

379641

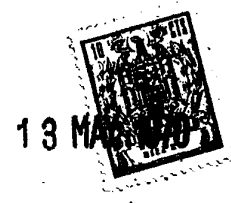
379641

CLASIFICACION TECNICA
CLASIFICACION I.P.C.
CLASE <u>061</u>
SUBCLASE <u>14</u>

PATENTE DE INVENCION
Le A 12 221-Sp.

Memoria Descriptiva

sobre:



PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE ANTIGENOS INACTIVADOS
PARA PREPARADOS FARMACEUTICOS

=====

Solicitante: FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad alemana
residente en Leverkusen-Bayerwerk, Alemania.

=====

13 MAY. 1944



1 Constituye el objeto de la invención, la aplicación de etiletilenimina como agente de inactivación en la preparación de antígenos inactivados para preparados farmacéuticos, por ejemplo vacunas de virus, -

5 Para la producción de tales preparados son necesarios métodos, respectivamente agentes de inactivación que, por un lado, destruyen con seguridad la infecciosidad, debiendo quedar conservada la antigenicidad. A fin de obtener preparados inactivados con seguridad, este proceso ha de desarrollarse en una reacción de primer
10 orden, a fin de que pueda determinarse seguramente el momento de la pérdida total de la infecciosidad. Esto no es el caso con muchos agentes de inactivación usuales, como por ejemplo con la formalina o con la β -propiolactona. Otros agentes que no tienen esta desventaja, son poco estables y presentan, como por ejemplo la acetiletilenimina
15 a la temperatura ambiente una pérdida de actividad incontrolable, -

Ahora se ha encontrado que la etiletilenimina que inactiva los virus en una reacción de primer orden y que conserva la antigenicidad de los mismos y que es bien almacenable también a la temperatura ambiente, puede ser aplicada con éxito como agente
20 de inactivación en la producción de antígenos inactivados para preparados farmacéuticos. -

Se la aplica en cantidades de 0,01 - 1 % (vol/vol). El tiempo de aplicación es, según las condiciones de ensayo, de unas pocas horas hasta 5 días. Se trabaja a temperaturas
25 entre la temperatura ambiente y 40°C. -

379641



1

Ejemplo 1.

5

10

15

20

25

A una suspensión del virus de aftosa (como cepa 0₁, Kaufbeuren) -un representante de los virus conteniendo ácido ribonucleícnico-, en forma de un líquido de cultivo de un cultivo infectado de células primarias de riñones de ternera, se agregó 0,1 % (vol/vol.) de etiletilenimina (EEI) que previamente por instilación de ácido clorhídrico había sido llevada al valor pH neutro. Se guardó la mezcla a 37°C y de la misma se tomó una prueba cada hora. La inactivación fué interrumpida por adición de 10 % en volumen de una solución al 20 % de tiosulfato de sodio. Entonces, las pruebas en estado no diluído y diluídas a decenas de grados fueron inoculadas en cada vez 10 tubitos con células de riñones de ternera en una cantidad de 0,1 ml por inoculación. Los índices de virus así determinados evidenciaron con el aumento del tiempo una caída correspondiente a una reacción de primer orden. Después de un tiempo de acción de 5 horas, ni con la inoculación de la cantidad cinco veces mayor de la cantidad de virus arriba indicado ya no pudo comprobarse ninguna infecciosidad. -

Una solución de virus así tratada durante 6 horas, fué inoculada subcutáneamente en 5 cobayos en una cantidad de 1,5 ml. Ninguno de los animales mostró síntomas de enfermedad, pero en un examen hecho a las 3 semanas a contar de la inoculación, tenían en el suero anticuerpos neutralizantes contra el virus infeccioso de partida no tratado previamente. -

379641

13



1

Ejemplo 2.

5

El procedimiento descrito en el Ejemplo 1, fué repetido con la aplicación de 0,05 % (vol/vol.) de EEI , en lugar de 0,1 % (vol/vol.). También aquí se presentó una caída lineal de la infecciosidad en el transcurso del tratamiento, Al cabo de 11 horas ya no podía comprobarse ninguna infecciosidad, ni después de la inoculación de la cantidad de virus cinco veces mayor. -

10

La inoculación de cada vez 1,5 ml de un virus así tratado durante 24, horas, no produjo en 20 cobayos ningún sintoma de enfermedad. A las tres semanas a contar de la inyección, todos los animales tenían en el suero anticuerpos neutralizantes contra el virus de partida. -

Ejemplo 3.

15

El procedimiento descrito en el Ejemplo 1, fué repetido con la aplicación de 0,05 % (vol/vol.) de EEI, en lugar de 0,1 %, y a una temperatura de acción de 22°C, en lugar de 37°C. También aquí se presentó, a medida que pasó el tiempo, una caída lineal de la infecciosidad. Al cabo de 52 horas, ya no podía constatarse ningún virus infeccioso. -

20

Ejemplo 4.

25

Según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, con la aplicación de 0,05 % (vol/vol.) de EEI , en lugar de 0,1 % (vol/vol.) de EEI , fueron tratados virus de aftosa durante 16, 18 y 24 horas. Con la inoculación de cada vez 9 ml en cultivos de riñones de ternera, así como después de la inyección intramuscular de cada

379641



1 vez 10 ml en 3 lechones predispuestos, no se constató ninguna infección. -

La solución de virus inactivado fué mezclada por partes iguales con el adyuvante competente de Freund y cada vez 2 ml de esta vacuna fueron inoculados en cada vez 5 cerdos. En el suero de todos los animales pudieron constatarse, después de la vacunación, anticuerpos neutralizantes. A las 8 semanas a contar de la vacunación con la vacuna inactivada durante 16 horas, 4 de 5 cerdos y, con las otras dos vacunas, 3 de 5 cerdos eran inmunes contra una infección maciza con el virus activo del mismo tipo; los demás animales se enfermaron más levemente que los animales testigos. -

Ejemplo 5.

Como se ha descrito en el Ejemplo 2, el virus de aftosa fué tratado durante 24 horas con EEI y su caracter inofensivo fué determinado como en el Ejemplo 4. A la suspensión del virus fueron agregados 50 mg/ml de dietilaminoetil-dextrana y esta vacuna fué inyectada subcutáneamente en 20 cerdos en la cantidad de 10 ml por animal. Todos los animales formaron anticuerpos neutralizantes contra el virus activo. A las 8 semanas a contar de la vacunación, 18 de 20 cerdos eran inmunes contra la infección con el virus de aftosa activo del mismo tipo, los otros dos se enfermaron a un grado considerablemente más leve que los animales testigos sin tratamiento previo. -

25

379641



1

Ejemplo 6.

5

10

El procedimiento descrito en el Ejemplo 1, fué aplicado para la inactivación del virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa -un representante de los virus conteniendo ácido desoxiribonucleínico- en lugar del virus de aftosa. Aquí también pudo constatar-se, a medida que pasó el tiempo, una caída de la infecciosidad, correspondiente a una reacción de primer orden. Después de una acción durante 16 horas ya no era comprobable ninguna infecciosidad. Se inyectaron intramuscularmente 2 ml de una solución de virus tratada durante 16 horas a cada uno de 10 cobayos. A las 3 semanas a contar de la vacunación, pudieron constatar-se anticuerpos neutralizantes contra el virus de rinotraqueitis bovina infecciosa en el suero de estos animales. -

Ejemplo 7.

15

El procedimiento descrito en el Ejemplo 6, fué repetido con el empleo de 0,05 % (vol/vol.) de EEI, en lugar de 0,1 %. También aquí se presentó una caída lineal de la infecciosidad y al cabo de 20 horas ya no pudo constatar-se ninguna infecciosidad. -

Ejemplo 8.

20

25

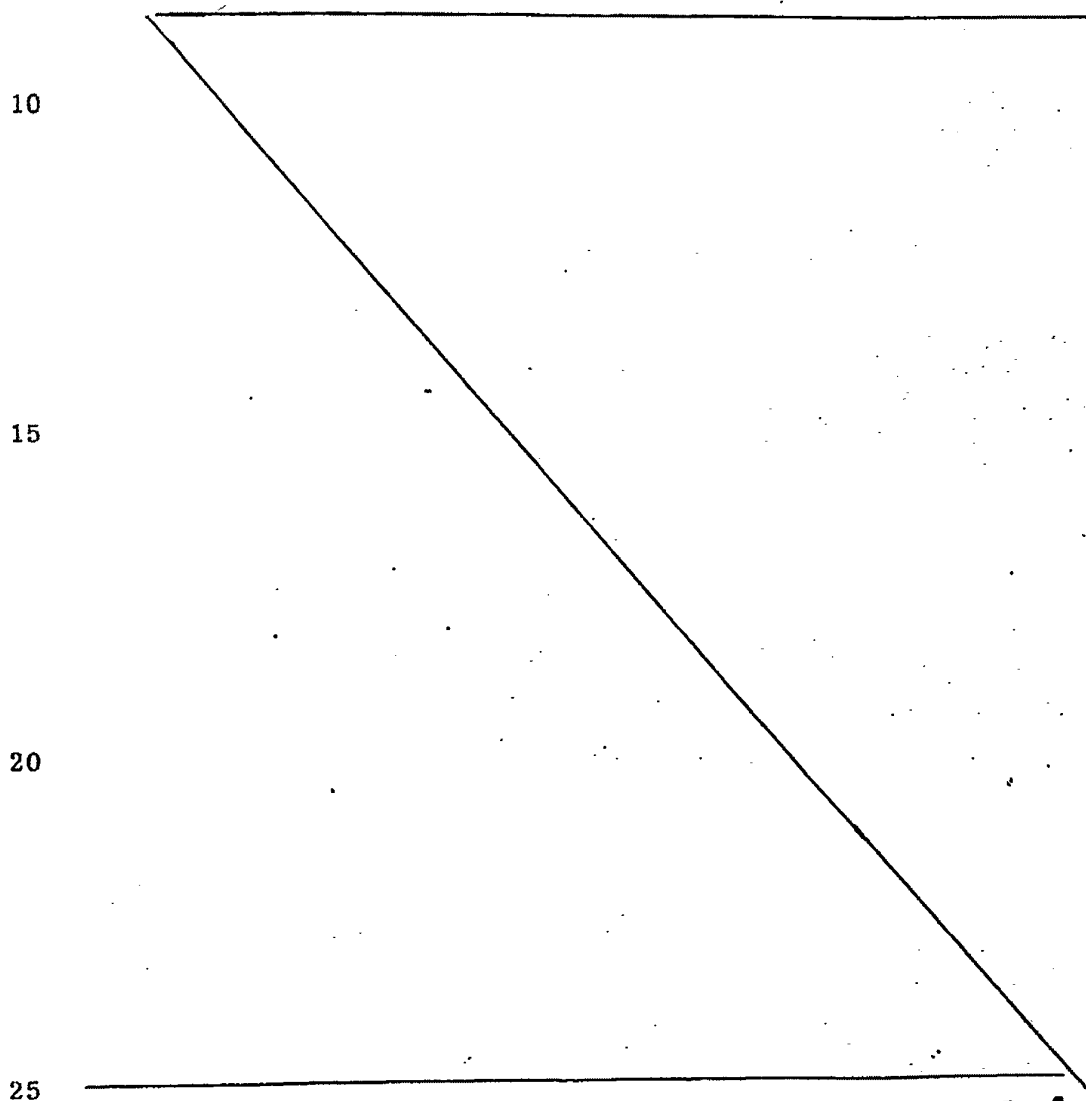
A una suspensión del virus de Sindbis en forma de un líquido de cultivo infectado de células lineales de riñón de Hámster cachorro, fueron agregados paralelamente 0,05 % (vol/vol.) de EEI ya almacenada durante 14 meses a la temperatura ambiente y EEI recién obtenida y almacenada tan solo a 4°C, en la forma descrita en el Ejemplo 1. Cada hora se tomaron pruebas, se las neutralizaron por adición de en total 2 % de tiosulfato de sodio y se las

379641



13 MAY. 1970

1 inocularon, en estado no diluído, así como diluídas a decenas de gra-
dos, intercerebralmente en una cantidad de 0,03 ml en cada vez 5
ratones cachorros. A medida que pasó el tiempo, se perdió, en
forma completamente igual para las dos inactivaciones, la infeccio-
5 sidad de la solución de virus. Esto significaba que la EEI almacena-
da durante 14 meses a la temperatura ambiente había conservado
la misma eficacia que la EEI nueva almacenada bajo enfriamiento. -





N O T A

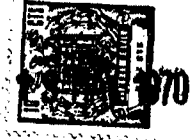
Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente

5. 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 Alemania con el nº P 19 24 303.9 de 13 de mayo de 1969, acogiéndose por lo tanto
10. 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 una Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE ANTIGENOS INACTIVADOS PARA PREPARADOS FARMACEUTICOS, caracterizándose por lo siguiente:
- 15.

1.- Procedimiento de producción de antígenos inactivados para preparados farmacéuticos, tales como vacunas de virus, caracterizado porque comprende inactivar los virus con etiletilenimina.

20. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la etiletilenimina se aplica en cantidades de 0,01- 1% vol/vol.

25. 3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el tiempo de aplicación varía, según las condiciones de ensayo, de una pocas horas hasta



5 días.

4.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la temperatura es del orden de la temperatura ambiente hasta 40° C.

5. 5.- Procedimiento de producción de antígenos inactivados para preparados farmacéuticos, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 9 hojas escritas a máquina por una sola cara.

10.

Madrid,

13 MAY. 1970

FARBENFABRIKEN BAYER A.G.

GOMEZ ACEBO Y MODER
Firmado: F. Hernández B.

379641