

264136



BO. EN.

264136

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

por veinte años en España, por " PROCESO PARA LA

PRODUCCION DE UN MATERIAL QUE PUEDA EMPLEARSE COMO

PRODUCTO INTERMEDIO DE VACUNA O PARA FINES EXPERIMENTA

LES "

a favor de

NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION

domiciliado en LONDRES, W.1. INGLATERRA. - Tilney Street, 1.

Inventor: D. David Arthur John TYRRELL, de nacionalidad Británica.

Prioridad: De las solicitudes de Patentes inglesas nº 3162/60 - del 28-Enero-1960 y nº 38014/60 - del 4-Noviembre-1960.

- C/M -

264136



5 Esta invención se relaciona con la producción de sustancias intermedias para vacunas y más particularmente con la provisión de un producto intermedio para vacunas para la producción de una vacuna que puede ser útil para conferir un grado de inmunidad contra el resfriado común.

Hasta ahora no ha sido posible cultivar de modo práctico el virus del resfriado común in vitro.

10 Se ha descubierto ahora que el virus del resfriado común puede cultivarse in vitro bajo ciertas condiciones que parten de las normalmente empleadas para el cultivo de virus en las células vivas.

El cultivo de este virus es particularmente deseable por cuanto puede proporcionar la base de una vacuna inoculable que confiera un grado de inmunidad en el sujeto inoculado contra el resfriado común.

15 Se ha descubierto que el cultivo del virus del resfriado común se controla, por lo menos en sus fases iniciales, mediante la elección de las particulares condiciones de temperatura y pH que difieran de las normalmente empleadas para el cultivo del virus.

20 Así, se ha observado que el virus del resfriado común obtenido directamente del hombre debe incubarse, en tejido del riñón del mono o células o tejido del riñón del embrión humano, a una temperatura inferior a la que en otro caso pudiera considerarse y en un orden más estrecho de valores de pH.

25 En consecuencia la invención proporciona un proceso para la producción de un material que pueda usarse como intermedio de una vacuna o para fines experimentales, en el cual se inocula un medio salino adecuado para el cultivo de tejidos y que contenga células o tejido vivo de riñón de mono o tejido o células vivas de riñón de embrión humano con material que contenga por lo menos una raza de virus del resfriado común humano, tras lo cual se incuba el medio a una temperatura de 30 a 36°C, a un pH de 6,4 a 7,4, hasta que el virus se haya

30



264136

multiplicado muchas veces en el medio.

La fase de la incubación debe llevarse a cabo con relativo movimiento del medio y el tejido o las células, preferiblemente agitando el recipiente que contenga a aquellos.

5 Preferiblemente el pH estará comprendido entre 6,4 y 7,2 y más preferiblemente entre 6,8 y 7,2.

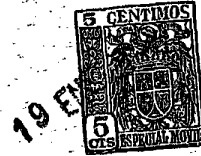
10 El medio salino empleado será preferiblemente uno que sea substancialmente isotónico, por ejemplo el medio 199 de Parker, o como el medio salino de Hank fortificado por ejemplo con una proporción de un hidrosilato enzimico de lactalbumina.

En cualquier caso el medio empleado debe ser tal que soporte el desarrollo in vitro de las células o tejidos animales vivos.

15 El virus infectado obtenido directamente del hombre puede conseguirse por ejemplo mediante lavado nasal o gargarismo. Los lavados o productos del gargarismo pueden contener microorganismos extraños y se considera muy preferible que el medio de cultivo contenga uno o mas antibióticos que los exterminen. Es por consiguiente preferible usar un medio que contenga adecuadas proporciones de penicilina y estreptomycinina y un adecuado agente antifungicida tal como la micostatina.

20 El material de células o tejidos de animal vivo del cultivo será preferiblemente en forma de una sola capa de células que se desarrollen en la solución salina. Se ha descubierto que por lo que respecta al menos a la mayoría de las razas del virus del resfriado común, se obtienen los mejores resultados cuando las células proceden de los riñones de embriones humanos obtenidos mediante histerotomías de mu-
25 jeres en periodo de gestación de tres a cinco meses. Se ha comprobado que ciertas razas del virus del resfriado común se reproducen bajo las condiciones antes mencionadas cuando las células o tejidos se han
30 obtenido de los riñones de mono, por ejemplo de la especie Macacus,

264150



tales como los monos Rhesus y Cynomolbus.

5 Es muy de desear la posibilidad de estudiar los preparados de virus producidos de acuerdo con la presente invención a fin de ensayar la relativa potencia de preparados producidos bajo variables condiciones en el trabajo experimental. Es también deseable disponer de un método tal de ensayo que pueda emplearse como control en la fabricación de una vacuna o producto intermedio de ella.

10 Se ha descubierto ahora que el efecto citopático producido por partículas activas del virus del resfriado común tras su incubación con células de animales vivas en un medio adecuado proporciona una forma de ensayar la potencia de un preparado determinado. Cuando la incubación se lleva a cabo de acuerdo con las condiciones de la presente invención, el efecto citopático de partículas infecciosas del virus determina la formación de placas (denominadas también lesiones focales) que son fácilmente observables al microscopio. Después de 15 cierto periodo de incubación, empiezan a aparecer placas en la capa de células como resultado de la acción de partículas individuales e infecciosas de virus con la que se inoculó inicialmente el cultivo. Estas placas se denominarán placas primarias a efectos de la presente 20 descripción. Durante la incubación las propias células producen ulteriores cantidades de virus que en el curso del tiempo se esparcen por toda la capa de células, dando lugar a lo que se denominan placas secundarias. Como se comprenderá es sólo el número de placas primarias lo que regularmente representa el grado de potencia del preparado de virus inicialmente, empleado. 25

Se comprenderá que no todas las razas de virus del resfriado común se desarrollarán en el medio anteriormente especificado, pero fácilmente puede determinarse si una raza determinada es o no adecuada para ensayarla de la siguiente manera .

30 El virus es incubado como queda descrito y se observa al micros

264136



copio el material celular en un momento en que se haya formado un número considerable de placas primarias, pero antes de la formación de placas secundarias, contándose entonces el número de las primarias.

5 El momento adecuado en que ha de efectuarse la observación con vistas a contar las placas primarias no puede establecerse con precisión porque ello dependerá en cualquier caso determinado del material celular empleado, la raza de virus que se esté ensayando y su grado de potencia, y de las condiciones de cultivo. El momento óptimo de observación puede variar entre 2 y 12 días (por ejemplo 5 ó 6 días) después del comienzo de la incubación, pero con experiencia quien realice el ensayo podrá determinar fácilmente el momento más indicado. En cualquier momento durante la formación de placas primarias, el número de placas contadas comparado con el de placas contadas en un experimento de control con una agrupación standard de virus, indicará el grado de potencia aproximado del preparado que se esté ensayando con relación al correspondiente al preparado standard. Evidentemente, la determinación será de una máxima precisión en el momento en que se haya formado el número máximo de placas primarias y antes de que la formación de placas secundarias haya aparecido.

10
15
20 La presente invención se distingue particularmente de las anteriores propuestas, en primer lugar por la temperatura a que se efectúa la incubación (la cual es apreciablemente inferior a las normalmente empleadas en el cultivo de tejidos) e igualmente por lo que respecta al pH empleado.

25
30 Esta invención considera particularmente el caso en que el medio en cuestión contiene un bicarbonato metálico alcalino, preferiblemente bicarbonato sódico, en una proporción comprendida entre 0,001 y 0,01 M., hallándose presente preferiblemente el bicarbonato en una proporción de 0,002 a 0,005 M., Sin embargo, puede usarse otras sustancias para producir el deseado pH en el medio por ejemplo un amortiguador de fos-



fato sódico que sea capaz de producir valores de pH comprendidos entre 7,14 y 7,69 a una concentración final de 0,05 M., en el medio, La temperatura preferible es de 31 a 35°C, por ejemplo entre 32 y 34°C. Los mejores resultados se obtienen aproximadamente a 33°C, es decir entre 32,5 y 33,5°C.

Se ha comprobado que cultivando los virus en cuestión como queda especificado, es posible obtener un medio acuoso que contenga los virus citados, cuya solución acuosa puede separarse del material sólido por ejemplo mediante centrifugación, después de llevar a cabo la incubación de 2 a 14 días, y preferiblemente de 4 a 12 días, y más preferiblemente aún de 6 a 9 días aproximadamente.

Cuando el material de esta invención ha de usarse para la preparación de una vacuna contra resfriados comunes, puede ser necesario concentrar el antígeno en el medio, por ejemplo mediante ultracentrifugación, diálisis o realización de la operación en una columna de cambio iónico.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1.

Se preparó una suspensión de células de riñón de mono a partir de un cultivo primario de tejido de tal viscera. Estas células fueron diluidas hasta una concentración aproximada de 60.000 por ml. en un medio consistente en un 5% de suero de ternera, un 0,5% de hidrolisato de lactalbumina en salina de Hank conteniendo un 0,035% de bicarbonato sódico, 100 unidades por ml. de penicilina y 100 µg de estreptomina. Se introdujeron 0,5 ml. volúmenes de esta suspensión en tubos oscilantes que se incubaron en forma estacionaria durante unos tres días. En este momento se retiró el medio y se sustituyó con 1,5 ml. de un nuevo medio que comprendía un 2% de suero de ternera, un 0,25% de lactalbumina, y bicarbonato sódico y antibióticos en iguales proporciones que antes. A cada cultivo se añadió 0,2 ml. de un lavado nasal tomado de



264136

un paciente o voluntario infectado con raza HGP de virus. Se colocó el cultivo en un tambor giratorio dentro de una incubadora a 33°C. Unos días después (cinco), comenzó la degeneración en la lámina celular; Al cabo de unos diez días se había acentuado notablemente la degeneración y cuando se recogió el producto del medio, contenía grandes cantidades de virus.

Ejemplo 2.

Se repitió el ejemplo 1 pero usando un amortiguador de fosfato sódico con un pH de 7,2 a una concentración final de 0,05 m.

Lo que sigue se describe a modo de ejemplo la forma en que puede llevarse a cabo los ensayos de determinación de potencia.

La potencia de un preparado conteniendo virus HGP se ensaya en un cultivo de tejido usando cultivos secundarios de células de riñón de monos Rhesus. Se inoculan entre 30.000 y 40.000 células en tubos estacionarios de 0,5 ml. de un medio consistente en un 5% de suero de ternera y un 0,5% de hidrosilato de lactalbúmina (LAH) en solución de Hank conteniendo un 0,03% de bicarbonato sódico y 100 unidades de penicilina, 100 ug de estreptomocina y 20 unidades de micostatina por ml. Después de un periodo de cultivo estacionario de 24 horas a 48 a una temperatura de 36°C, se retira el medio de cultivo y se sustituye por 1,5 ml. de un medio conteniendo un 2% de suero de ternera y 0,25% de hidrolisato de lactalbúmina e incluyendo los otros constituyentes del medio original en las proporciones antes especificadas. Luego se inoculan los cultivos con un material conteniendo virus, ya sea inmediatamente o, por ejemplo al cabo de un día después del cambio de medio y los cultivos inoculados se incuban a 33°C en un tambor giratorio bajo las condiciones descritas en el ejemplo 1. Se obtuvieron unos resultados óptimos con medios de un pH medio de 7,0 a 7,4. En una modificación de este método puede obtenerse el requerido pH del medio con el uso, en lugar de bicarbonato sódico, de un amortiguador de fos-

264136



fato sódico con un pH de 7,14 a 7,69 con una concentración final de 0,05 m. en el medio. Después de la incubación se examinaron a intervalos microscópicamente tubos con muestra a fin de contar el número de placas producidas en la lámina celular. En estos experimentos se observará que hasta tres días después de la inoculación el número de placas producidas es directamente proporcional a la concentración de virus en el preparada sometido a ensayo. En el cómputo de placas es, por supuesto, necesario asignar un número mínimo de células a una lesión focal que haya de ser contada como una placa. Así por ejemplo puede decirse que un foco ha de contener por lo menos 10 células, para ser considerado como una placa y será evidentemente necesario emplear el mismo sistema de cómputo para el preparado sometido a ensayo que para la agrupación standard de virus ensayada de la misma manera a efectos de comparación. En la determinación de los resultados observados pueden desprejarse por un acuerdo muestras que ofrezcan cómputos de un número de placas desusadamente elevado, por ejemplo 15 ó 18. Después de unos tres días se observa un incremento en el número de placas, pudiendo considerarse a éstas últimas como placas secundarias.

Empleando el procedimiento de ensayo antes descrito con virus HGP en cultivos de células de riñón de mono, se ha demostrado que de las condiciones aquí descritas para la propagación del virus, es el valor de PH lo que importa en lugar de las especies iónicas usadas para producir el adecuado pH. Así, se comprenderá que el ión bicarbonato no es factor esencial en el proceso de la presente invención o en el método de ensayo aquí descrito, pudiendo emplearse también adecuados amortiguadores, por ejemplo amortiguadores de fosfatos a los que anteriormente se ha hecho referencia.

Se ha demostrado también que si se mezcla el virus HGP antes de la inoculación en el medio de cultivo con un anti-suero hiperinmune específico preparado en un conejo, el cómputo de placas queda reduci-



204,30

do. Por consiguiente el método de ensayo antes descrito puede usarse no simplemente como un método de control en la producción de una vacuna sino además conjuntamente con un suero inmune específico para la identificación y comprobación de las razas de virus incorporadas en la vacuna. El método puede emplearse además para determinar la respuesta de los anticuerpos a vacunas experimentales o vacunas sometidas a ensayos que hayan sido aplicadas a animales o seres humanos.

Como alternativa en el uso de células de riñón de mono en el método de ensayo de esta invención, pueden emplearse células del amnios o del riñón humanos, aunque en tales casos las placas pueden ser más difíciles de contar. El método de ensayo y el proceso de esta invención son aplicables a la raza FK y otras de virus, así como a la raza HGP.

REIVINDICACIONES

En resumen; La Patente de Invención que se solicita recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Proceso para la producción de un material que pueda emplearse como producto intermedio de vacuna o para fines experimentales, caracterizado porque se inocular un medio salino adecuado para cultivo de tejidos y que contiene tejidos o células vivos de riñón de mono o tejido o células vivos de riñón de embrión humano con material que contenga por lo menos una raza de virus de resfriado común humano, después de lo cual se incuba el medio a una temperatura de 30 a 36 °C, a un pH de 6,4 a 7,4, hasta que el virus se haya multiplicado muchas veces en el medio.

2ª.- Proceso según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el recipiente que contiene el medio y el tejido o células es agitado durante la incubación.

3ª.- Proceso según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el pH está comprendido entre 6,4 y 7,2.

204.30



1961

4^a.- Proceso según las reivindicaciones 2 ó 3, caracterizado por que el pH está comprendido entre 6,8 y 7,2.

5^a.- Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 2 a 4, caracterizado porque la temperatura se halla comprendida entre 31 y 35°C.

6^a.- Proceso según la reivindicación 5^a, caracterizado porque la temperatura se halla comprendida entre 32 y 34°C.

7^a.- Proceso según la reivindicación 6^a, caracterizado porque la temperatura está comprendida entre 32,5 y 33,5°C.

8^a.- Proceso según cualquiera de las anteriores reivindicaciones 2 a 7, caracterizado porque el medio contiene bicarbonato metálico alcalino en una concentración de 0,001 M. a 0,01 M.

9^a.- Proceso según la reivindicación 8^a, caracterizado porque la concentración es de 0,002 M. a 0,005 M.

10^a.- Proceso según las reivindicaciones 8 ó 9, caracterizado porque el bicarbonato metálico alcalino es bicarbonato sódico.

11^a.- Proceso según cualquiera de las anteriores reivindicaciones 2 a 10, caracterizado porque el medio contiene uno o más antibióticos.

12^a.- Proceso según cualquiera de las anteriores reivindicaciones 2 a 11, caracterizado porque el medio contiene un agente antifúngico.

13^a.- Proceso según cualquiera de las anteriores reivindicaciones 2 a 12, caracterizado porque el material del tejido o células tiene la forma de una sola capa de células que se desarrollan en el medio.

14^a.- Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 2 a 7, y 11 a 13, caracterizado porque el medio contiene un amortiguador de fosfato sódico con un pH de 7,14 a 7,69 a una concentración de 0,05 M.

15^a.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de invención que se solicita: " PROCESO PARA LA PRODUCCION DE UN MATERIAL QUE PUEDA EMPLEARSE COMO PRODUCTO INTERMEDIO DE



19

vacuna o para fines experimentales".

Todo tal como se reivindica y describe en la presente memoria que consta de once páginas mecanografiadas por una sola cara.

Madrid, 19 de Enero de 1961

5)

ALFONSO UNGRIA

264136