

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

(19) ES	(11) NUMERO	(10) A 1
(21)	462.588	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	23.9.77	

5 OCT. 1978

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
P 26 43 213.3	25.9.76	Rep. Federal Alemana.

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K	

(64) TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE VACUNAS, POR TRATAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN UN CAMPO ELECTRICO DE CORRIENTE ALTERNA.

(71) SOLICITANTE (S)
BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana.

(72) INVENTOR (ES)
Dr. Otto Christian Straub

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO.

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento, técnicamente avanzado, para la obtención de vacunas (tanto de vacunas vivas como también de vacunas muertas).

5 Ya es conocido que se pueden debilitar los microorganismos, especialmente las bacterias y virus mediante un número de pasadas (cultivos de tejido ó bien animales vivos u orgánicos, etc.) con lo que los virus y bacterias así atenuados, si bién son capaces de multiplicarse, sin embargo han perdido su patogenicidad. Tales virus atenuados han mantenido sin embargo su inmunogenicidad (vacunas vivas). La desventaja de estos procedimientos de atenuación, varias veces descritos en la literatura (vease por ejemplo, la publicación alemana 20 33 946), es ante todo el enorme tiempo y trabajo, que es necesario hasta que por las pasadas se ha alcanzado el grado de atenuación deseado.. Asi se puede contar en una atenuación a través de por ejemplo 100 pasadas por cultivo de tejido con una duración de la atenuación de aproximadamente un año.

20 También es conocido que los micrororganismos, preferentemente las bacterias y virus, se pueden inactivar con ayuda de agentes químicos (asi llamados "agentes inactivadores"). Como agentes de inactivación entran en consideración una serie de distintas sustancias químicas y clases de sustancias, por ejemplo, formaldehido, etilenimina y sus derivados, glutaraldehido, β -propiolactona, fenol, peróxido de hidrógeno y distintos otros.

25 Los procedimientos conocidos, sin embargo, no siempre se pueden emplear con todos los microorganismos, la duración de la inactivación con distintos agentes inactivadores (por ejemplo, formaldehido) es en parte larga.

30

También es conocido que, por ejemplo, por la actuación de calor o de luz ultravioleta se puede realizar una inactivación de microorganismos.

Los procedimientos de inactivación conocidos
5 tienen en parte distintas desventajas, así se destruye en parte la constitución determinante de los antígenos de los microorganismos, por ejemplo, de los virus. Además es algunas veces difícil provocar una destrucción total de las propiedades infecciosas de los microorganismos y al mismo tiempo mantener
10 las propiedades antigénicas. En parte es posible, por recombinación y/o mutación que bajo circunstancias algunos microorganismos inactivados recuperen sus propiedades infecciosas. Además, por ejemplo en la realización de la inactivación con formaldehído o bajo los efectos de la luz ultravioleta, existe
15 el peligro de la formación de aglomerados, con lo que bajo circunstancias cantidades parciales de los microorganismos infecciosos no resultan inactivados.

Se ha descubierto ahora que microorganismos, preferentemente bacterias y virus, pero también micoplasmas y
20 clamidios, se pueden inactivar mediante tratamiento en un campo eléctrico de corriente alterna o bien debilitar en suspensión, y preparar de ellas vacunas vivas ó bien muertas.

Mediante la obtención de vacunas vivas o bien muertas, según el procedimiento de la presente invención, se evitan
25 las desventajas anteriormente descritas de los procedimientos de atenuación o bien de inactivación hasta ahora dados a conocer. El procedimiento de la presente invención representa, por lo tanto, un gran progreso sorprendente en el terreno de la medicina humana y veterinaria.

30 El procedimiento de la presente invención se rea

liza en un recipiente de reacción bajo condiciones esteriles. Han demostrado ser convenientes los aparatos que se aprecian en las figuras 1 y 2. El aparato (1) se compone de una botella plana de vidrio con tres aberturas. La abertura en el cuello de la botella (3) está cerrada por un tapón que contiene un tubo de salida cerrado por una válvula, las otras dos aberturas están asimismo cerradas por tapones a través de los cuales se conducen los electrodos de metal noble, por ejemplo, oro, platino o plata, preferentemente plata, pero también aleaciones de metales nobles, que se conectan a una fuente eléctrica de tensión de corriente alterna (1), (2). Para el control se ha dispuesto en la botella un termómetro (5).

En el recipiente de vidrio se encuentra la suspensión de microorganismos a tratar con la corriente eléctrica alterna. Las condiciones de ensayo a seleccionar (temperatura, duración del tratamiento con corriente eléctrica alterna, tensión de la corriente alterna, intensidad de corriente, valor pH, etcétera) dependen de la constitución del microorganismo a tratar y del efecto que se desee lograr por el procedimiento de la presente invención (por ejemplo, atenuación a vacuna viva o bien inactivación a vacuna muerta). Además, el efecto de los distintos factores está en parte acoplado entre sí de manera que una menor intensidad de corriente se puede compensar, por ejemplo, por un tiempo de actuación más largo de la corriente alterna.

Para lograr mayores valores de tensión y de intensidad se puede dotar el recipiente también de un envolvente refrigerador.

El aparato para el así llamado procedimiento de paso está representado en la figura 2.

Aquí fluye la suspensión de microorganismos a tratar a través de la espita de dos direcciones (A) provista de una válvula hacia el recipiente (B). A través de la bomba de dos direcciones (C) se bombea la suspensión de microorganismos a través de los electrodos (D), en caso dado dotados de un envolvente refrigerador (E). Desde el recipiente (F) se efectúa la salida a través de una espita de dos direcciones (G) provista de una válvula. B₁ y F₁ son dispositivos para la entrada y salida del aire. Aquí se emplea en caso dado aire esterilizado.

El sistema de flujo esbozado en la Fig. 2 es muy adecuado para la obtención de vacunas (tanto vacunas vivas como también vacunas inactivadas).

Como microorganismos se pueden emplear en el procedimiento de la presente invención todas aquellas sustancias que, por lo demás, también por atenuación a través de pasadas a través de cultivos de tejidos o animales ó bien por inactivación con ayuda de métodos químicos o físicos, se pueden transformar en vacunas vivas o bien vacunas muertas.

Como ejemplos sean mencionados:

Los virus RNS de los siguientes grupos: virus de plantas en forma de bastón. virus picorna, virus toga, virus rabdo, retroviridae, virus arena, virus ortoamixo, virus paramixo, corona- y orbirios, virus RNS de doble tramo, virus DNS de los siguientes grupos: DNS-fagos pequeños, parvo, reovirus, adenovirus, papovavirus, fagos de tamaño medio, fagos grandes, herpesvirus, virus iridoviridae, virus paravecinales, virus de viruela, virus adeno acompañantes.

Como bacterias que entran en consideración sean mencionadas:

Las bacterias del orden Eubacteriales (bacterias sin ramificar),

preferentemente de la clase Neisseria, Streptococcus, Leuconostoc, Pseudomonas, Escherichia, Serratia, Proteus, Salmonella, Pasteurella, Brucella, Haemophilus, Corynebacterium, Clostridium.

- 5 Las bacterias del orden Actinomycetales, preferentemente de la clase Streptomyces; las bacterias del orden Spirochaetales preferentemente de la clase Leptospira.

En caso de que se deseen obtener microorganismos atenuados, es decir, no patógenos, pero aún totalmente inmunógenos, vivos en forma de vacunas vivas, han demostrado ser convenientes, según los microorganismos empleados, las siguientes condiciones de procedimiento:

Tensión de corriente alterna: entre otras se trabaja convenientemente con la tensión de red disponible que, dentro del marco de la presente invención, fué, en los ensayos realizados, de 220 V. Naturalmente también se puede trabajar con otras tensiones, por ejemplo, 110 ó 330 V. En un caso de estos se deberan compensar las demás condiciones de reacción.

Intensidad de corriente: Con una tensión alterna de 220 V ha demostrado ser conveniente una intensidad de corriente de 200 hasta 300 mA. Naturalmente son posibles, en dependencia de la tensión de corriente y la constitución de la solución, también otros valores de intensidad de corriente.

Temperaturas: El tratamiento con la corriente eléctrica alterna se efectua, entre otras, a temperaturas desde 4 a 60°C, preferentemente entre 20 y 40°C y muy especialmente entre 37°C y 39°C (margen de temperatura fisiológico). La temperatura empleada depende por ejemplo de la termoestabilidad de los microorganismos empleados.

30 La temperatura de los microorganismos o bien suspensiones de

microorganismos a tratar se puede ajustar, con tensión de corriente mantenida igual, variando la intensidad de la corriente de manera que en la suspensión de los microorganismos a tratar se encuentra un valor de temperatura constante.

5 Duración del tratamiento con la corriente eléctrica alterna:

Para el tratamiento con la finalidad de obtener vacunas vivas a base de microorganismos atenuados (preferentemente bacterias y virus) ha demostrado ser conveniente un tiempo de tratamiento de 5 hasta 300 minutos, especialmente de 30 hasta 240 minutos. Pero en dependencia de la naturaleza del microorganismo empleado y de las demás condiciones de ensayo utilizadas (tales como por ejemplo, temperatura, agente de suspensión, tensión de la corriente e intensidad de corriente) también son posibles tiempos por debajo de 5 o bien por encima de 300 minutos.

Además es importante el grado de atenuación que se haya de alcanzar, mensurable mediante experimentos con animales en sí conocidos.

En caso de que con ayuda del procedimiento de la presente invención se deseen obtener microorganismos inactivados para su empleo en vacunas muertas, valen las mismas indicaciones respecto a tensión de corriente alterna, intensidad de corriente y temperaturas, efectuadas para la obtención de microorganismos atenuados para empleo en vacunas vivas.

25 El procedimiento para el tratamiento de los microorganismos con corriente alterna eléctrica es en la inactivación de los microorganismos el mismo como en la atenuación de los microorganismos.

La inactivación según el procedimiento de la presente invención exige, sin embargo, por lo general, mayor gas-

to en tiempo y en energía.

Así, el proceso de inactivación según el procedimiento de la presente invención (véase Fig. 1) dura por lo general 10 hasta 72 y preferentemente 15 hasta 48 horas.

5 Sin embargo, en dependencia de la naturaleza del microorganismo empleado y de las demás condiciones de ensayo utilizadas (tales como, por ejemplo, condiciones de flujo (Fig. 2), temperatura, agente de suspensión, tensión de corriente e intensidad de corriente), también son posibles valores inferiores
10 a 10 y superiores a 72 horas.

Como materiales de partida se emplean en el procedimiento de la presente invención por lo general suspensiones acuosas de los microorganismos arriba mencionados. Preferentemente se emplean aquellos medios en los cuales se cultivan los microorganismos a tratar, tales como, por ejemplo,
15 medio según Earle, en caso dado bajo adición de hidrolizado de lactalbumina o los siguientes otros medios: medio de Eagle, medio de Hanks, medio PM-13 (Serva), medio VM-3a, medio MEM, etcétera.

20 Los productos finales que se obtienen después del tratamiento con corriente eléctrica alterna, que contienen los microorganismos atenuados o inactivados, se aplican, bien como tales en forma esterilizada, o según métodos usuales, en si conocidos, formulándose a vacunas vivas o muertas y se administran como solución, jarabe, emulsión, suspensión, spray,
25 unguento, pasta, crema, loción, aerosol, tabletas, etcétera.

Las formulaciones se preparan en forma en si conocida, por ejemplo, por dilución de los microorganismos atenuados o inactivados según la presente invención, en disolventes adecuados y/o excipientes inertes no tóxicos, sólidos,
30

semisólidos o líquidos, en caso dado empleando agentes de emulsión o/y de dispersión, de pulverización y propulsión y utilizando estabilizadores adecuados.

Como disolventes, excipientes, emulsionantes
5 o bien dispersantes sean mencionados:

agua, disolventes o bien diluyentes orgánicos no tóxicos, tales como parafinas (por ejemplo, fracciones del petróleo), aceites vegetales (por ejemplo, aceite de cacahuete /sésamo),
10 alcoholes polivalentes, tales como, por ejemplo, glicerina, glicoles (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol) y agua; excipientes sólidos tales como, por ejemplo, minerales naturales molidos (por ejemplo, ácido silícico altamente disperso, silicatos), azúcar (por ejemplo, azúcar de caña, lactosa, glucosa); agentes de emulsión, tales como emulsionantes
15 no ionógenos y aniónicos (por ejemplo, éster polioxietilénico de ácido graso, éter polioxietilénico de alcohol graso, alquilsulfonatos y arilsulfonatos), agentes de dispersión (por ejemplo, lignina, celulosa metálica, fécula y polivinilpirrolidona) y lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio,
20 talco, ácido esteárico y laurilsulfato sódico).

Como estabilizadores sean mencionados: aminoácidos, azúcar, proteínas, polisacáridos, polialquilenglicoles. Estos estabilizadores se pueden agregar tanto en estado liofilizado como también en solución acuosa.

25 Los virus y bacterias atenuados según la presente invención o bien los medicamentos preparados de estos según la presente invención, se pueden emplear en la forma usual, por ejemplo, intranasal, intragenital, oral, intramuscular, intravenosa, subcutáneamente (localmente, especialmente en todas las mucosas del cuerpo humano y animal).
30

Las cantidades de aplicación para el tratamiento del organismo humano y animal se deben determinar para cada caso. Corresponden sin embargo, por regla general, a las cantidades del material inyectable obtenido por los procedimientos clásicos (por ejemplo, 10^5 KID₅₀ por cc ó bien g).

Las abreviaciones empleadas en los ejemplos a continuación tienen los siguientes significados:

Virus IBR-IPV: Rhinotracheitis bovine infeccioso/ Vulvovaginitis pustulosa infeccioso

10 Virus PI-3 : Virus Parainfluenza-3

Virus MD-VD : Mucosal-Disease, virus Vinesdiarhoe

HAH : inhibidor de haemaglutinación

Ejemplo 1

15 Virus IBR-IPV virulento, aislado del tracto respiratorio de un animal enfermo, se cultivó en un cultivo de células de riñón de ternera en medio Earle bajo adición de hidrolizado de lactalbumina a 37°C durante 48 horas. La suspensión de virus IBR-IPV así obtenida se liberó por centrifugación a 4°C y 2000 g de los residuos de las células y a continuación se expuso a 22°C a un campo de corriente eléctrica alterna (220 V de tensión de corriente alterna, intensidad de corriente 260 mA, electrodos de plata) en el recipiente de reacción, esquematizado en la Fig. 1, durante 1 hora.

25 Una cantidad igual de virus IBR-IPV en medio de cultivo (medio Earle) se mantuvo a 22°C como control.

A continuación se infectaron con las dos suspensiones, en cada caso, cuatro reses en el establo aislado.

Resultado: Mientras los animales de control presentaban todos los síntomas de Rhinotracheitis no se apreciaron ningún síntoma-

ma de enfermedad en las reses infectada con la suspensión tratada como arriba. En el cultivo de tejido se pudo demostrar que

- 5 1) tanto la suspensión tratada con corriente eléctrica alterna como la suspensión de virus que sirve como control sin tratar, presentan un efecto zitopatógeno, y que
- 2) ambos grupos de animales cuatro semanas más tarde presentaban anticuerpos neutralizantes específicos en el suero.

Se trata por lo tanto en el caso de la suspensión de virus tratada con corriente eléctrica alterna de una vacuna viviente que contiene IBR-IPV atópico.

Ejemplo 2

Una cepa de virus de Parainfluenza 3 se aisló del tracto respiratorio de una res enferma y se multiplicó sobre células de riñón de ternera secundarias en medio Earle bajo adición de un 0,5 % de hidrolizado de lactalbumina y un 3 % de suero de terneras inactivado, libre de anticuerpos. Después de separar por centrifugación el debris de las células se expuso la suspensión de virus PI₃ activa durante 1 hora a 37°C a un campo eléctrico de corriente alterna (220 V de tensión de corriente alterna, intensidad de corriente 255 mA, electrodos de plata).

Con ayuda de la técnica de cultivo en tejidos se puede apreciar, a continuación, que en la suspensión existe virus capaz de multiplicarse (presencia de una así llamada "vacuna viva").

El ensayo experimental con animales con la cepa de virus PI-3 tratada según la presente invención mostró los mismos resultados como descrito en el ejemplo 1, es decir,

se podía demostrar efecto zitopatógeno, además, se podían demostrar anticuerpos HAH, o bien neutralizantes específicos, en el suero de los animales tratados.

Ejemplo 3

5 En analogía al método descrito en el ejemplo 1 se expone una suspensión acuosa de virus IBR-IPV virulentos a 37°C durante 24 horas a un capo de corriente eléctrica alterna (220 V de tensión de corriente alterna, 250 mA de intensidad de corriente, electrodos de plata). Se dispone entonces
10 de una vacuna IBR-IPV inactivada.

La suspensión de virus así obtenida se aplicó sobre un cultivo de riñón de terneros y se incubó hasta 5 días a 37°C. No se pudo observar entonces ningún efecto zitopatógeno más.

15 Ejemplo 4

85 cc de la suspensión de virus obtenida según el ejemplo 3 se mezclan con 15 cc de una suspensión al 3 % de Al(OH)₃. Cada 10 cc del material inyectable así obtenido se administra en cada caso a tres reses libres de anticuerpos
20 IBR-IPV por vía subcutánea.

Después de 20 días se pudieron demostrar en las 3 reses anticuerpos IBR-IPV en el suero de la sangre,

Al 21 día se infectaron las 3 reses vacunadas y un animal de control no vacunado en cada caso con 2 cc de
25 la suspensión de virus IBR-IPV activada, no expuesta a la corriente alterna, descrita en el ejemplo 1, por vía intranasal.

Mientras el animal de control presentaba todos los síntomas de una Rhinotracheitis aguda no se pudieron apre-

ciar en los 3 animales vacunados ningun sintoma de enfermedad.

Ejemplo 5

5 Análogo al ejemplo 1 se expuso una suspensión de virus MD-VD virulento en medio Eagle a 37°C a una corriente eléctrica alterna (220 V de tensión de corriente alterna, intensidad de corriente 260 mA, electrodos de plata) durante 32 horas.

10 La suspensión de virus MD-VD asi obtenida demostró estar totalmente inactivada, es decir, no se podía demostrar ningun efecto zitopatógeno.

Las propiedades inmunógenas se mantuvieron sin embargo (formación de anticuerpos específicos, identidad en el ensayo de difusión doble).

15 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, asi como la forma de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento para la obtención de vacunas, por
tratamiento de microorganismos en un campo eléctrico de corrien
te alterna, caracterizado porque una suspensión de microorga-
nismos, en caso dado bajo adición de un medio de cultivo, se
somete a un tratamiento con corriente eléctrica alterna, la
suspensión de microorganismos obtenida según este procedimien-
to, en caso dado, se aísla como tal y, en caso dado, se agrega
10 en forma conocida a ulteriores agentes auxiliares de formula-
ción.

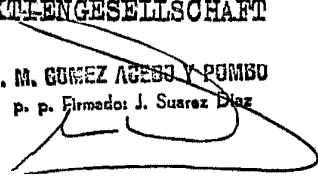
2.- Procedimiento para la obtención de vacunas, por
tratamiento de microorganismos en un campo eléctrico de corrien
te alterna, tal y como queda sustancialmente descrito en la
presente Memoria e ilustrado en los dibujos adjuntos.

15 Esta Memoria consta de 14 hojas escritas a máquina
por una sola cara.

Madrid, 7 AGO. 1973

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

J. M. GOMEZ AGES Y POMBO
p. p. Firmado: J. Suarez Diaz



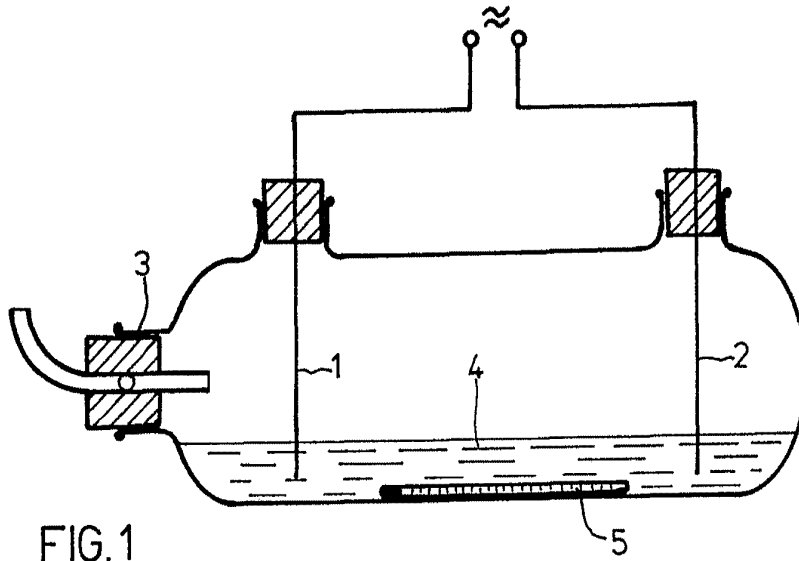


FIG. 1

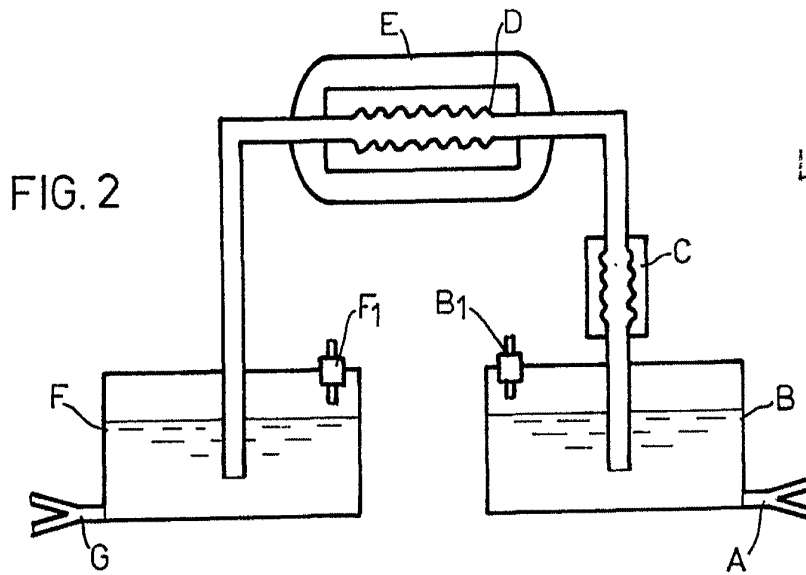


FIG. 2

ESCALA
VARIABLE

Madrid: 23 SET 1977
J. M. GOMEZ ACEBO Y POMBO
p. p. Firmado: J. Suarez Diaz