



16 FEB

422966

P.- 56.656

Case A 419

ANNULADO
PROMESA DE PATENTE
Y LICENCIA DE COMERCIALIZACIONES

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

A nombre de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED

entidad británica

establecida en 183/193 Euston Road, Londres,
N.W.1, Inglaterra

por: "UN METODO PARA INACTIVAR UN VIRUS"

(Clase Internacional C12k)

15 FEB



Este invento se refiere a un método de inactivar virus, en donde se destruye el poder infectante mientras que se retienen las propiedades antigénicas, y en particular se refiere a la inactivación de virus, del grupo mixovirus.

En la técnica se han descrito diversos intentos para reducir o separar las propiedades infectivas, es decir la capacidad de producir enfermedad, de los virus de tal modo que puedan emplearse en vacunas. Por ejemplo, esto puede efectuarse por atenuación, es decir debilitamiento de la cepa de virus por pasos en serie, que altera el virus de tal modo que pierde sustancialmente toda su patogenicidad sin perder su capacidad de evocar una reacción inmunógena suficiente. Sin embargo, la inmunogenicidad de un virus atenuado es frecuentemente inadecuada y existe siempre el riesgo de que revierta a su estado virulento.

Otro método conocido en la técnica es la inactivación, que comprende la utilización de agentes químicos o físicos, que atacan y desnaturalizan los constituyentes proteínicos fundamentales y otros de los virus, con lo cual los hacen incapaces de multiplicarse. Por ejemplo, se ha demostrado que los miembros del grupo mixovirus pueden inactivarse en



suspensión acuosa por contacto de la suspensión con éter dietílico o con un disolvente halogenado en presencia de un emulsificante hidrófilo, tal como monooleato de polioxietilensorbitan. En este método la
5 capa exterior del virus llega a fragmentarse mientras que la actividad hemaglutinante se retiene o incluso se aumenta. Sin embargo, algunas de las otras propiedades del virus, que también están correlacionadas con la antigenicidad, pueden ser destruidas
10 inadvertidamente y esto puede ser responsable de algunos resultados fallidos cuando las vacunaciones se efectúan con tales vacunas.

También es sabido que la formalina que inactiva los mixovirus y muchos otros tipos de virus, necesariamente desnaturaliza los constituyentes
15 proteínicos de estos organismos. Por ejemplo, en el caso del virus de Sendai, de esta manera se destruye una proporción sustancial de la propiedad hemolítica. Por consiguiente, aunque la actividad hemaglutinante, usualmente asociada con las propiedades
20 inmunógenas de los mixovirus y ciertos otros virus, se retienen usualmente cuando se emplean dichos métodos de inactivación, la destrucción total o parcial de la actividad hemolítica u otra actividad
25 antigénica puede ser responsable de la protección



insuficiente puesta de manifiesto con algunas vacunas obtenidas por inactivaciones de acuerdo con métodos conocidos y preferidos.

Recientemente se ha demostrado por Apostolov, K., (J. Gen. Virol., 1972, 15, 227-234) que la hemolisis está asociada con una capa granular fina, que ha sido denominada "capa nanogranular". Esta capa nanogranular, que es la capa más interna de las capas del virus, comprendiendo los componentes centrales, puede experimentar lisis y fusionarse con la membrana de un glóbulo rojo después de la unión a la misma por medio de dientes sobre la superficie del virus. Esto es seguido por la descarga de los componentes internos del virus en el glóbulo rojo con la extrusión subsiguiente de la hemoglobina a través de las roturas de la parte inestable de la membrana integrada. Por consiguiente, se cree que la capa nanogranular es muy importante, para el proceso de hemolisis y consecuentemente se le atribuye ser responsable de alguna de las propiedades antigénicas de los virus. Por consiguiente se considera deseable que la capa nanogranular y también cualquier otro componente proteínico, que se destruya usualmente por la acción de los agentes químicos, debe permanecer intacto después de la inactivación.



Se ha descubierto ahora que puede conseguirse la inactivación completa por tratamiento con calor de un virus que previamente ha sido liofilizado en presencia de un estabilizador proteínico.

5 Tal tratamiento puede emplearse para cualquier tipo de virus con la condición de que sea capaz de ser liofilizado. Por ejemplo, frecuentemente se ha puesto de manifiesto una gran dificultad durante el liofilizado de los picornavirus y por consiguiente se
10 recomienda que el método de inactivación del presente invento no se aplique a dichos tipos de virus.

También se ha descubierto que cuando se emplea el método de inactivación de este invento para virus que poseen una capa nanogranular el virus
15 se inactiva mientras que la capa permanece sin destruir. Esto es particularmente ventajoso para aquellos virus que son capaces de experimentar hemólisis puesto que la actividad hemolítica asociada con la capa nanogranular de tales virus, puede incluso
20 ser mejorada por el tratamiento. Esto es bastante sorprendente puesto que se ha demostrado por diversos autores (Kohn, A., *Virol*, 1965, 26, 228 y Apostolov, K., *J. Gen. Virol.*, publicación pendiente), que la propiedad hemolítica es más sensible al calor
25 que la propiedad hemaglutinante.



16 FEB

Por consiguiente, se proporciona un método para inactivar un virus, que comprende liofilizar el virus en presencia de un estabilizador proteínico y calentar la preparación de virus y estabilizador así obtenida a una temperatura elevada durante un tiempo suficiente para efectuar la inactivación completa.

La temperatura precisa utilizada dependerá del tipo de virus que se inactive, pero ventajosamente se encuentra dentro del intervalo de 50 a 150°C, preferiblemente 90 a 125°C. También el período de tiempo durante el cual se calienta la preparación dependerá de la temperatura a la que se efectúa la inactivación. Evidentemente, una temperatura elevada requerirá menos tiempo que una temperatura baja para inactivar el virus. Sin embargo, si se selecciona una temperatura en el margen de 90 a 125°C, el período de tiempo debe ser sustancialmente menor de una hora, por ejemplo 5 a 35 minutos.

Los estabilizadores proteínicos adecuados que pueden emplearse en el presente invento incluyen un complejo, por ejemplo SPGA, de sacarosa, fosfato, glutamina, y, el más importante, albúmina (vide Bovarnick, M.R., J. Bacteriol., 1950, 59, 509). Sin embargo, debe advertirse que el SPGA puede ser



inadecuado para empleo a temperaturas mayores de 115°C, debido a la caramelización del componente de azúcar. También pueden ser adecuados complejos similares sin el componente de azúcar y con el componente de albúmina reemplazado por otras proteínas, por ejemplo caseína, con o sin componentes de fosfato o glutamina.

Los estabilizadores proteínicos preferidos son lisatos de proteínas que consisten en gelatina degradada por calor o por ácido, por ejemplo "Sol-U-Pro" y que pueden emplearse con o sin sorbita.

La cantidad de estabilizador proteínico que debe emplearse normalmente es como mínimo 0,1 μ g por unidad de hemaglutinación, por ejemplo de 1 a 30 μ g por unidad de hemaglutinación en el caso del virus de Sendai, aproximadamente 25 mg por unidad de hemaglutinación en el caso del virus de la triquinosis y aproximadamente 3 mg por unidad de hemaglutinación en el caso del virus de la gripe. El estabilizador proteínico en exceso, por ejemplo cantidades mayores en varias magnitudes, no se considera que sea perjudicial.

El presente invento también proporciona un virus siempre y cuando haya sido inactivado de



acuerdo con el método que se define en lo que antecede.

Los virus que son capaces de ser liofilizados incluyen los miembros de los grupos mixovirus y adenovirus. El grupo mixovirus en particular incluye el grupo ortomixovirus, que comprende M. influenzae-A, M. influenzae-B y M. influenzae-C y M. multiformae (virus de la enfermedad de Newcastle), y el grupo de paramixovirus que comprende M. parainfluenzae-1 (por ejemplo, la cepa conocida como virus de Sendai), M. parainfluenzae-2 (virus de la laringotraqueobronquitis aguda), M. parainfluenzae-3 (virus de la hemadsorción), M. parainfluenzae-4 (virus M.25), M. pestigalli (virus de la peste de las aves) M. parotidis (virus de las paperas), virus de la triquinosis, virus del moquillo, virus de la morriña, y virus sincitiales respiratorios.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la aplicación del método de inactivación de este invento preserva la capa nanogranular, mientras que el mixovirus propiamente dicho se inactiva.

Por consiguiente, se proporciona un mixovirus inactivado que tiene una capa nanogranular sustancialmente intacta.

Los virus se desarrollan usualmente en



huevos fertilizados o sistemas de cultivo de células y se disponen en una forma exentas de células por técnicas de purificación apropiadas. El medio que contiene el virus, sustancialmente exento de restos de células y otros contaminantes contiene usualmente agentes para ajustar el pH y la molalidad osmótica de la solución tal como agentes amortiguadores del pH y sales inorgánicas, por ejemplo fosfato o veronal y soluciones salinas, respectivamente.

10 La concentración de virus vivo en la suspensión se determina usualmente por ensayos de hemaglutinación. Estos ensayos implican diluciones en serie de la suspensión de virus hasta que se determina la dilución última que da hemaglutinación del

15 50% con el mismo volumen de suspensión de eritocito al 0,5%. El inverso de este valor es el índice de hemaglutinación. La concentración de virus puede también determinarse por medida de alguna otra propiedad viral, tal como la infectividad o la fijación

20 de complemento. Estos métodos pueden preferirse cuando el virus no aglutina los glóbulos rojos o la concentración del virus no se mide normalmente por hemaglutinación. Para los fines del presente invento, la cantidad de virus presente en una muestra se expresa

25 en unidades de hemaglutinación, que es el va-



lor del índice que, se ha definido anteriormente.

El estabilizador proteínico, puede mezclarse en cantidades apropiadas con la suspensión de virus y colocarse en recipientes adecuados tales como ampollas o viales de vidrio. La suspensión resultante puede liofilizarse luego de acuerdo con la práctica y las técnicas conocidas. Por ejemplo, la suspensión puede congelarse a una velocidad de aproximadamente 1°C/minuto hasta que se alcanza una temperatura final de -30 a -40°C. Luego se hace el vacío en la cámara, y tan pronto como se obtenga un vacío de 0,03 a 0,05 torr, se eleva la temperatura a entre 0 y -10°C y se efectúa el secado primario durante 12 a 20 horas. La temperatura de la cámara se eleva luego más hasta entre 25 y 35°C, y se efectúa un secado secundario durante 2 a 10 horas, después de lo cual el recipiente se cierra herméticamente a vacío.

La preparación de virus liofilizada y el estabilizador pueden calentarse luego en un baño líquido o cualquier otro dispositivo de calentamiento adecuado con el fin de efectuar la inactivación del virus. El virus resultante puede constituir la vacuna primaria y puede emplearse como tal después de un tratamiento de ensayo adecuado. Si se prefiere, la vacuna puede ser mejorada adicionalmente por purifi-



cación o concentración por métodos conocidos.

Se ha encontrado que estas vacunas, inactivadas por calor, tienen propiedades de conservación muy ventajosas comparadas con otras, en las que el virus ha sido inactivado químicamente. Por ejemplo los virus tratados con formalina, que son los componentes comunes de muchas vacunas, frecuentemente, experimentan una descomposición parcial después de aproximadamente dos años, en vistas de la acción indeseable retardada del formaldehído residual. Por otra parte, los virus, liofilizados e inactivados por calor, pueden conservarse tanto tiempo como sea posible sin ninguna descomposición sustancial.

Por consiguiente, el presente invento, también proporciona una vacuna para los seres humanos y animales sensibles contra las infecciones causadas por virus virulentos productores de enfermedades, vacunas que comprenden partículas de un virus apropiado, inactivado por el método que se describe en lo que antecede e inmunógeno con respecto a la misma enfermedad, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por consiguiente pueden combinarse partículas de virus por simple mezcla con un componente vehículo adecuado, que puede ser sólido, líquido o



gas que deseablemente es inerte o aceptable en medicina, ya sea antes de la conservación, preferiblemente a temperaturas reducidas, o inmediatamente antes del uso. El vehículo también puede estar representado por un recipiente hermético que incorpora las partículas de virus. Si se desea, también pueden estar presentes en la vacuna otras sustancias farmacológicamente activas, vacunas que preferiblemente se encuentran presentadas en forma de dosis unitaria o múltiple, que representa una dosis eficaz para el individuo o individuos que han de vacunarse.

Para administración por vía parenteral, la vacuna puede administrarse en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiples, en suspensiones acuosas o no acuosas que contienen antioxidantes, agentes amortiguadores del pH, y solutos que hacen que la vacuna sea isotónica con la sangre. Si se desea, pueden también incluirse estabilizadores, agentes de suspensión y agentes espesadores.

Para penetración por vía oral, las partículas de virus pueden encontrarse presentes con diluyentes y otros vehículos.

Aunque las rutas de administración anteriormente detalladas representan las que se emplean con mayor probabilidad, no necesariamente se agotan



con ellas las posibilidades, que pueden incluir administración tópica y por vía rectal. Sin embargo, los métodos preferidos de administrar la vacuna son por vía parenteral y por vía oral. El método particularmente preferido es la administración por vía parenteral.

El presente invento proporciona además un método para la prevención o tratamiento de una enfermedad en animales y seres humanos, que comprende la administración de una dosis eficaz de una vacuna a un animal o ser humano.

Serán evidentes ventajas adicionales del presente invento de la siguiente descripción de realizaciones del invento, realizaciones que no limitan este invento en ningún modo.

Ejemplo 1

Se preparó una cepa de virus de Sendai M34996 tal como se describe por Apostolov, K, et al (J. Gen. Virol., 1972, 15, 227-234), excepto, que después de concentración, el virus, obtenido del fluido alantoico de 100 huevos, no fue congelado sino puesto en suspensión en 4 ml de solución salina de veronal tamponada (preparada disolviendo barbitona sódica (0,375 g), ácido dietil-barbitúrico (0,575 g), cloruro sódico (8,5 g), cloruro magnésico hexahidra-



tado (0,17 g), y cloruro cálcico (0,03 g) en agua destilada y completando la solución resultante hasta un litro a una temperatura de 4°C.

1 ml de la suspensión de virus fue mezclada con 39 ml de una solución al 5% (peso/volumen) de "Sol-U-Pro" en agua destilada (4°C) y muestras de 1 ml de la suspensión de virus resultante se colocaron en viales de vidrio. Estos viales fueron luego colocados en un liofilizador de cámara (modelo EF6, Edwards High Vacuum Ltd. Crawley, Inglaterra) en estantes previamente enfriados (-40°C) y enfriados a una velocidad de 1°C/minuto hasta que se hubo alcanzado una temperatura de -35°C. La cámara fue evacuada subsiguientemente, y, tan pronto como se hubo obtenido un vacío de 0,03 a 0,05 torr, la temperatura de los estantes se elevó hasta -5°C y se efectuó el secado primario durante 16 horas.

La temperatura de los estantes fue luego elevada más hasta 30°C, y se realizó el secado secundario durante 6 horas, después de lo cual los viales fueron cerrados herméticamente bajo vacío con tapones de caucho.

Finalmente los viales fueron sumergidos en un baño de agua a 100°C, durante 20 minutos, después de lo cual los virus fueron ensayados en cuanto



a sus actividades hemolíticas (HL), de hemaglutinación (HA) e infecciosa. Una muestra de la suspensión de virus antes de la liofilización también fue ensayada en cuanto a estas actividades para fines de comparación.

	VIRUS TESTIGO	VIRUS TRATADO
Indice de HA	1024	1024
*Actividad HL	0,38	1,0

*La actividad HL se expresa como el valor de la densidad óptica de la hemoglobina a 415 nm.

El virus tratado fue ensayado en cuanto a su infectividad por inoculación en la cavidad alantoica de pollos de diez días. Después de una incubación de cinco días a 35°C, no se puso de manifiesto indicios de infección.

Ejemplo 2

Se preparó virus de Sendai, liofilizado, calentado y ensayado tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, empleando SPGA (preparada por adición de sacarosa (94,7 g), dihidrógeno-fosfato potásico (0,7 g), hidrógeno-fosfato dipotásico (1,6 g), glutamato monosódico (1,2 g), albúmina de bovino (12,7 g) y 1,3 ml



16 FEB.

de solución de rojo fenol al 1% a 1 litro de agua destilada, agitando la solución y filtrando), en lugar de la solución al 5% (peso/volumen de "Sol-U-Pro" en agua destilada.

5

	VIRUS TESTIGO	VIRUS TRATADO
Indice de HA	1024	1024
Actividad HL	0,14	0,25

10

La infectividad fue ensayada del mismo modo que se ha descrito en el Ejemplo 1, y no se encontró que se pusiera de manifiesto.

15

Ejemplo 3

La cepa de Edmonston del virus de la triquinosis fue propagada en células de Vero (capas de células de riñón de mono crudas transformadas) en presencia de medio de Eagle y suero de ternera al 2% (vol/vol). Cuando las células mostraban un efecto citofático máximo (al final de ocho días de incubación a una temperatura de 37°C), el medio sobrenadante fue recogido y luego centrifugado (11 x 10⁴ G durante 30 minutos) para recoger el virus. El gránulo de virus fue vuelto a poner en suspensión en 20 ml de medio

20

25



de Eagle (21°C) y 4 ml de esta suspensión fueron mezclados adicionalmente con 1 ml de solución al 25% (peso/volumen) de "Sol-U-Pro" en agua destilada a una temperatura de 21°C.

5 Muestras de 1 ml de la suspensión de virus resultante fueron colocadas en viales de vidrio y puestas en un liofilizador de cámara en estantes previamente enfriados (-40°C) y enfriados a una velocidad de 1°C/minuto. hasta que se hubo alcanzado una
10 temperatura de -35°C. A la cámara se le hizo posteriormente el vacío, y tan pronto como dicho vacío hubo alcanzado un valor de 0,03 a 0,05 torr la temperatura de los estantes se elevó hasta -5°C, y se efectuó el secado primario durante 16 horas.

15 La temperatura de los estantes fue luego elevada adicionalmente hasta 30°C, y se realizó el secado secundario durante 6 horas, después de lo cual los viales fueron luego cerrados herméticamente bajo vacío con tapones de caucho.

20 Los viales que contenían el virus liofilizado fueron calentados después a 100°C durante 15 minutos en un esterilizador, después de lo cual los virus fueron ensayados en cuanto a actividad hemolítica (HL), de hemaglutinación (HA) e infecciosa. Una
25 muestra de la suspensión de virus antes de la liofi-



lización fue también ensayada en cuanto a estas actividades para fines de comparación.

5

	VIRUS TESTIGO	VIRUS TRATADO
Indice de HA	2	2
Actividad HL	0,019	0,027

10

La infectividad del virus fue determinada por valoración de diluciones en serie del virus en una cantidad patrón de células de Vero en tubos. El punto final estaba en el tubo que mostraba un efecto citofático del 100% a la dilucción más elevada. En este caso, los virus de la triquinosis no mostraban infectividad después del tratamiento por calor.

15

Ejemplo 4

La cepa WRL55 para una vacuna con virus de la gripe (composición antigéna H₃N₂, con el tipo 1972 de hemaglutinina) fue desarrollada en el saco alantoico de huevos de pollo embrionados de diez días durante 54 horas a 35°C. Los fluidos alantoicos recogidos fueron clarificados por centrifugación a 2.000 revoluciones/minuto durante 15 minutos, filtrados a

20

25



través de un filtro Millipore, de 0,8 μ m., y luego
diluidas en solución salina tamponada de fosfato
que contenía 5% (peso/volumen) de "Sol-U-pro" y 7,5%
(peso/volumen) de sorbita. Este material se liofiliz-
5 zó en volúmenes de 6 ml en viales de vidrio de 24 ml
de capacidad en un liofilizador de cámara (Edwards
High Vacuum, Modelo L20) con las condiciones que se
han descrito en el Ejemplo 1, excepto que los tiem-
pos para los secados primarios y secundarios fueron
10 respectivamente 16 y 32 horas. La estabilidad de la
hemaglutinina de este material liofilizado fue inves-
tigada en términos de (1) su antigenicidad, y (2) su
inmunogenicidad.

1. Estabilidad, al calor de la antigenicidad
15 de las hemaglutininas.

Viales del virus liofilizado fueron coloca-
dos en un baño de agua a ebullición, y después de 15
y 30 minutos se retiraron muestras. Las muestras fue-
ron reconstituidas con 6 mililitros de agua destila-
20 da por vial, y ensayadas como sigue:

Su infectividad fue medida por muestras de
inoculación (0,2 ml) en el saco alantoico de huevos
embrionados de 10 días. Después de que se habían in-
cubado durante 3 días a 36°C, sus fluidos alantoicos
25 fueron recogidos y ensayados en cuanto a la presencia



de hemaglutinina, empleando eritrocitos de aves. La infectividad fue calculada en la forma usual a partir de la proporción de los fluidos alantoicos que se encontró que contenían hemaglutinina.

5 El índice de hemaglutinación del material secado fue medido valorándolo en una planta de aglutinación de plástico, empleando eritrocitos de aves al 0,5%.

10 La especificidad antigénica de la hemaglutinina se determinó por examen en ensayos de hemaglutinación-inhibición empleando suero de urón específico. Estos sueros fueron preparados contra A/Engl/42/72 y contra A/Hong Kong/68. Estas cepas de virus eran ambas H_3N_2 en estructura, y las hemaglutininas eran
15 muy afines, pero eran de los tipos 1972 y 1968, respectivamente.

Una muestra del virus no calentado se empleó como testigo en cada uno de estos ensayos, y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

20

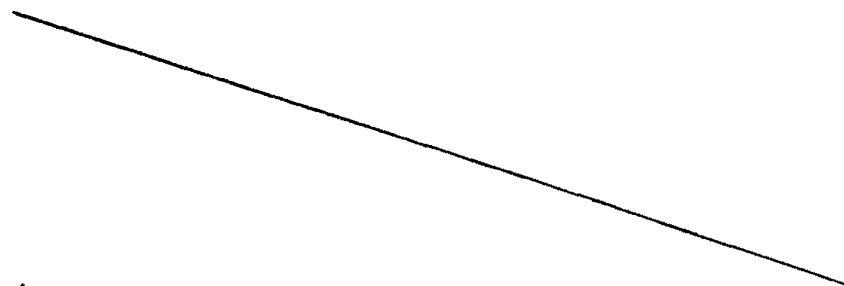




TABLA 1

ENSAYO	VIRUS NO CALEN TADO	VIRUS CALENTADO A 100°C			
		15 Min		30 Min	
		Muestra A	Muestra B	Muestra A	Muestra B
Valoración de la Infec tividad (EID ₅₀ /2 ml)	10 ^{7,1}	<10 ⁰	<10 ⁰	<10 ⁰	<10 ⁰
Indice de he maglutina ción (HAU/ml)	16	12	16	16	16
Especificidad antigena	1972 H ₃ N ₂	1972 H ₃ N ₂	1972 H ₃ N ₂	1972 H ₃ N ₂	1972 H ₃ N ₂

Estos resultados muestran que el calentamiento a 100°C durante 15 ó 30 minutos en estado liofilizado conduce a una pérdida de la infectividad del virus, pero el índice de hemaglutinación y la capacidad de la hemaglutinina para reacción con antisueros específicos en ensayos de hemaglutinación-inhibición permanecían sin afectar.

2. Estabilidad al calor de la inmunogenicidad de la hemaglutinina

También fue estudiada la inmunogenicidad de



la hemaglutinina calentada. Se preparó otra tanda de vacuna de WRL55 exactamente tal como se ha descrito anteriormente. Cuarenta y cuatro frascos de vacuna fueron calentados en un baño de agua en ebullición durante 15 minutos y el mismo número de viales fueron mantenidos como testigos no calentados. Las muestras fueron reconstituidas con agua destilada (6 ml/vial) y luego concentradas 200 veces por centrifugación en un rotor Spinco SW27 a una velocidad de 26.000 revoluciones/minutos durante una hora. Los gránulos así obtenidos fueron puestos en suspensión cada uno en solución salina tamponada de fosfato (0,9 ml) los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

15

TABLA 2

ENSAYO	CALENTAMIENTO A 100°C	VACUNA ORIGINAL	VACUNA CONCENTRADA
Indice de hemaglutinación (HAU/ml)	No calentado Calentado	16 16	1920 2560
Valoración de la infectividad (EID ₅₀ /2 ml)	No calentado Calentado	10 ^{6.85} <10 ⁰	

20



Para investigar la inmunogenicidad de los materiales concentrados, se inyectaron muestras (0,3 ml) en músculos de pollos de cuatro a cinco semanas (3 pollos por concentrado). Tres semanas más tarde se tomaron muestras de sangre, y los sueros fueron ensayados por el ensayo de hemaglutinación-inhibición empleando un virus homólogo como antígeno. Dentro de los límites del error experimental no pudieron detectarse diferencias en la inmunogenicidad de las muestras de virus calentados y no calentados.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 7 de Febrero de 1973, bajo el Nº 5936/73, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



REIVINDICACIONES

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Un método para inactivar un virus, que comprende liofilizar el virus en presencia de un estabilizador proteínico y calentar la preparación de virus y estabilizador así obtenida a una temperatura elevada durante un tiempo suficiente para completar el efecto de inactivación.

2ª.- Método de acuerdo con la reivindicación 1ª, que comprende calentar a una temperatura de 50 a 150°C.

3ª.- Método de acuerdo con la reivindicación 2ª, que comprende calentar a una temperatura de 90 a 125°C durante 5 a 35 minutos.

4ª.- Método de acuerdo con la reivindicación 3ª, que comprende calentar a 100°C durante 20 minutos.

5ª.- Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende emplear un estabilizador de lisato de proteína que



16 FEB

contiene gelatina degradada por ácidos.

6^a.- Método de acuerdo con una cualquiera
de las reivindicaciones anteriores, que comprende
emplear un estabilizador de lisato de proteína que
5 contiene gelatina degradada por calor.

7^a.- Método de acuerdo con cualquiera de
las reivindicaciones 5^a y 6^a, que comprende emplear
un lisato de proteína en presencia de sorbita.

8^a.- Método de acuerdo con una cualquiera
10 de las reivindicaciones 1^a a 4^a, que comprende em-
plear un compuesto de albúmina, azúcar, fosfato y
glutamina.

9^a.- Método de acuerdo con una cualquiera
de las reivindicaciones 5^a a 8^a, que comprende em-
15 plear de 1 μ g a 30 mg de estabilizador proteínico
por unidad de hemaglutinación.

10^a.- Método de acuerdo con una cualquiera
de las reivindicaciones anteriores, que comprende em-
plear un adenovirus.

20 11^a.- Método de acuerdo con una cualquiera
de las reivindicaciones 1^a a 9^a, que comprende emplear
un mixovirus.

12^a.- Método de acuerdo con la reivindi-
cación 11^a, que comprende emplear un mixovirus capaz
25 de hemolisis.

10 JUN. 1974



13ª.- Un método para inactivar un virus.

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

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

Madrid, 10 JUN. 1974

P.A.

Alberto de Elizaso


11.2.74
H.M.C.

- 26 -