

IV.

C. 9892.



330274

330274

PATENTE DE INVENCION
=====

a favor de

MERCK & CO., INC. - de nacionalidad norteamericana - domicilia-
da en 126 East Lincoln Avenue, RAHWAY, New Jersey, (EE.UU.)

por :

"Procedimiento para preparar una vacuna contra las paperas".

-----:OO:-----

Memoria descriptiva
=====

**POOR
QUALITY**

330274

- 2 -

Meck & Company Incorporated
Case 9892



La presente invención se relaciona con vacunas y particularmente con un virus vivo atenuado de las paperas que se debe inyectar en seres humanos para protegerlos contra las paperas. La presente invención incluye también el desarrollo de la cepa del virus atenuado.

Debido a la naturaleza atenuada del virus, produce poca o ninguna reacción clínica. Sin embargo, despierta un nivel significativo de anticuerpos contra el virus en el hombre, y este anticuerpo es esencial para la protección contra la infección con el virus y contra la enfermedad

Por lo general se considera las paperas, lo mismo que el sarampión, como una de las enfermedades menores de la niñez. Esto es cierto en el caso de la infección clínica común. Sin embargo, en el caso extraordinario, la consecuencia clínica de la infección por virus puede ser severa y las secuelas pueden ser tan devastadoras como en el caso del sarampión.

En el caso usual de las paperas, el episodio febril agudo sigue a un período de incubación de 18 a 21 días. Las principales manifestaciones clínicas son fiebre con hinchazón unilateral o bilateral de la parótida, viéndose a veces también comprometidas las glándulas submaxilares y sublinguales.

La viremia acompaña comúnmente a la infección por el virus de las paperas y pueden verse comprometidos diversos órganos o sistemas de órganos. Pueden incluir al epidídimo, próstata, ovarios, hígado, páncreas, bazo, tiroides, riñones, laberinto, ojos, timo, miocardio, glándulas mamarias y el sistema nervioso central. Las manifestaciones más destacadas de la enfermedad son encefalitis, encefalomielitis, neuritis facial, nervios trigémino u óptico; meningitis aséptica (0,5 a 10 % de los casos); esclerotitis; pancreatitis que a veces conduce a las diabetes; y orquitis u ovari-

5966

FD/EM 30



tis que conducen a veces a atrofia y esterilidad. Las complicaciones serias son menos frecuentes entre los niños. El aspecto mas serio se relaciona con la presencia de la infeccion en adultos que no han contraido esta enfermedad durante la niñez.

5 Las paperas sin complicaciones debilitan al niño, complican la vida a los padres, y dan por resultado pérdidas apreciable de tiempo escolar. Las paperas con complicaciones, ya sea en la niñez o en la adultez, pueden extenderse desde una enfermedad su-
 ve con recuperación aparentemente total, hasta la destrucción o in-
 10 capacitación de sistemas de órganos esenciales que pueden conducir hasta la muerte o a invalidez para toda la vida.

En términos generales, la presente invención se relaciona con la adaptación y propagación del virus de las paperas en cultivos de tejidos preparados a partir de huevos de gallina embrionados. Mas particularmente, la presente invención se relaciona con
 15 el desarrollo de una vacuna de virus vivo atenuado de las paperas después del pasaje seriado en cultivo de tejido embrionario de pollo. Este procedimiento involucra las etapas: (A) la aislación del virus virulente en cualquier variedad de células en cultivo o huevos de gallina embrionados, y su adaptación a cultivo de tejido em-
 20 brionario de pollo; (B) el desarrollo del virus vivo atenuado, mediante una pluralidad de pasajes seriados en cultivo de tejido embrionario de pollo; y (C) la preparación de la vacuna a partir de este virus vivo atenuado. Se explicará por separado estas etapas.

25 A) Aislación y adaptación de virus virulente

Se puede llevar a cabo la aislación y adaptación de virus de las paperas en cultivo de tejido embrionario de pollo usando material clínico (por ejemplo obtenido de la garganta) o virus previamente propagado en huevos de gallina embrionados. La incubación de cultivos infectados puede llevarse a cabo entre 30 y 34 °C

30



(óptimo 32 °C) o entre 35 y 38 °C (óptimo 36 °C). Los procedimientos representativos de aislamiento son los siguientes:

Procedimiento 1.- Se aísla virus de las paperas en huevos de gallina embrionados a partir de material clínico, es decir de personas que se sabe que tienen paperas.

Procedimiento 2.- Se aísla el virus de las paperas en cultivo de tejido embrionario de pollo a partir de material clínico.

B) Desarrollo de vacuna de virus vivo atenuado de las paperas

Se agrega el virus, que se ha establecido en (A) que es virus de las paperas, a botellas de vidrio que contienen cultivos de tejido embrionario de pollo preparados a partir de embriones picados y triplicados de pollo de aproximadamente 10 días de edad. El medio de cultivo puede ser cualquiera de los que soportan el crecimiento de células, pudiendo ser por ejemplo el conocido medio 199 al cual se ha agregado suero de ternero. Después de la adición del virus, se incuba los cultivos de células infectadas en sucesivos pasajes a 30-38 °C durante períodos variables de tiempo y durante este tiempo el virus se ha reproducido y queda atenuado. Se cosecha entonces los fluidos, que contienen el virus, y se los almacena congelados o a otra baja temperatura de manera de preservar la infectiosidad del agente.

Se lleva a cabo los pasajes seriados precedentes, usando inoculum diluido y se recoge múltiples cosechas a diversos intervalos. Se lleva a cabo titulaciones de infectividad en cultivos de HeLa, de tejido de riñón de mono e tejido embrionario de pollo.

C) Preparación de vacuna

Se ha comprobado que el virus de las paperas cosechado después de este pasaje seriado repetido, es no patógeno para monos y roedores, causa poca o ninguna reacción clínica en receptores humanos, y despierta un significativo nivel de anticuerpo. Se esta-

330274

- 5 -



biliza la infectividad del virus mediante un estabilizador apropiado tal como sacarosa, albúmina humana, glutamina, fosfato o mezclas de los mismos. Después de la titulación para establecer su potencia, se subdivide la masa de virus y con ella se llena ampollas para el uso. Se puede almacenar el producto y suministrarle congelado o de preferencia secado a partir del estado congelado, manteniéndolo libre de humedad.

Ejemplos ilustrativos son los siguientes.

EJEMPLO I

El inoculum es el que se obtiene a partir del procedimiento 1 descrito mas arriba.

Bajo condiciones asépticas se pica finamente esbriches de pelle de 9 a 11 días de edad, después de eliminar la cabeza y las extremidades, y se lava el tejido, así picado, en varios cambios de BSS de Hanks. Se tripsiniza a 36 °C el tejido así lavado, usando tripsina al 0,25 % (Difco L; 250) en regulador tris salina durante 2 a 3 hr. Se cosecha la suspensión de células en tripsina a través de dos espesores de estopilla de algodón estéril, y se centrifuga entonces a 1500 r.p.m. durante 5 min. Se resuspende las células compactadas, en un medio de crecimiento para el recuento. El medio de crecimiento consiste en el medio 199, que contiene suero de ternero al 2 % (calentado a 56 °C durante 30 min) y 50 µg/ml de neomicina. Se planta cultivos en botella a una concentración de 350.000 células viables por mililitro. Después de incubarse a 36 °C durante 48 a 72 hr, se puede usar los cultivos en botella para el pasaje seriado o preparación de la vacuna.

Se prepara cultivos de tejido embrionario de pelle en botellas de vidrio usando el medio 199 que contiene suero de ternero inactivado al 2 % como medio de crecimiento. Tres a cuatro días después de plantar, se retira asépticamente el medio de crecimiento y



se lava los cultivos en botella 4 veces con BSS de Hanks, a razón de 100 ml per lavado, y se inocular 2,5 ml de siembra de virus ti-
 luido de las paperas per botella. A cada cultivo en botella se a-
 grega 70 ml del medio 199 que contiene 10 % de estabilizador apre-
 piado de la infectividad de virus, y se incuba las botellas entre
 5 30 y 34 °C. Al crecimiento y medio de mantenimiento se incorpora
 neomicina a una concentración de 50 µg/ml. A intervalos de 2 a 4
 días se recoge cosechas múltiples y se vuelve a alimentar los cul-
 tivos en botella con nuevo medio de mantenimiento que contiene el
 10 estabilizador mencionado mas arriba. Se lleva a cabo 10 pasajes
 sucesivos, todos a la temperatura aproximadamente de 32 °C. Se lle-
 va a cabo titulaciones de infectividad de cada cosecha en culti-
 vos de HeLa o de tejido de riñón de mono. Se recoge asépticamente
 cada cosecha en un envase estéril, se retira muestras para ensa-
 15 yes de esterilidad microbiana, y se congela el resto en un baño de
 hielo seco-alcohol. Se almacena los flúidos, que contienen el vi-
 rus, a -70 °C en una unidad congeladora eléctricamente operada ab-
 tes de la selección de una o mas cosechas para la preparación de la
 vacuna.

20 se elige una o mas cosechas apropiadas después de comple-
 tar las titulaciones de infectividad. Se retira del congelador el
 material seleccionado y se le descongela. Se retira una muestra
 como testigo y para ensayo de seguridad. Se clarifica el flúido
 restante y se retira una muestra para el ensayo de seguridad en
 25 monos. Al flúido restante se agrega estabilizador apropiado adi-
 cional. Se distribuye los flúidos en frascos individuales y se
 les seca. Después del procedimiento de secado, se tapa los fras-
 cos, se los cierre herméticamente y se los conserva para la re-
 constitución como vacuna mediante la adición de agua estéril.

30 Ensayos en el hombre. - Aproximadamente 150 niños, que



carecen de historia anterior de infección por paperas, reciben una dosis de la vacuna de virus atenuado de las paperas por vía parenteral. Esencialmente, todos los niños responden con un título significativo de anticuerpo dentro de un mes después de la vacunación. Los niños desarrollan poca o ninguna manifestación clínica de acuerdo con la cepa del virus de las paperas y el nivel de pasaje en cultivos de huevos de gallina embrionados y de tejido embrionario de pollo.

EJEMPLO II

Se lleva a cabo el procedimiento del Ejemplo I, aunque la incubación del virus de las paperas se lleva a cabo en la gama de 35 a 38 °C y cercanamente a 36 °C.

EJEMPLO III

Se lleva a cabo el procedimiento del Ejemplo I, pero usando la siembra de virus de paperas del Procedimiento 2.

Para atenuar el virus se puede realizar una cantidad mayor o menor de pasajes sucesivos del virus en el cultivo de tejido de embrión de pollo. Puede ser precedido también por pasajes seriados a través de huevos de gallina embrionados. Se ilustra esto mediante los siguientes ejemplos en los cuales:

HGE representa huevos de gallina embrionados.

TEP representa cultivo de tejido embrionario de pollo.

EJEMPLO IV

3 HGE a 30-38 °C + 1 TEP a 30-38 °C.

EJEMPLO V

10 HGE a 30-38 °C + 10 TEP a 30-38 °C.

EJEMPLO VI

20 HGE a 30-38 °C + 2 TEP a 30-38 °C.

EJEMPLO VII

Atenuación directa en TEP a 30-38 °C + 1 TEP a 30-34 °C.

330274



Ejemplo VIII

Aislación directa en TEP a 30-38 °C + 10 TEP a 30-34 °C.

EJEMPLO IX

Aislación directa en TEP a 30-38 °C + 1 TEP a 35-38 °C.

5

EJEMPLO X

Aislación directa en TEP a 30-38 °C + 10 TEP a 35-38 °C.

Se ha descrito la presente invención con particular referencia a 10 pasajes seriados a través de TEP para asegurar la atenuación del virus, pero se comprenderá que puede bastar una cantidad menor.

10

Por ejemplo, la presente invención contempla una sola incubación en TEP para lograr el desideratum de un virus que despertará una respuesta de anticuerpo de las paperas en seres humanos con una reducción de los síntomas de la enfermedad que, en caso contrario, son severos. Es de esperar que los pasajes sucesivos, después del primer crecimiento en TEP den por resultado una mayor atenuación.

15

N O T A
=====

Se reivindica como objeto de la presente patente :

1. - Procedimiento para preparar una vacuna contra las paperas que despierta en el hombre una respuesta de anticuerpos contra el virus sin causar las severas manifestaciones clínicas de la enfermedad, que comprende hacer pasar el virus virulento, por un cultivo de tejido de embrión de pollo, una cantidad suficiente de veces para atenuar al virus.

25

2. - Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se realizan por lo menos 10 pasajes seriados.

3. - Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los embriones de pollo empleados tienen nueve a once días de edad.

30

4. - Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la incubación se lleva a cabo entre 35 y 38 °C.

330274



5. - Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la incubación se lleva a cabo entre 30 y 34 °C.

6. - Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichos pasajes seriados están precedidos por incubación en huevos de gallina embrionados.

7. - Procedimiento para preparar una vacuna contra las peras.

Esta memoria consta de nueve páginas, escritas por una sola cara.

BARCELONA,

P. A.

[Handwritten signature]
14 AGO 1966