



254121

254121

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

a favor de:

DR. RENTSCHLER & CO., de nacionalidad alemana, residente en
Laupheim (Württ), (República Federal Alemana), por:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE VACUNAS, A PARTIR DE CUL
TIVOS DE TEJIDOS, CONTRA LA PARALISIS CONTAGIOSA DEL CERDO"

- - - - -

Memoria descriptiva

5 La parálisis contagiosa del cerdo (enfermedad "Teschen"
del cerdo, análoga a la poliomiélitis) es una dolencia del cer
do, similar a la parálisis espinal infantil. Es producida por
un virus muy pequeño que posee una afinidad especial para el
sistema nervioso central y hasta ahora, en condiciones natura-
les, solamente se ha encontrado en el cerdo. La forma paralizan
te, que presenta un cuadro clínico e histológico perfectamente
conocido, se contrapone a numerosas infecciones clínicamente
inaparentes.

10

Desde 1940 la parálisis contagiosa del cerdo pertenece a



254121

las epizootias cuya declaración es obligatoria en Alemania. Está sometida a las mismas medidas preventivas y de seguridad que la peste porcina. El combatirla supone grandes dificultades para las naciones afectadas. El territorio federal fué amenazado por la epidemia que provenía del este. Austria, Checoslovaquia y Polonia fueron contagiadas. También la enfermedad "Talfan" del cerdo, que aparece periódicamente en Inglaterra, se identificó con la parálisis contagiosa del cerdo. Al principio, la epidemia apareció en Alemania en la región de Freilassing.

Para la inmunización activa del cerdo contra la parálisis contagiosa del cerdo se han empleado hasta ahora vacunas formalina-adsorbato (vacuna muerta), según Traub, o modificaciones de ésta. El virus se obtiene del sistema nervioso central de cerdos jóvenes artificialmente inoculados intracerebralmente. Después se adsorbe sobre hidróxido de aluminio y se inactiva con formalina. Hasta ahora no se conocía una vacuna viva contra la parálisis contagiosa del cerdo.

Según nosotros, se ha logrado el crecimiento de virus en cultivos de riñones de cerdo, lo cual representa un método de preparación de vacunas en cultivos tisulares. Las vacunas de cultivo resuelven una serie de problemas técnicos, con los que están gravadas las vacunas animales. Su producción, en escala de laboratorio, en recipientes de cultivo es factible y no depende de la compra de animales susceptibles y sanos, tienen un medio de cultivo constante, la influencia variable del organismo huésped se disminuye, las proteínas inespecíficas y sustancias acompañantes son escasas y sobre todo no existe en tan gran escala el peligro de que lleguen a la vacuna virus impurificados que cuando en la vacuna están presentes causan infecciones latentes, o clínicamente inaparentes. Para la antigua vacuna cere

254121



bral se emplean, por lo regular, cerdos de comercio. Si, even-
tualmente, animales infectados con peste porcina están ataca-
dos por una infección clínicamente inaparente o en estado de
incubación, entonces la vacuna puede contener, además del vi-
45 rus "Teschen" activo, el virus de la peste porcina simultánea-
mente, como impureza.

Conforme a la invención, la preparación de una vacuna-
muerta (virus muerto) contra la parálisis contagiosa del cer-
do, a partir de cultivos tisulares, representa un procedimiento
50 completamente nuevo. En el transcurso de los trabajos desa-
rrollados para la consecución, de una vacuna a partir de culti-
vos tisulares, se han conseguido, además, nuevos puntos de vis-
ta para los escalones aislados de producción que caracterizan
de modo especial las nuevas vacunas de cultivo, sino que tam-
55 bién ha permitido crear, por primera vez, los fundamentos ex-
perimentales para la producción de una vacuna viva contra la
parálisis contagiosa del cerdo.

La invención se refiere, por lo tanto, a:

- 60 1). Un procedimiento para la obtención de una vacuna muerta
contra la parálisis contagiosa del cerdo, a partir de culti-
vos de riñones de cerdo.
- 2). Un procedimiento para la preparación de una vacuna viva,
contra la parálisis contagiosa del cerdo, a partir de culti-
vos de riñones de cerdo.

65 Los principios fundamentales se describen brevemente, a
continuación:

- 70 1ª). La bondad, efectividad e inocuidad de las vacunas de vi-
rus antigénicos se aseguran desde el primer momento por la ra-
za de virus empleado en la producción de la vacuna. En el ca-
so ideal, el virus vaccinal es solamente débilmente patógeno
para el vacunado; cuando se trata de una vacuna muerta, adque-



254121

75 re, tras la inactivación, un elevado poder antigénico e inmunizante y se puede cultivar fácil, regularmente y con elevado rendimiento. En una vacuna viva el virus vaccinal debe ser completamente inofensivo para el vacunando y conjuntamente, estar dotado de buen poder inmunizante. La preparación de cada vacuna en particular exige la búsqueda previa del virus ideal. Esto es de importancia decisiva cuando el agente patógeno se presenta en la Naturaleza en varios tipos y variantes, que difieren inmunológicamente.

80 El virus de la poliomielitis del cerdo es inmunológicamente unitario. La preparación de una vacuna contra la parálisis contagiosa del cerdo no está ligada, por ello, con el problema de los tipos y variantes. Para la preparación de una vacuna muerta a partir de cultivos tisulares es necesario, sin embargo, la búsqueda de una raza débilmente patógena para el cerdo, pero fuertemente antigénica, que se multiplique constantemente en los cultivos tisulares y para la preparación de una vacuna viva, la búsqueda de una raza de virus completamente inofensiva para el cerdo. La raza de cultivo "Teschén" Konratice, cultivada, según nosotros en numerosos y continuados pases por cultivos tisulares, reúne idealmente ambas exigencias. A medida que eleva el número de pases por los cultivos tisulares, decrece la patogenicidad para el cerdo de los virus cultivados. A partir del pase 90./91 no puede provocarse en el cerdo, intracerebralmente o por adición al forraje, una enfermedad paralizante con los virus cultivados. Sin embargo, las propiedades inmunizantes no varían por los pases en los cultivos. Con los virus de cultivo modificados, se pueden preparar, por tanto, lo mismo vacunas de formalina-adsorbato que vacunas vivas. Con un número pequeño de pases por cultivos (80.- 120) el virus es adecuado para la pre

100



254121

paración de vacunas muertas; con numerosos pases (sobre 300), para una vacuna viva.

105 29). En la preparación de vacunas de virus muertos a base de la inactivación por formalina es de gran importancia la filtración de las suspensiones iniciales de virus. Las opiniones sobre las ventajas y desventajas del proceso de filtración son divergentes. Unicamente existe acuerdo sobre el hecho de que la filtración es indispensable. Debe eliminar de las colonias
110 de virus restos celulares, agregados, pequeños y gránulos y otras substancias que pueden malograr una óptima inactivación por formalina. La filtración se efectúa por filtro Seitz del tipo EK o placa filtrante de vidrio o de distinta porosidad. A causa de una filtración inadecuada puede originarse, no solamente una
115 pérdida de virus infeccioso sino también una disminución en la antigenidad de las partículas del virus activo.

Para obviar éstos inconvenientes, reemplazamos la filtración por un tratamiento con cloroformo (10%) de las colonias de virus. El tratamiento con cloroformo tiene las siguientes
120 ventajas: elimina de la mezcla vaccinal moléculas virásicas, agregados, proteínas y restos celulares, una gran parte de las sustancias perturbadoras en la inactivación por formalina y extrae de las colonias de virus gran cantidad de grasas y ácidos grasos. Este proceso favorece la fase siguiente de inactivación del virus. Los poderes infeccioso y antigénico del virus
125 no se afectan por el tratamiento con cloroformo. Se produce incluso una elevación del título, que se puede atribuir probablemente a la eliminación de substancias acompañantes retardatrices de la infección o a la disolución de los agregados virásicos. El cloroformo, en la escala de concentración utilizada,
130 mata bacterias, mohos y levaduras. Puesto que en la preparación rutinaria de una vacuna a partir de cultivos tisulares se ha de



254121

135 contar eventualmente con bacterias, mohos y levaduras impuri-
ficadoras, procedentes del aire, el tratamiento con cloroformo
aumenta al margen de seguridad en lo que a la esterilidad
concierno.

También se incluye el tratamiento con cloroformo al co-
mienzo del proceso de producción de las vacunas vivas de cul-
tivo.

140 El tratamiento con cloroformo del material virásico de par-
tida en sustitución de la filtración, es completamente nuevo
en las vacunas contra la parálisis contagiosa del cerdo.

En sustitución del cloroformo pueden emplearse, dentro
del grupo de los hidrocarburos halogenados, una serie completa
145 de otros hidrocarburos halogenados superiores. Son eficaces el
tricloretileno, tricloretileno + heptano, Frigen 112 + Heptano,
perclloretileno, perclloretileno + heptano y tripeno.

39). La adición de hidróxido de aluminio, usual en las vacunas
antigénicas de la medicina animal, se efectua igualmente en
150 la vacuna cultivada contra la parálisis contagiosa del cerdo
y asimismo, la inactivación por formalina del virus.

49). La vacuna viva de cultivo se prepara en forma de vacuna
para adicionarla al agua de bebida o como vacuna parenteral
(subcutánea). En el último caso, la vacuna contiene hidróxido
155 de aluminio (1% de óxido de aluminio) que se ha añadido al ma-
terial virásico de partida purificado con cloroformo, a partes
iguales.

Ejemplo para la preparación de una vacuna cloroformo-for-
malina-adsorbato, a partir de cultivos de riñones de cerdo, con-
160 tra la parálisis contagiosa del cerdo.

Colonias de virus, purificadas con cloroformo..... 495,0



254121

	Buffer a base de bifosfato potásico-bórax, pH 7,3...	247,5
	Hidróxido de aluminio, pH 7,3 (2% Al ₂ O ₃).....	247,5
165	Formalina diluída con agua destilada en la propor- ción 1 : 25.....	<u>10,0</u>
		1.000,0

Como virus vaccinal se utiliza la raza Konratice, con un número de pases en cultivo de 80 a 120. Con estos pases se asegura la antigenidad del virus. Los cultivos de riñones de cerdo, preparados en placas "Roux", se vacunan tan pronto como tienen el 100% de densidad. El medio vaccinal es extracto puro de amonio de buey. Se recogen después que se agota la totalidad del cultivo. Hasta el momento de elaboración, las colonias de virus se almacenan a -20º C. Son útiles las colonias con un título superior a 10^{-7,5}, referido a 1,0 ml. Puesto que el almacenamiento del virus no es perjudicial, pueden establecerse grandes existencias.

La preparación de la vacuna comienza con la purificación con cloroformo. Al material virásico de partida se añade el 10% de cloroformo y se agita durante 60 minutos a temperatura ambiente. Transcurridas 24 horas de permanencia a + 4º C, se centrifuga la mezcla durante 10 minutos a 7.000 r.p.m.

Al virus purificado con cloroformo se añade una parte igual de hidróxido de aluminio (pH 7,3) diluído 1:2 con buffer de borato. Después de la adsorción se inactiva durante un periodo de 48 horas a 37º C, con una concentración de formalina de 1: 2.500. La vacuna ya terminada se almacena a + 4º C.

En la producción en gran escala, los procesos de fabricación se efectúan, por separado, en un autoclave con agitación y una centrifuga separadora.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Alemania el 17 de Febrero de 1959, bajo el número R 24970 IVa/30h, se

254121



acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial y del artículo 49 del Convenio de la Unión.

195

REIVINDICACIONES

=====

1). Procedimiento para la preparación de vacunas, a partir de cultivos de tejidos, contra la parálisis contagiosa del cerdo, caracterizado porque se emplea un cultivo celular de riñones de cerdo, obtenido "in vitro", sirve como virus la raza de cultivo, fuertemente antigénica, Konratice y porque el proceso de producción incluye un tratamiento con cloroformo de las colonias de virus, con lo cual, se evita la filtración, se mantiene la cantidad de virus y el poder antigénico y simultáneamente, se asegura la esterilidad. La inactivación por formalina del virus se lleva a cabo del modo usual, previa adición de hidróxido de aluminio.

200

205

2). Procedimiento según la reivindicación 1), caracterizado por que se suprime la inactivación del virus, ya que, conforme a la invención, se emplea un cultivo "Teschen" de virus, biológicamente modificado mediante numerosos pasos por cultivos de riñones de cerdo, siendo el virus en cuestión, en forma activa, inofensivo para el cerdo, con lo cual se incrementa la eficacia y el poder inmunizante de la vacuna. El tratamiento con cloroformo de las colonias de virus, igual que el procedimiento parcial según la reivindicación 1).

210

215

3). Procedimiento para la preparación de vacunas, a partir de cultivos de tejidos, contra la parálisis contagiosa del cerdo, caracterizado por la sustitución del cloroformo, con el cual se tratan las colonias de virus, según 1) y 2), por compuestos de hidrocarburos más fuertemente halogenados.

220



254121

4). PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE VACUNAS, A PARTIR DE CULTIVOS DE TEJIDOS, CONTRA LA PARALISIS CONTAGIOSA DEL CERDO.

Esta Memoria consta de nueve hojas foliadas y mecanografiadas por un solo lado de sus caras.

225

Madrid, a 11 de Diciembre de 1959

paus