3.- Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en que la concentración de cationes metálicos bivalentes es 0,1 M.

30

4.- Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en que el catión metálico bivalente es calcio, magnesio, bario o cobalto, o una mez-



cla de los mismos.

5.- Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en que el catión es calcio.

5

6.- Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la conductividad de la suspensión es reducida hasta un margen inferior a $3 \times 10^3 \mu\text{mho/cm}$.

10

7.- Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en que la conductividad de la solución es reducida hasta un valor de $2 \text{ a } 10 \times 10^2 \mu\text{mho/cm}$.

8.- Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el contenido de cloruro de la suspensión es reducido hasta $1,3 \text{ mg/ml}$ o menos.

15

9.- Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la suspensión de virus es un fluido alantoico obtenido a partir de huevos infectados embrionados.

20

10.- Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en que el fluido es clarificado por centrifugación a baja velocidad antes de la diálisis.

11.- Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la diálisis se lleva a cabo en una máquina de riñón artificial.

25

12.- Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el precipitado separado es lavado con una solución que contiene un catión metálico bivalente, tal como calcio, y es separado.

30

13.- Un método de acuerdo con una cualquiera

F 3



de las reivindicaciones precedentes, en que el precipitado separado o lavado es suspendido de nuevo en un tampón que contiene citrato de triamonio.

5

14.- Un método para la preparación de vacunas contra enfermedades causadas por los virus del grupo de la influenza, que comprende las operaciones reivindicadas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, se inactiva el virus antes o después de la diálisis por medios de por si conocidos y se presenta el virus inactivado en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

15.- Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en que la inactivación se realiza con formaldehído.

15

16.- Un método para la preparación de vacunas contra enfermedades causadas por los virus del grupo de la influenza, que utiliza una cepa atenuada del virus, - que comprende las operaciones reivindicadas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y presenta la suspensión de virus concentrada en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20

17.- Un método de acuerdo con una cualquiera - de las reivindicaciones 14 a 16, que utiliza una cepa de M.Influenzae-A o M-Influenzae-B.

25

18.- Un método para la concentración y purificación de los virus del grupo de la influenza.

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

Esta Memoria consta de catorce hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 3 ABR. 1968

I-4-68/ETA.-

Alfonso de Elizaga