

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

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	468.960
21		
22	FECHA DE PRESENTACION	19-ABRIL-1978

10 A1

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K	
64 TITULO DE LA INVENCION		
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA VACUNA VIRAL VIVA ESTABILIZADA MEJORADA.		
71 SOLICITANTE (S)		
MERCK & CO., INC.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey - ESTADOS UNIDOS.		
72 INVENTOR (ES)		
William J. McAleer y Henry Z. Markus.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

CM.-

1

RESUMEN DE LA INVENCION

Una vacuna viral viva estabilizada, liofilizada o líquida, contiene un virus vivo, gelatina parcialmente hidrolizada, un alcohol polihídrico de 6 carbonos, Medio 199 y un tampón ácido.

5

COMPENDIO DE LA INVENCION

Una vacuna viral viva estabilizada mejorada, líquida o liofilizada, contiene un virus vivo, gelatina parcialmente hidrolizada, un alcohol polihídrico de 6 carbonos, un medio de cultivo celular y un tampón ácido fisiológicamente aceptable en cantidad suficiente para mantener un pH de 6,0-6,5.

10

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a una composición de vacuna estabilizada en forma líquida o liofilizada, que contiene un virus vivo, gelatina parcialmente hidrolizada, un alcohol polihídrico de 6 carbonos, un medio de cultivo celular y tampón ácido fisiológicamente aceptable en cantidad suficiente para mantener el pH alrededor de 6,0 a 6,5. Son ejemplos de virus vivos los del sarampión, paperas, rubeola, varicela, polio o hepatitis y similares o una combinación de cualesquiera dos o más de estos virus. La gelatina hidrolizada se emplea para formar una matriz proteica soluble no gelificable, con poca o ninguna pirogenicidad o antigenicidad.

15

20

25

30

Por gelatina parcialmente hidrolizada se entiende gelatina que ha sido sometida a hidrólisis parcial para formar una gelatina parcialmente hidrolizada con un peso molecular de 3000 aproximadamente. Este producto de hidrólisis de la gelatina tiene aproximadamente la misma composición de aminoácidos que la gelatina. A diferencia de la gelatina que forma geles pero es insoluble en agua fría, la gelatina hidro-

1 lizada no gelifica pero es soluble en agua fría y otros lí-
quidos comunes como leche y zumo de naranja. La viscosidad
de las soluciones acuosas que contienen hasta alrededor del
10 % de gelatina hidrolizada no aumenta apreciablemente. Por
5 encima de una concentración del orden del 10 %, la viscosi-
dad aumenta lentamente. A una concentración del orden del
50 %, las soluciones son bastante viscosas. La composición
típica de aminoácidos de la gelatina hidrolizada es la si-
guiente:

10	Alanina	8,5 %
	Arginina	7,9 %
	Acido aspártico	5,7 %
	Cistina	0,08 %
	Acido glutámico	9,5 %
15	Glicina	22,8 %
	Histidina	0,77 %
	Hidroxiprolina	13-14 %
	Isoleucina	1,3 %
	Leucina	2,9 %
20	Lisina	4,2 %
	Metionina	0,78 %
	Fenilalanina	2,0 %
	Prolina	13,8 %
	Serina	3,3 %
25	Treonina	1,9 %
	Tirosina	0,40 %
	Valina	2,4 %

30 Puede obtenerse gelatina parcialmente hidrolizada por
hidrólisis enzimática de gelatina mediante una enzima proteo-
lítica como, por ejemplo, papaína, chimopapaína y bromelina,

1 aunque pueden emplearse otros medios conocidos de hidrólisis
por ejemplo la hidrólisis ácida. Puede obtenerse una gelati-
na hidrolizada adecuada de la Wilson and Co., Inc., Calumet
City, Illinois (Estados Unidos) bajo el nombre comercial de
5 SOL-U-PRO.

El alcohol polihídrico de 6 carbonos puede ser, por
ejemplo, sorbitol, manitol o dulcitol. Se prefiere el sor-
bitol.

10 El tampón ácido puede ser cualquier tampón fisiológica-
mente aceptable que mantenga el pH deseado de 6 a 6,5 apro-
ximadamente, por ejemplo tampón de fosfato, tampón de acetato
o tampón de citrato. Se prefiere el tampón de fosfato. El
estabilizante se diluye con alrededor de 3 a 8 veces su peso
de agua destilada, preferiblemente alrededor de 5,5 veces su
15 peso, antes de utilizarlo.

Por el término "medio de cultivo celular" se entiende
un medio nutriente que permite el crecimiento de células
in vitro. Algunos medios nutrientes específicos son, por
ejemplo, Medio 199, Morgan y colaboradores, Proc.Soc.Exp.
20 Biol. & Med., 73:1-8, 1950; Medio Basal de Eagle, Eagle,
Science, 122, 501-504, 1955; In Vitro, Vol. 6, n° 2, 1970;
Medio de Eagle modificado por Dulbecco, Dulbecco y colabora-
dores, Virology, 8, 396, 1959; Smith y colaboradores, J.Vi-
rol., 12, 185-196, 1960; In vitro, Vol. 6, n° 2, 1970; Medio
25 Esencial Mínimo (Eagle), Science, 130, 432 (1959) y RPMI Me-
dia, Moore y colaboradores, 199, 519-524, 1967; In vitro,
Vol. 6, n° 2, 1970.

30 La composición estabilizante de esta invención contie-
ne los siguientes ingredientes aproximadamente en las canti-
dades indicadas:

1	<u>Ingrediente</u>	<u>Partes en peso</u>
	Gelatina parcialmente hidrolizada	2 - 5
	Alcohol polihídrico	2 - 55
	Medio nutriente (sólidos)	0,5 - 1,7

5 Tampón fisiológicamente aceptable
 para ajustar el pH a 6,0-6,5 cantidad suficiente

 En una vacuna líquida, el sorbitol se emplea general-
mente en una proporción próxima al extremo superior del in-
tervalo, mientras que con una vacuna liofilizada el sorbi-
tol se utiliza generalmente en una proporción próxima al
10 extremo inferior del intervalo.

 A continuación damos formulaciones específicas para el
estabilizante de vacunas víricas de esta invención. Se pre-
fiere la Formulación B para una vacuna liofilizada.

15		<u>A</u>	<u>B</u>
	Gelatina parcialmente hidrolizada	35,7 g	35,7 g
	Sorbitol	526 g	35,7 g
	Medio 199	11,06 g	11,06 g
	Tampón de fosfato sódico, 1M, pH 6,0	100 ml	100 ml
20	Agua destilada	hasta 1 l.	1 l.

 Además el estabilizante opcional pero preferiblemen-
te contiene una pequeña cantidad de NaHCO_3 y de rojo de fe-
nol. En el caso de la formulación anterior, el NaHCO_3 se
encuentra en una proporción de alrededor de 1,2 g y el rojo
de fenol en una proporción de alrededor de 0,01 g. Aunque
25 se han descrito formulaciones particulares, se sobreentien-
de que se consideran también las variaciones en las propor-
ciones y concentraciones de cada uno de los ingredientes.
 Habitualmente se diluye un volumen de vacuna con alrededor
de 2 a 12 volúmenes de estabilizante.

30 Los siguientes ejemplos ilustran esta invención sin li-

1 mitarla a los mismos.

EJEMPLO 1

5 En un baño de agua a 25°C se descongelan 80 ml de un concentrado viral de sarampión que ha sido almacenado a -70° y después se mantiene a 4-8°. El concentrado viral líquido se separa después en dos partes alícuotas de 40 ml cada una.

10 a) Una parte alícuota de 40 ml de este fluido vírico se diluye en 210 ml de estabilizante estéril anteriormente descrito de Formulación B. La formulación se realiza en condiciones asépticas y con una cabina de flujo laminar. Para evitar el crecimiento microbiano, se añaden a la preparación 10,5 mg de neomicina. La vacuna diluída se dispensa en ampollas de vidrio de 2 ml (0,7 ml de vacuna por ampolla) que
15 inmediatamente se sellan a la llama y se almacenan a 4-8°C.

20 b) La segunda parte alícuota de 40 ml se manipula como la primera a excepción de que, en lugar del estabilizante de Formulación B, se emplea un diluyente comercial normal de vacunas (SPGA). La estabilidad en almacenamiento de las vacunas está descrita en la siguiente tabla:

Tiempo	Títulos (1) de vacunas líquidas almacenadas a 2-8°C	
	Estabilizante de Formulación B	Estabilizante SPGA
0	3,4	3,6
25 4 meses	3,2	0,6

(1) Los títulos están expresados como $CTDI_{50}/0,1$ ml.

EJEMPLO 2

30 En un baño de agua a 25°C se descongelan 32 ml de un concentrado viral de sarampión que ha sido almacenado a -70° y después se mantiene a 4-8°. El concentrado viral lí-

1 quido se separa después en dos partes alícuotas de 16 ml cada una.

5 a) Una parte alícuota de 16 ml de este fluido vírico se diluye en 48 ml del estabilizante estéril antes descrito de Formulación B. La formulación se realiza en condiciones
10 ásépticas y cabina de flujo laminar. Para evitar el crecimiento microbiano, se añaden a la preparación 2,5 mg de neomicina. La vacuna diluída se dispensa en ampollas de vidrio de 2 ml (0,7 ml de vacuna por ampolla) que inmediatamente se sellan a la llama y se almacenan a 37°C.

15 b) La segunda parte alícuota de 16 ml se manipula como la primera a excepción de que, en lugar del estabilizante de la Formulación B, se emplea el estabilizante de la Formulación A. La estabilidad en almacenamiento de las vacunas está descrita en la siguiente tabla:

Tiempo	Títulos (1) de las vacunas líquidas almacenadas a 37°C	
	Estabilizante de Formulación B	Estabilizante de Formulación A
0	2,9	2,7
20 24 horas	1,6	2,1
48 horas	1,2	1,8
72 horas	0,6	1,4

(1) Los títulos están expresados como $CTDI_{50}/0,1$ ml.

EJEMPLO 3

25 En un baño de agua a 20°C se descongelan 80 ml de concentrado viral de sarampión que ha sido almacenado a -70°C y después se mantiene a 4-8°C. El concentrado viral líquido se separa en dos partes alícuotas de 40 ml cada una.

30 a) Una parte alícuota de 40 ml de este fluido vírico se diluye en 210 ml del estabilizante estéril anteriormente

1 descrito de Formulación B. La formulación se realiza en con-
5 diciones asépticas y en una cabina de flujo laminar. Para
evitar el crecimiento microbiano, se añaden a la preparación
10,5 mg de neomicina. La vacuna diluída se dispensa en via-
5 les de vidrio de 3 ml (0,7 ml de vacuna por vial) que se
liofilizan, se tapan y se almacenan a 37°C.

b) La segunda parte alícuota de 40 ml se manipula como
la primera a excepción de que, en lugar del estabilizante
de Formulación B, se emplea un diluyente comercial normal
10 (Medio 199 conteniendo SPGA).

La estabilidad en almacenamiento de estas vacunas está
descrita en la siguiente tabla:

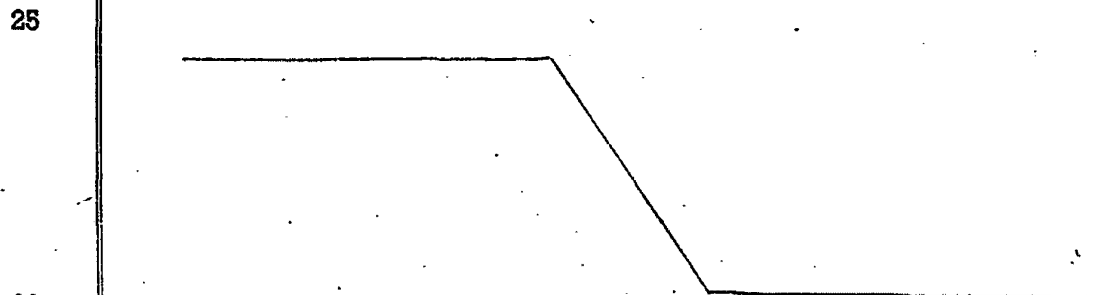
Tiempo	Títulos (1) de las vacunas liofilizadas almacenadas a 37°C	
	Estabilizante de la Formulación B	Estabilizante SPGA
0	3,5	3,5
7 días	3,6	0,6

(1) Los títulos están expresados como $\log \text{CTDI}_{50}/0,1 \text{ ml}$.

EJEMPLO 4

20 Unos viales liofilizados preparados como en el Ejemplo
3 se reconstituyen con agua destilada (0,7 ml por vial) y
se almacenan a 2-8°C.

La estabilidad en almacenamiento de estas vacunas está
descrita en la siguiente tabla:



	Títulos (1) de las vacunas reconstituídas almacenadas a 2-8°C		
	Tiempo	Estabilizante de Formulación B	Estabilizante SPGA
1	0	3,70	3,43
5	4 días	3,17	2,20
	1 semana	3,23	2
	8 semanas	3,03	-
	Pérdida (log/semana)	0,030	0,649

(1) Los títulos están expresados como log CTDI₅₀/0,1 ml.

10 En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

15 1.- Un procedimiento para la preparación de una vacuna viral viva estabilizada mejorada que comprende un virus inactivado o atenuado y un estabilizante constituido esencialmente, en partes en peso, por alrededor de 2 a 5 partes de gelatina parcialmente hidrolizada, alrededor de 2 a 55 partes de un alcohol polihídrico de 6 carbonos, alrededor de 0,5 a 1,7 partes de un medio de cultivo celular y una cantidad de un tampón fisiológicamente aceptable efectiva para ajustar el pH entre 6,0 y 6,5 aproximadamente, cuyo procedimiento comprende diluir un concentrado viral en el estabilizante descrito anteriormente y finalmente dispensar la vacuna diluída en viales.

25 2.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el alcohol polihídrico de 6 carbonos es sorbitol.

3.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el tampón es tampón de fosfato.

30 4.- Un procedimiento según la reivindicación 1,

1 donde el virus es de sarampión, paperas, rubeola, varicela,
polio, hepatitis, herpes simplex 1, herpes simplex 2 o
combinaciones de los mismos.

5 5.- Un procedimiento según la Reivindicación
1, donde el estabilizante está constituido esencialmente,
en partes en peso, por alrededor de 3,6 partes de gelati-
na parcialmente hidrolizada, alrededor de 3,6 partes de
sorbitol, alrededor de 1,1 partes de Medio 199 y una canti-
dad de tampón de fosfato efectiva para ajustar de pH en-
10 tre 6,0 y 6,5 aproximadamente.

15 6.- Un procedimiento según la reivindicación
1, donde el estabilizante está constituido esencialmente, en
partes en peso, por alrededor de 3,6 partes de gelatina
parcialmente hidrolizada, alrededor de 53 partes de sorbi-
tol, alrededor de 1,1 partes de Medio 199 y una cantidad de
tampón de fosfato efectiva para ajustar el pH entre 6,0 y
6,5 aproximadamente.

20 7.- Un procedimiento según la reivindicación 1,
que contiene alrededor de 2 a 12 volúmenes de estabilizan-
te por cada volumen de vacuna aproximadamente.

25 8.- Un procedimiento según la reivindicación 1,
en el que el concentrado viral es congelado y es después
descongelado antes de ser diluido con el citado estabili-
zante.

9.- Un procedimiento según la reivindicación 8,
en el que el concentrado viral es descongelado a una tem-
peratura de entre 20 y 30°C aproximadamente.

30 10.- Un procedimiento según la reivindicación 1,
en el que el concentrado viral es diluido bajo condiciones
asépticas.

1

11.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que se incorpora un antibiótico al concentrado final diluido, para evitar el crecimiento microbianc.

5

12.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA VACUNA VIRAL VIVA ESTABILIZADA MEJORADA.

10

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria Descriptiva que consta de once páginas mecanografiadas.

Madrid, 19 de Abril de 1978

BERNARDO UNGRIA

15

20

25

30