

302.283



302283

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

a favor de:

BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, de nacionalidad alemana, residente en 355 Marburg/Lahn (República Federal Alemana), por:
"PROCEDIMIENTO PARA LA ADAPTACION DE VIRUS DE GLOSOPEDA A CULTIVOS DE TEJIDOS".

- - - - -

Memoria descriptiva

Constituye el objeto de la invención un procedimiento para la adaptación de virus de glosopeda a cultivos de tejidos.

Hablando de virus, se entiende por adaptación la adaptación a condiciones alteradas de multiplicación, que aumenta en el transcurso de los pasajes. La adaptación del virus natural de glosopeda ha concluído cuando, con una total destrucción de las células por el virus (poder citopatógeno), se ha alcanzado un elevado título de virus. Hasta ahora, se necesitaban para la adaptación 15-42 pasajes, según la raza del virus. Las vacunas inactivadas



302283

10 obtenidas de tales virus no conducen a una inmunidad segura y duradera porque el poder antigénico de los virus de glosopeda, que constituye la condición previa para una tal vacuna, disminuye muy rápidamente en el transcurso de los pasajes de un tejido a otro.

15 Ahora bien, se ha hallado un procedimiento para la adaptación a cultivos de tejidos de virus de glosopeda caracterizado por criarse virus natural de glosopeda en un cultivo de tejidos de órganos de animales de pezuña con una cantidad de inoculación cuyo volumen se encuentra, con respecto a la superficie de las
20 células, en la relación de 1:1 hasta 1:50, y preferiblemente de 1:10, y que contiene una cantidad de virus de 10^8 hasta 10^{10} DL₅₀-ratón, eliminando la solución superyacente con los virus no adsorbidos después de 5 a 120 minutos, y preferiblemente después de 15 minutos, y sustituyéndola con una solución alimenticia
25 adecuada para la multiplicación del virus, y recogiendo después de 12 a 48 horas, y preferiblemente 24 horas, la parte superyacente que contiene virus y sometiénola de manera en sí conocida, con reducción de la cantidad de vacuna inoculada, a ulteriores pasajes, o poniendo la parte superyacente que contiene virus
30 del primer pasaje, sin diluir y en diluciones decimales progresivas sobre cultivos de tejidos de órganos de animales de pezuña, crecidos en recipientes de vidrio de superficie de fondo plana, eliminando la solución superyacente con los virus no adsorbidos, después de 5 a 120 minutos, y preferiblemente después de 20 a 40
35 minutos, cubriendo la alfombra de células con una solución alimenticia que contiene una substancia que aumenta la viscosidad, y cuyo volumen se encuentra con respecto a la superficie de las células en una relación de 1:3 a 1:20, y preferiblemente de 1:10,



3-2283

40 incubándose de manera estacionaria a unos 37° C, tomando después de 18 a 72 horas una muestra de la suspensión sobre una placa en el grado de dilución más alto que todavía contiene placas y poniéndola sobre un cultivo de tejido en el cual se cultiva ulteriormente de manera en sí conocida, y recogiendo el virus.

45 El virus natural de glosopeda es obtenido por extracción de partes infectadas de piel o de mucosa de animales de pezuña. Convenientemente, se obtiene el virus natural de glosopeda de aftas de la lengua de ganado vacuno. Una afta es una ampolla, que contiene virus de glosopeda, producida por la infección por el virus de glosopeda.

50 Como virus de glosopeda con los cuales puede aplicarse el procedimiento de la invención son de considerar, en primer lugar, los tipos de virus europeos y sudamericanos O, A y C (indicándose los subtipos con cifras arábigas, y significando, por ejemplo O₂ que el virus empleado pertenecía al tipo O y al subtipo 2. Otra distinción es la de la subdivisión en razas, cuya indicación se refiere en general al nombre de la localidad o del País en el cual la raza fué aislada por primera vez). También los tipos africanos y asiáticos son indicados para el procedimiento de la invención.

60 Entre los animales de pezuña se cuentan el ganado vacuno, la oveja, la cabra y el cerdo. Como órganos de los animales de pezuña son de considerar, por ejemplo, los riñones, los testículos y los ovarios.

65 Los cultivos de tejidos son obtenidos por digestión con tripsina de los órganos desmenuzados y cultivo de las células individuales así obtenidas sobre superficie de vidrio de recipientes de cultivo de fondo plano.



302283

14 DIC. 1964

70 Como solución alimenticia para la multiplicación de los vi-
rus, se emplean convenientemente soluciones salinas con conteni-
do de electrólito fisiológico y un azúcar, como glucosa, por
ejemplo el medio de cultivo de virus VM 3 (Schwoebel, W. y
Siedentopf, V., Zbl. Bakt. I. Abt. (Orig.) 181, 3 - 16, 1961),
cuyo valor pH se ha regulado, de acuerdo con el máximum de ac-
75 tividad del virus de glosopeda, sobre un valor pH de 7,1 hasta
7,4, por ejemplo con solución de sosa cáustica diluída, bicar-
bonato de sodio, tampón de barbiturato o de fosfato. Convenien-
temente, se aplica el procedimiento de la presente invención a
una temperatura de unos 37° C.

80 El contenido de virus de glosopeda que se halla en una so-
lución, es determinado mediante la DL_{50} -ratón, es decir la dosis
infecciosa que mata al 50% de una población de ratones de 5 - 7
días.

85 Como substancias que aumentan la viscosidad son de conside-
rar los polisacáridos, por ejemplo la metilcelulosa, o las pro-
teínas, por ejemplo las gelatinas.

90 Por placas, se entienden focos de destrucción de células en
el cultivo de tejido, provocados por la multiplicación local de
partículas citopatógenas de virus. La confluencia de las distin-
tas placas es impedida mediante la adición de un medio que aumen-
ta la viscosidad.

95 Al aplicar el procedimiento de la invención, se procede con-
venientemente inoculando un extracto de virus natural de glosopeda al 10% aproximadamente, procedente de aftas de lengua de
ganado vacuno, en una cantidad de aproximadamente 30 ml, es de-
cir de 10^8 a 10^{10} DL_{50} -ratón, a un cultivo de tejidos de órganos
de animales de pezuña, por ejemplo riñones de terneros de una

302283



superficie de aproximadamente 300 cm². Después de un tiempo
de adsorción de 5 a 120 minutos, y preferiblemente de 10 a 30
100 minutos, se vierte la parte superyacente que contiene los vi-
rus de glosopeda no adsorbidos. A continuación, se cubre el
cultivo de tejido con una capa de solución alimenticia de apro-
ximadamente 50 ml y se incuba durante unas 24 horas. A conti-
nuación, se aísla la parte superyacente que contiene el virus,
105 se pone en una cantidad menor, por ejemplo la 3ª o 30ª parte
de la cantidad de inoculación del 1er pasaje, sobre análogos
cultivos de tejidos de riñones de terneros, y se somete así
a otros 2 o 3 pasajes. En la mayoría de las razas de virus de
glosopeda, la adaptación concluye entonces sin empeoramiento
110 comprobable alguno de su capacidad antigénica. Este material de
virus es adecuado para la obtención de una vacuna inactivada
de glosopeda que proporciona una inmunidad segura y duradera.

Una característica especial del procedimiento según la
invención está constituida por el corto tiempo de adsorción
115 de virus después de la inoculación del primer cultivo, que se
realiza con grandes cantidades de extracto de aftas que con-
tiene virus natural de glosopeda. Son necesarias grandes can-
tidades para introducir en el primer cultivo inmediatamente
la cantidad mayor posible de partículas de virus afines al cul-
120 tivo de tejido, y la adaptación de la raza de virus de glosope-
da concluye por multiplicación de dichas partículas al cabo de
3 o 4 pasajes.

Hay razas de virus de glosopeda que, a pesar de estas me-
didas, no están adaptadas todavía por completo al cultivo de
125 tejido después de tres o cuatro pasajes, como por ejemplo la
raza O₂-Normandía, que sólo después de 10 pasajes de cultivo de



302283

130 tejido revela una adaptación completa. Aún cuando este número es inferior al de los procedimientos conocidos, sin embargo, para una completa conservación de la capacidad antigénica del virus, sería deseable que esta cifra pudiera ser reducida. 135 ulteriormente. Para conseguirlo, se ejecuta el segundo pasaje en forma de pasaje selectivo de placa.

135 Para ello, se procede convenientemente poniendo en un volumen de 10 ml por cultivo la parte superyacente del primer pasaje de cultivo de tejido sin diluir y en diluciones decimales progresivas sobre cultivos de tejidos de riñones de ternero, crecidos en recipientes de vidrio de fondo plano, cuya superficie es de aproximadamente 300 cm².

140 Después de una duración de adsorción de 5 a 120 minutos, y preferiblemente de 20 a 40 minutos, se decanta la parte superyacente, se cubren los cultivos de tejido después de un doble lavado con una solución fisiológica amortiguada de sal de cocina, con 30 ml de un medio de cultivo, por ejemplo un medio de cultivo que contenga 0,75% de metilcelulosa así como rojo 145 neutro en una concentración de 1:20 000. De las placas que se forman después de 18 - 72 horas, se aísla una placa aspirando mediante un tubo capilar 0,1 - 0,5 ml del medio de cubrimiento que se encuentra sobre una placa de la fase de dilución más alta que contiene todavía placas, y se emplea como material de 150 inoculación para un ulterior pasaje de cultivo de tejido, que por tanto se realiza con virus completamente citopatógeno ya adaptado y cuya parte superyacente puede ser empleada para la obtención de una vacuna inactivada contra la glosopeda que proporciona una inmunidad segura y duradera.

155 Sobre los procedimientos del estado actual de la técnica, el procedimiento según la invención ofrece la ventaja de que



302283

el contenido de virus necesario para la obtención de una vacuna contra la glosopeda es obtenido ya a los tres o cuatro pasajes, después de tomarse las medidas anteriores. El procedimiento tiene gran importancia también porque, de presentarse repentinamente nuevas y exóticas variantes o tipos, puede obtenerse rápidamente en el laboratorio el virus para la obtención de una vacuna inactivada contra la glosopeda. Como, al aumentar el número de los pasajes necesarios para la adaptación, el poder antigénico del virus de glosopeda disminuye rápidamente, hay que ver en el procedimiento de la invención una ventaja particular en el hecho de que, con sólo pocos pasajes y conservando todo el poder antigénico, permite la adaptación, en cultivos de tejidos, de virus de glosopeda propicios a la adaptación, así como de virus menos propicios a ella.

Ejemplo 1

30 ml de una suspensión de virus natural de glosopeda de ganado vacuno, del tipo C, raza Tölz, obtenida por extracción de 3 g de aftas de lengua de ganado vacuno machacadas en mortero y de un contenido de virus de $10^{6,8}$ DL₅₀/0,1 ml ratón, son inoculados en un cultivo de tejido de riñones de ternero de una superficie de aproximadamente 300 cm². Después de una adsorción de virus de una duración de 30 minutos, se elimina la parte superior, se cubre el cultivo infectado con 50 ml del medio de desarrollo de virus VM₃ y se incuba durante 24 horas a 37° C. El medio de cultivo que contiene virus así obtenido es recogido e inoculado en una cantidad de 1 ml en un cultivo de riñones de ternero de igual tamaño. Después de otra incubación de 24 horas, se infecta con el 2º pasaje así obtenido otro cultivo de igual tamaño con 0,1 ml de la parte superyacente del cultivo que con-



2283

tiene virus de glosopeda. La suspensión de virus obtenida mediante una nueva incubación de 24 horas (3^{er} pasaje) puede eventualmente ser empleada, por su elevado contenido de virus, para la obtención de una vacuna inactivada contra la glosopeda.

190

Durante el cultivo de los tipos A y O, los dos primeros pasajes se verifican de la misma manera que para el tipo C. Para el virus A, se inocular sólo el tercer pasaje con 0,5 ml y el cuarto con 0,1 ml. El cuarto pasaje, debido a su elevado contenido de virus, puede ser utilizado como virus para la obtención de una vacuna inactivada contra la glosopeda.

195

El virus O es inculado a partir del tercer pasaje, pasando por otros 8 pasajes, con cantidades menguantes de 1,0 hasta 0,05 ml. El 10^o pasaje posee un contenido de virus de $10^{7,1} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (una TCID_{50} es la dosis de infección por la cual es destruido por el virus el 50% de los cultivos de tejido infectados), que basta para la preparación de una vacuna inactivada de glosopeda del tipo O.

200



	Tipo de virus de glosopeda	Pasaje por rifiones de ternero	Dosis de inoculación (en ml)	Efecto cito patógeno 1) 24 horas p.i. 2)	Contenido de virus (en TCID ₅₀ /ml)
205	C	1.	30	30	
210	Raza T81z	2.	1	90	
		3.	0,1	100	10 7.1
		4.	0,05	100	10 7.7
215	A Subtipo 5 Raza Hannover	1.	30	70	
		2.	1	80	
		3.	0,5	100	10 6.5.
		4.	0,1	100	10 6.9
		5.	0,05	100	10 7.5
220 225	O Subtipo 2 Raza Normandia	1.	30	10	
		2.	1	15	
		3.	1	30	
		4.	0,5	25	
		5.	0,5	35	
		6.	0,1	50	
		7.	0,1	50	10 6.9
		8.	0,1	75	
		9.	0,05	80	
		10.	0,05	100	10 7.1
		11.	0,05	100	
		12.	0,05	100	

230 1) = comprende todas las formas de alteraciones de células provocadas por el virus, expresadas en porcentaje con respecto a la superficie total de cultivo.

2) = post infectionen.



2283

Ejemplo 2

235 Se aplican a un cultivo de tejido de riñón de ternero, de una superficie de aproximadamente 300 cm², 30 ml de una suspensión de virus natural de glosopeda de ganado vacuno del tipo 0, subtipo 2, raza Normandía, obtenida por extracción de 3 g de aftas de lengua de ganado vacuno machacadas en mortero y que
240 posee un contenido de virus de $10^{7,1} \text{DL}_{50}$ -ratón/0,1 ml. Después de un tiempo de adsorción de virus de 30 minutos, se elimina la parte superyacente, se cubre el cultivo infectado con 50 ml del medio de cultivo de virus VM₃ y se incuba durante 24 horas a
245 37^o C. El medio de cultivo que contiene virus así obtenido es recogido y aplicado sin diluir y en diluciones decimales progresivas a cultivos de tejido de riñón de ternero de igual tamaño en una cantidad de 10 ml por cultivo de tejido. Después de una duración de adsorción de 30 minutos, se elimina la parte superyacente de la solución con los virus no adsorbidos y se
250 cubre la alfombra de células con 30 ml del medio de cultivo de virus VM₃ que contiene un 0,75% de metilcelulosa. A las 48 horas, se pone en el cultivo de tejido que contiene menos placas un tubo capilar en el centro de una placa y se aíslan 0,2 ml del medio que se encuentra sobre la placa. Esta muestra, que contiene
255 partículas de virus completamente citopatógenas, es aplicada a un cultivo de tejido de riñón de ternero de igual tamaño y, a continuación, incubada durante 24 horas a 37^o C. La parte superyacente de este pasaje posee un título de $10^{7,7} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ y puede eventualmente ser utilizada para la obtención de una vacuna
260 inactivada contra la glosopeda.

La Tabla siguiente muestra en las cuatro primeras columnas la adaptación de la raza O₂-Normandía según el método indicado en el Ejemplo 1. De ello resulta que, para una adaptación prác-



302283

265 ticamente completa, se necesitan 10 pasajes cuando el primer pasaje ha sido realizado con una cantidad de inoculación de 30 ml, y los pasajes siguientes con cantidades fuertemente reducidas.

270 Las columnas 5 a 9 indican la adaptación de la misma raza de virus cuando el segundo pasaje es realizado a modo de pasaje selectivo de placa. De los datos indicados resulta que la adaptación ha concluido prácticamente después de 3 pasajes y que, con la ayuda de esta fase del procedimiento, ha sido acortada en 7 pasajes.

Pasaje por riñones de ternero de O ₂ -Normandia	Efecto citopatógeno l) 24 horas p.i.)	Dosis inoculada (ml)	Título del virus (TCID ₅₀ /ml)	Pasaje de placa	Pasaje por riñones de ternero	Efecto citopatógeno (24 horas p.i.)	Dosis inoculada (ml)	Título del virus (TCID ₅₀ /ml)
1.	10	30		2 →				
2.	15	1						
3.	30	1			3.	95	0,2	10 ^{7,3} 7,7
4.	25	0,5			4.	95	0,05	10
5.	35	0,5						
6.	50	0,1						
7.	50	0,1	10 ^{6,7}					
8.	75	0,1						
9.	80	0,05						
10.	95	0,05	10 ^{7,1}					
11.	95	0,05						
12.	95	0,05						

22283

275

280

285

290 l) = comprende todas las formas de alteraciones de células provocadas por el virus, expresadas en porcentaje referido a la superficie total del cultivo.





3-2283

295 Esta solicitud corresponde a la presentada en Alemania el 24 de Julio de 1.963 bajo el número B 72 824 IVa/30h, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial y del artículo 4º del Convenio de la Unión.

REIVINDICACIONES

300 1). Procedimiento para la adaptación de virus de glosopeda a cultivos de tejidos, caracterizado por cultivarse virus natural de glosopeda en un cultivo de tejidos de órganos de animales de pezuña con una cantidad de inoculación cuyo volumen se encuentra en la relación de 1:1 hasta 1:50 con respecto a la superficie de células y que contiene una cantidad de virus de 10^8 hasta 10^{10} DL₅₀-ratón, por eliminarse la solución super
305 yacente con los virus no adsorbidos después de 5-120 minutos, añadirse una solución alimenticia adecuada para la multiplicación del virus, recogerse después de 12-48 horas la solución superyacente que contiene virus y someterse la misma, con reducción de la cantidad inoculada, a ulteriores pasajes de manera en sí conocida, o por ponerse la solución superyacente
310 que contiene virus del primer pasaje sin diluir y en diluciones decimales progresivas sobre cultivos de tejidos de órganos de animales de pezuña, crecidos en recipientes de vidrio de superficie de fondo plana, eliminando la solución superyacente con los virus no adsorbidos después de 5-120 minutos, por cubrir
315 se la alfombra de células con una solución alimenticia que contiene una sustancia que aumenta la viscosidad y cuyo volumen, con respecto a la superficie de las células, se encuentra en la relación de 1:3 a 1:20 tomarse después de 18 - 72 horas una mues



3-2283

320 tra de la suspensión sobre una placa en la fase de dilu-
ción más alta que contiene todavía placas, ponerla sobre un
cultivo de tejido, cultivarla, ulteriormente de manera en sí
conocida y recogerse el virus.

2). PROCEDIMIENTO PARA LA ADAPTACION DE VIRUS DE GLOSOPEDA A
CULTIVOS DE TEJIDOS.

325 Esta Memoria consta de catorce hojas foliadas y mecano-
grafiadas por un sólo lado de sus caras.

Madrid, 21 de Julio de 1.964

bau