

357848

8 SEP. 1968



**Memoria descriptiva**

para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

a nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad / ~~de nacionalidad~~ alemana

con domicilio en Marburg/Lahn, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO MEJORADO PARA LA PREPARACION DE UNA VACUNA CONTRA LA POLIOMIELITIS" (Clase Internacional A61k)



El invento concierne a un procedimiento mejorado para la preparación de una vacuna contra la poliomielitis estable, que ha de ser administrada oralmente.

Los virus de polio atenuados son muy inestables y pueden ser almacenados solamente en estado congelado. -  
5 A la temperatura de 4 a 6°C. de almacenamiento usual para vacunas, las vacunas orales contra la polio son inactivadas sin embargo rápidamente. Por lo tanto no han faltado ensayos de preparar vacunas contra la poliomielitis  
10 estables que han de ser administradas oralmente, que también sean estables a temperaturas por encima de 0°C. Así, los virus de poliomielitis atenuados fueron mezclados con gelatina molida no hidratada y fueron metidos en cápsulas,  
15 aplicados sobre núcleos de azúcar y secados, mezclados con peptonas, mezclados con sales de cationes divalentes o con sal de aluminio. Sin embargo, estas medidas no han podido impedir la disminución gradual de la actividad de las vacunas orales contra la poliomielitis a temperaturas de 4 a 6°C.

Otra nueva razón de la disminución de la actividad consiste en que los virus de poliomielitis atenuados son adsorbidos desde la solución sobre las paredes de vidrio. Esta adsorción es aumentada todavía más por agitación, por ejemplo durante el transporte, y puede conducir  
20 en un tiempo muy corto a una amplia inactivación de la vacuna.

Se ha encontrado ahora un procedimiento mejorado para la preparación de una vacuna contra la poliomielitis para ser administrada oralmente, que orilla las desventajas antes descritas. El procedimiento está caracteri  
30



4 SEP 1968

zados porque a virus de poliomielitis atenuados obtenidos de manera de por sí conocida se añade tampón de fosfato de valor de pH 4,5 a 7,0, preferiblemente de 6,7, con una molaridad de 0,001 a 3,0, preferiblemente 0,3 M, al que se añaden preferiblemente caseína en una concentración de 0,01 a 10,0, preferiblemente 5,0% o hidrolizado de albúmina láctea o hidrolizado de caseína en una concentración de 0,6 a 10,0%, preferiblemente de 1,0%, referida a la cantidad total; o iones de metales alcalinos, por ejemplo iones de sodio o potasio, en una concentración entre 0,2 molar y la concentración de saturación, preferiblemente 2,0 molar.

En calidad de tampón de fosfato se consideran preferiblemente el tampón de McIlvaine (hidrogenofosfato disódico/ácido cítrico) o tampón de Sörensen (dihidrogenofosfato potásico/hidrogenofosfato disódico). También son apropiados otros sistemas de tampón que contienen fosfato tales como dihidrogenofosfato potásico/hidróxido sódico; hidrogenofosfato disódico/dihidrogenofosfato sódico así como los tampones de Britton y Robinson, de Davies y de Teorell y Stenhagen.

La utilización de tampón de fosfato, o de iones de metales alcalinos aumenta la estabilidad de la vacuna contra la poliomielitis a temperaturas por encima de 0°C.; la adición de caseína, hidrolizado de caseína o hidrolizado de albúmina láctea impide además la adsorción de los virus de polio sobre las paredes del recipiente o puede hacer retroceder de nuevo una adsorción que ya haya tenido lugar.

Ejemplos: Los ensayos descritos en los siguientes



tes ejemplos se realizaron con suspensiones acuosas de -  
virus de poliomiелitis atenuados y vivos de la cepa Sa-  
bin tipo I y mezclas de los tipos I, II y III (vacuna -  
trivalente). Los ensayos fueron evaluados por valoración  
5 o titulación del contenido de virus en tubitos de culti-  
vo de tejidos, y se dan en  $DICT_{50}$  (dosis infecciosa de  
cultivo de tejido de 50%). A partir de las muestras se  
prepararon para la valoración series de dilución con el  
factor 10. Como medio de dilución se utilizó TCM 199 --  
10 (medio de cultivo de tejido 199) (MORGAN, J.F., MORTON,  
H.J. y PARKER, R.C., 1950, Nutrition of animal cells in  
tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium.  
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 73, 1 - 8). 10 tubitos fue-  
ron llenados con porciones de 1 ml. de cada una de las  
15 etapas de dilución, fueron incubados a 35°C., y fueron  
comprobados en el séptimo día. Los títulos o concentra-  
ciones de virus fueron calculados de acuerdo con REED y  
MUENCH, Am. J. Hyg. 27, 493 (1938). En los ensayos de -  
agitación las muestras fueron agitadas durante 12 a 14  
20 horas con una frecuencia de aproximadamente 100 por mi-  
nuto, siendo la temperatura de la atmósfera circundante  
de 4 a 6°C,

Ejemplo 1: Una vacuna oral de polio trivalen-  
te (tipos I, II y III) fue mezclada con tampón de fosfa-  
25 to según Sörensén (pH 6,7) hasta una concentración final  
de 0,5 moles/litro; a cada una de las muestras de esta  
solución se añadieron 1% de hidrolizado de albúmina lác-  
tea, 1% de hidrolizado de caseína y 5% de caseína. Todas  
las muestras fueron agitadas mecánicamente durante 12 ho-  
30 ras a 4-6° C. junto con una muestra testigo. Otra mues--



tra testigo fue mantenida inmóvil a la misma temperatura. Después de transcurrir 12 horas se obtuvieron los siguientes resultados:

	Concentración de virus (DICT <sub>50</sub> )		
	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Testigo, no agitado	$2,5 \times 10^6$	$8,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$
Testigo agitado	$0,2 \times 10^6$ Adsorción 92%	$4,0 \times 10^5$ Adsorción 50%	$0,4 \times 10^6$ Adsorción 75%
+ tampón de fosfato pH 6,7; 0,5 moles	$2,7 \times 10^6$ Adsorción 0%	$8,2 \times 10^5$ Adsorción 0%	$1,7 \times 10^6$ Adsorción 0%
+ tampón de fosfato pH 6,7; 0,5 moles + 1% de hidrolizado de albúmina láctea	$2,6 \times 10^6$ Adsorción 0%	$8,1 \times 10^5$ Adsorción 0%	$1,6 \times 10^6$ Adsorción 0%
+ tampón de fosfato pH 6,7 0,5 moles + 1% de hidrolizado de caseína	$2,25 \times 10^6$ Adsorción 10%	$7,6 \times 10^5$ Adsorción 5%	$1,6 \times 10^6$ Adsorción 0%
+ tampón de fosfato pH 6,7; 0,5 moles + 5% de caseína	$2,4 \times 10^6$ Adsorción 4%	$7,8 \times 10^5$ Adsorción 2,5%	$1,5 \times 10^6$ Adsorción 6%

3.9.68



El ensayo muestra que los virus son adsorbidos por agitación hasta 92%, 50% y 75%, pero que sin embargo la adsorción es evitada de manera amplia o completa por medio de las medidas de acuerdo con el invento.

5 Ejemplo 2 (almacenamiento)

Se preparó una vacuna oral contra la polio tri-  
valente, que contenía 1,0% de hidrolizado de albúmina --  
láctea y tampón de fosfato 0,3 molar, de pH 6,7. Además  
se preparó una vacuna oral contra la polio trivalente --  
10 igual sin hidrolizado de albúmina láctea ni tampón de --  
fosfato. Ambas vacunas fueron conservadas a 4°C durante  
6 meses. Al comienzo, después de tres meses y de seis me-  
ses se determinó el contenido de virus en ambas vacunas.

Vacuna con hidrolizado de albúmina láctea y tampón de fosfato			
	Concentración de virus (DICT <sub>50</sub> )		
	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Valor de parti- da al comienzo del ensayo	2,5 x 10 <sup>6</sup>	3,2 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>6</sup>
después de 3 me- ses	2,6 x 10 <sup>6</sup>	3,1 x 10 <sup>5</sup>	1,45 x 10 <sup>6</sup>
después de 6 me- ses	2,55 x 10 <sup>6</sup>	3,25 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>6</sup>
Pérdida después de 6 meses	----	----	----



	Vacuna sin aditivo		
	Concentración de virus (DICT <sub>50</sub> )		
	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Valor de partida al comienzo del ensayo	$2,4 \times 10^6$	$8,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$
después de 3 meses	$1,1 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$
después de 6 meses	$1,2 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$
Pérdida después de 6 meses	80%	89,8%	81,2%

De este ensayo se desprende que una vacuna que contiene hidrolizado de albúmina láctea y tampón de fosfato permanece estable durante todo el período de observación de 6 meses, mientras que una vacuna sin estos aditivos ha perdido casi toda la actividad.

### Ejemplo 3

Muestras de virus oral de polio del tipo I fueron mezcladas con cloruro de sodio hasta una concentración final de 2 moles o con cloruro de potasio hasta una concentración final de 1,5 moles, fueron agitadas de acuerdo con el ejemplo 1 y el contenido de virus fue determinado antes y después de la agitación.



Aditivos	Contenido de virus en DICT <sub>50</sub> Tipo I		Pérdidas
	antes de la agitación	después de la agitación	
sin (testigos)	$6,3 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	aprox. 84%
2 moles de NaCl	$6,4 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	aprox. 6%
1,5 moles de KCl	$6,4 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	aprox. 39%

De este ensayo se desprende que también por adición de sales de cationes monovalentes se disminuye considerablemente la adsorción del virus oral de polio sobre el virus.

5 La presente solicitud, que corresponde a la presentada en la República Federal Alemana, el 5 de septiembre de 1967, bajo el número B 94296 IVa/30h (ahora 16 17 356.1) se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

#### N O T A

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:

19 NOV



19.- Procedimiento mejorado para la preparación de una vacuna contra la poliomiелitis estable que ha de ser administrada oralmente, caracterizado porque a una  
5 vacuna a base de virus de poliomiелitis atenuados preparada  
5 de manera de por sí conocida se añade: a) tampón de fosfato de pH 4,5 a 7,0, preferiblemente de 6,7 con una molaridad de 0,001 a 3,0 M, preferiblemente 0,3 M; o b) iones de metales alcalinos en una concentración entre 0,2 molar y la concentración de saturación, preferiblemente 2,0 molar.

10 20.- Procedimiento según la reivindicación 1a, caracterizado porque a la vacuna de poliomiелitis que contiene el tampón de fosfato se añade caseína en una concentración de 0,01 a 10,0%, preferiblemente de 5,0% o hidrolizado de albúmina láctea o hidrolizado de caseína en  
15 una concentración de 0,6 a 10,0%, preferiblemente de 1,0 referido a la cantidad total.

30.- Procedimiento mejorado para la preparación de una vacuna contra la poliomiелitis.

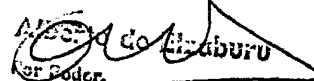
20 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

La presente Memoria consta de nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

P. A.

19 NOV. 1969

  
M. A. de Azaburu  
Kar Goucr.