



PATENTE DE INVENCION

Your Case Nº 21.014.

*Memoria Descriptiva*  
*sobre*

330307

"Procedimiento para preparar un virus  
de sarampión vivo atenuado".

=.=.=.=.=

*Solicitante:* AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana,  
residente en: Berdan Avenue, Township of Wayne,  
Estado de New Jersey, EE. UU. de A.

=.=.=.=.=

Esta invención se relaciona con una atenuación adicional de un virus de sarampión vivo atenuado que se ha adaptado para crecer en un cultivo de tejido de embrión aviario, en la membrana corio-alantóica de los huevos aviaros en el óvulo.

5.



- El desarrollo de las vacunas del sarampión se hizo posible por Enders y sus asociados que propagaron el virus del sarampión en cultivos de riñón de seres humanos y de simios, adaptaron la cepa Edmoston del virus a embriones de pollo inoculados a través del saco amniótico y cultivaron aquella cepa en monocapas de celdas de embrión de pollo haciendo de esta manera disponibles vacunas de sarampión incorporando virus de sarampión ya fuera vivos o inactivados.
- 5.
10. Las vacunas de virus vivo (vacunas de Enders), preparadas a partir de la cepa Edmoston después de 13 a 20 pasadas en cultivos del tejido de embrión de pollo, demostraron ser altamente inmunogénicas cuando se administraron a los niños susceptibles a contraer sarampión. Sin embargo, tanto así como el 40 por ciento de estos niños reaccionaron con temperaturas de 39.45°C., o más elevada y en aproximadamente 50 por ciento se desarrolló una erupción. En los intentos para eliminar o reducir estas reacciones, se administró globulina gamma humana al mismo tiempo que la vacuna (de Enders) o el virus de la vacuna se atenuó adicionalmente, mediante pasadas adicionales en cultivo de tejido de embrión de pollo a varias temperaturas de incubación (de Schwarz). Ambas de estas presentaciones al problema redujeron significativamente la manifestación de las reacciones a la vacuna de sarampión, pero no eliminaron las mismas enteramente. Se ha demostrado que la administración de una vacuna que contiene la cepa de Schwarz atenuada de virus de sarampión, da por resultado en el mismo grado de reactividad, que la adminis-
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



tración de la cepa de Edmoston (vacuna de Enders), son la administración simultánea de globulina gamma.

- La presente invención representa la culminación de una larga serie de investigaciones que se han
5. llevado a cabo extensamente por el inventor y sus asociados, con respecto al problema de la reactividad de la vacuna de virus de sarampión vivo, y los intentos de impedir la misma, atenuando el virus de una manera diferente, a saber, adaptando el virus a la membrana corio-alantóica, del embrión aviario. Los investigadores, en particular Milovanovic, Enders y Mitas, Expedientes de la Sociedad de Experimentos Biológicos y de Medicina 95, 120-127 (1957), "Cultivo del Virus de Sarampión en las Celdas Aniónicas Humanas y en el Em-
  10. brión de Pollo Desarrollado", dan a conocer que fueron insatisfactorios los intentos de adaptar el virus del sarampión en la membrana corio-alantóica del embrión de pollo desarrollado. El concepto inventivo sobre el cual está basada la presente invención, estriba en el
  15. descubrimiento de que un virus de sarampión vivo atenuado, que ha sido adaptado para crecer en un cultivo de tejido de embrión aviario, y que produce un alto régimen de reacción febril y erupción en los niños, puede atenuarse adicionalmente, estableciendo primero
  20. el crecimiento de dicho virus en la membrana corio-alantóica de los huevos aviarios en el óvulo a una temperatura de incubación de aproximadamente 35°C., a 38°C., luego haciendo pasar el virus establecido en
  25. la membrana corio-alantóica de los huevos aviarios en el óvulo a una temperatura de incubación de aproxima-
  - 30.



damente 28°C., a 35°C.

- Por lo tanto, la invención se relaciona con un método para preparar un virus de sarampión vivo atenuado adicionalmente, que comprende introducir un
5. virus de sarampión vivo atenuado que se ha adaptado para crecer en un cultivo de tejido de embrión aviario, y que produce un alto régimen de reacción febril y de erupción en los niños, hacia la membrana corio-alantóica de los huevos aviaros en el óvulo, incubando
  10. dichos huevos a una temperatura de aproximadamente 35°C., hasta aproximadamente 38°C., durante un período de tiempo suficiente para estimular el crecimiento de dicho virus que es entre 6 y 8 días, cosechando el virus producido de esta manera, introduciendo en la
  15. membrana corio-alantóica de los huevos aviaros en el óvulo, dicho virus cosechado, incubando dichos huevos a una temperatura de aproximadamente 35°C., hasta aproximadamente 38°C., durante un período de tiempo suficiente para estimular el crecimiento de dicho virus,
  20. cosechar el virus producido de esta manera, y repitiendo las dos etapas inmediatamente anteriores, durante un número de pasadas suficiente hasta que se establece completamente el crecimiento del virus. El virus establecido luego se cosecha y se introduce en
  25. la membrana corio-alantóica de los huevos aviaros en el óvulo, dichos huevos se incuban a una temperatura de aproximadamente 28°C., hasta aproximadamente 35°C., durante un período de tiempo suficiente para estimular el crecimiento de dicho virus, cosechar el virus pro-
  30. ducido de esta manera, introducir dicho virus cosechado



- establecido en la membrana corio-alantóica de los huevos aviarios en el óvulo, incubar dichos huevos a una temperatura de aproximadamente 28°C., hasta aproximadamente 35°C., durante un período de tiempo suficiente para estimular el crecimiento de dicho virus establecido, cosechar el virus establecido producido de esta manera, y repetir las dos etapas inmediatamente anteriores durante un número de pasadas suficiente para producir un virus de sarampión vivo atenuado adicionalmente, la antigenicidad del cual es suficiente para producir una respuesta inmunogénica.
- 5.
- 10.

- De conformidad con la presente invención, un virus de sarampión vivo atenuado tal como de la cepa de Edmoston, (vacuna de Enders), se introduce en la membrana corio-alantóica de los huevos aviarios en el óvulo y se incuba a temperatura de 35°C., a 38°C., el virus se hace pasar en serie y se incuba a temperatura de 35°C., a 38°C., durante un número de pasadas suficiente para lograr un crecimiento establecido del virus a temperatura de 35°C., a 38°C. El virus establecido luego se introduce en la membrana corio-alantóica de los huevos aviarios en el óvulo y se incuba a temperatura de 28°C., a 35°C., durante un número de pasadas suficiente para lograr una atenuación adicional. Una indicación de una atenuación adicional es la aparición en la membrana corio-alantóica de lesiones inflamatorias y necróticas, y a medida que continúan las pasadas a temperatura de 28°C., a 35°C., se hace más claramente la intensidad de las lesiones inflamatoria y necrótica.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



- Debe observarse que los intentos de hacer pasar el virus de sarampión anteriormente mencionado, antes del establecimiento del crecimiento de dicho virus a temperaturas menores de 35°C., fueron en su mayor parte insatisfactorios, puesto que las pasadas dieron por resultado titulaciones reducidas o no podía percibirse el virus durante la titulación. Por el contrario, la titulación de las pasadas, paralelas a temperatura de 35°C., a 38°C., fueron significativamente más elevadas. Además, el paso continuado del virus del sarampión anteriormente mencionado a temperaturas de incubación de 35°C., a 38°C., una vez que se estableció el crecimiento de dicho virus, dieron por resultado titulaciones considerablemente reducidas.
5. Por último, una vez que se estableció el crecimiento de dicho virus y se inició el paso a temperaturas de incubación de 28°C., a 35°C., el paso a temperaturas de incubación de 35°C., a 38°C., fué igualmente insatisfactorio.
10. El número de pasadas iniciales necesarias para establecer el crecimiento del virus de sarampión anteriormente mencionado, puede ser tan pequeño así como de 6 a 8, o tan elevado así como de 10 a 14.
15. Con respecto a las temperaturas de incubación del método novedoso de la presente invención, la temperatura de incubación preferida para establecer el crecimiento del virus de sarampión anteriormente mencionado, es aproximadamente de 35°C., a 38°C.; mientras que una vez que se ha establecido el crecimiento de dicho virus, se prefiere una temperatura
- 20.
- 25.
- 30.



de incubación de aproximadamente 34°C.

5. El método novedoso de la presente invención emplea huevos aviarios en el óvulo y se prefiere usar huevos de pollo, principalmente como consecuencia de su disponibilidad general a través de todo el año así como su bajo costo. Sin embargo, pueden usarse los huevos de otras especies aviarias tales como pavos, patos, gansos, y aves semejantes.

10. La atenuación adicional del virus de sarampión vivo habiendo sido lograda de la manera anteriormente citada, puede mantenerse la cepa del virus de sarampión viva atenuada adicionalmente (cepa Cabasso) en el cultivo de tejido de embrión aviario, para proporcionar una semilla o la pasada por la membrana corio-alantóica, última, cosechada, puede usarse directamente como una vacuna.

15. Cuando se ha cultivado una o más veces el virus atenuado adicionalmente, en el cultivo de tejido de embrión aviario tal como de pollo, para obtener depósitos para la preparación de la vacuna, el cultivo se incuba a una temperatura de aproximadamente 28°C., a 37°C., hasta que el virus se haya multiplicado para producir una concentración útil del mismo, y el fluido y las celdas de los recipientes del cultivo del tejido se cosechan, bajo condiciones asépticas, y se clarifican mediante centrifugación, filtración, o métodos semejantes. El material resultante de la vacuna puede usarse directamente como una vacuna, o, dependiendo de la concentración contenida del virus, puede diluirse con un diluyente inyectable

- apropiado o una solución de estabilización no tóxica al virus, para preparar una vacuna líquida terminada. La última está exenta de celdas de tejido y de bascras y el contenido de virus se estandariza mediante titulación tal como por ejemplo contra celdas de cultivo de tejido humano o de mono. Luego, si se desea, el concentrado de la vacuna puede emplearse directamente para vacunas para seres humanos no inmunes o puede diluirse con un estabilizante estéril, tal como lactosa, o una solución de glutamato de lactosa y almacenarse congelado a temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$ . a  $-70^{\circ}\text{C}$ ., hasta que se usa. Alternativamente, la vacuna estabilizada puede liofilizarse para proporcionar un producto de vacuna seco que es capaz de almacenarse fácilmente, y que puede reconstituírse con agua estéril o con un líquido semejante, justamente antes de usarse.
- 5.
- 10.
- 15.

- Se proporcionan los siguientes ejemplos para fines ilustrativos y pueden incluir particularidades específicas de la invención, sin embargo, los ejemplos no deben interpretarse como limitando la invención, muchas variaciones de las cuales son posibles sin apartarse del espíritu o del alcance de la misma:
- 20.

EJEMPLO I

- ESTABLECIMIENTO DEL CRECIMIENTO DE  
UN VIRUS DE SARAMPION VIVO ATENUADO
- 25.

El presente ejemplo demuestra el establecimiento del crecimiento del virus de sarampión vivo atenuado en la membrana corio-alantóica de los huevos aviaarios en el óvulo.

30. La cepa Edmoston (vacuna de Enders), del



- virus de sarampión vivo atenuado, se usó como una semilla; dicha cepa ha sido preparada por Enders a partir de un virus aislado de un paciente. El virus se hizo pasar en serie durante 24 pasadas a través de un tejido de riñón humano, se hizo pasar en serie durante 28 pasadas adicionales sucesivas, en un tejido amniótico humano y luego se hizo crecer en embriones de pollo, en el saco amniótico durante 6 pasadas. El virus finalmente se hizo pasar en serie a través de 13 pasadas de un cultivo de tejido de embrión de pollo.
- 5.
- 10.

- La cepa Edmoston anteriormente citada (vacuna de Enders), del virus de sarampión vivo atenuado se introdujo en la membrana corio-alantóica de embriones de 8 días, de nacidos, obtenidos de una parvada libre RIF de pollos desarrollados en los laboratorios Lederle, una División de la American Cyanamid Company, Pearl River, Nueva York, de una parvada comercial de pollos que se probó intensamente para determinar el RIF. Se hicieron inoculaciones en la base de un saco de aire artificial formado en el lado del huevo. Los huevos inoculados se incubaron durante 7 días a temperatura de aproximadamente 37°C., a 38°C., y al séptimo día se abrieron asépticamente. Las membranas corio-alantóicas se examinaron para determinar los cambios macroscópicos, se formaron en depósitos y se usaron para preparar una suspensión al 20 por ciento de la membrana corio-alantóica en agua destilada estéril que contenía 100 microgramos de cada uno de estreptomycin y neomicina. La suspensión infectada de la membrana corio-alantóica, luego se introdujo en la membrana corio-
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



- alantóica de embriones de 8 días de nacidos, de la parvada exenta de RIF anteriormente identificada. Los huevos inoculados nuevamente se incubaron a temperatura de 37°C., a 38°C., durante un tiempo suficiente para estimular el crecimiento del virus. Las pasadas en serie se continuaron hasta que se estableció el crecimiento del virus en la membrana corio-alantóica.
5. Este punto se aseguró titulando una suspensión al 20 por ciento de cada pasada de la membrana corio-alantóica en un cultivo de célula de riñón de mono, cercopithecus. El establecimiento del crecimiento del virus, se logró durante el curso de 11 pasadas a temperatura de 37° a 38°C. Después de la onceava pasada, se cosechó una titulación de  $10^{2.5}$  TCID por mililitro.
10. Las pasadas después de la onceava pasada a temperatura de 37° a 38°C., dieron por resultado titulaciones reducidas o negativas.
- 15.

#### Ejemplo II

##### PASO DEL VIRUS ESTABLECIDO

20. Este ejemplo demuestra las pasadas adicionales del virus establecido del Ejemplo I.
- Una suspensión al 20 por ciento de la membrana corio-alantóica infectada de la onceava pasada del Ejemplo I, se introdujo en la membrana corio-alantóica de embriones de 8 días de nacidos de la parvada exenta de RIF anteriormente identificada. Los huevos inoculados entonces se incubaron a temperatura de 32° a 34°C., durante un período de tiempo suficiente para estimular el crecimiento del virus. El virus se hizo pasar continuamente en serie a temperatura de
- 25.
- 30.



32° a 34°C., en la membrana corio-alantóica con un aumento resultante en los títulos, el virus cosechado tenía una titulación de aproximadamente  $10^{3.5}$  TCID por mililitro.

5. Durante las 11 pasadas a temperatura de 37° a 38°C., y las primeras tres pasadas a temperatura de 32° a 34°C., no fueron evidentes cambios macroscópicos significativos en la membrana corio-alantóica, infectada, pero para la décima quinta pasada, podían verse
10. áreas pequeñas de hinchamiento, de apariencia gelatinosa; para la décima octava pasada, eran evidentes lesiones inflamatorias y necróticas, en las porciones infectadas en las membranas corio-alantóicas. Estas lesiones, que se hicieron más pronunciadas con el paso
15. continuado del virus, parecieron como áreas opacas, espesados grandes, más frecuentemente en la forma de un anillo en la línea de contacto entre la membrana del cascarón y la membrana corio-alantóica; y aparecieron lesiones en forma de placas discretas más pequeñas dentro y al exterior de este anillo. Se llevaron a cabo pasadas en serie a temperatura de 32° a 34°C., hacia una décimotercera pasada, acumulativa en la membrana corio-alantóica es decir, incluyendo las once pasadas del Ejemplo I, y fué en este punto
20. en que aumentó la titulación hasta  $10^{4.5}$  TCID por mililitro. Las pasadas, paralelas a las pasadas 11 a 30, se trataron con embriones incubados a temperatura de 36° a 38°C., y en su mayor parte dieron por resultado una reducción de títulos.

30.

EJEMPLO III



UTILIZACION DEL VIRUS DE SARAMPION

VIVO ATENUADO ADICIONALMENTE

Este ejemplo demuestra la utilización del virus de sarampión vivo atenuado adicionalmente de la presente invención en los monos.

Seis monos rhesus, que anteriormente habían demostrado ser susceptibles, al sarampión, se dividieron en dos grupos de tres. El primer grupo se inoculó intramuscularmente con 0.5 centímetros cúbicos de un fluido de cultivo de tejido de embrión de pollo que se había inoculado anteriormente, con una suspensión al 20 por ciento de la membrana corio-alantóica infectada, de la décimotercera pasada del Ejemplo II. Los monos inoculados se colocaron luego junto con el segundo grupo de monos que constituyeron un grupo de control, y se observaron durante un período de 51 días.

Ambos grupos de monos permanecieron normales durante el período de 51 días, los monos inoculados no demostraron reactividad alguna al virus de sarampión vivo atenuado adicionalmente. Durante los días vigésimo quinto y quincuagésimo primero, ambos grupos se probaron para comprobar los anticuerpos del sarampión y los monos inoculados del primer grupo se encontró que habían desarrollado niveles elevados de anticuerpos de sarampión, mientras que el segundo grupo de control de monos, estaban exentos de anticuerpos de sarampión.

Puede llegarse a la conclusión razonablemente de lo que antecede que el virus durante la



- trigésima pasada en la membrana corio-alantóica estaba exento de virulencia así como era completamente inmunogénico. Por último se llegó a la conclusión de que el virus de sarampión vivo atenuado adicionalmente
5. demuestra que tiene un mayor grado de seguridad puesto que el virus no se diseminó hacia el grupo de control de monos.

EJEMPLO IV

DETERMINACION DEL TITULO

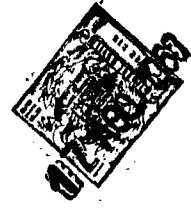
10. Este ejemplo demuestra el medio y el método que se usan para determinar los títulos del virus.
- Los títulos se determinaron utilizando cultivos de tejido de célula de riñón de mono cercopithecus, dichos cultivos se desarrollaron en tubos estacionarios en un medio que consistía de una solución de sal equilibrada de Earle, de 0.1 por ciento de lactalbúmina y 2 por ciento de suero de caballo y después
15. de 2 días se renovaron con un medio que consistía del medio 199, sin glutamina conteniendo 1 por ciento de suero de caballo. Para titular el virus ya sea en una suspensión de membrana corio-alantóica o flúido de cultivo de tejido, diluciones de 10 veces en la solución de sal equilibrada de hank y cada tubo de cultivo se inculó con 0.1 mililitros de una solución de virus.
20. Después de 4 a 5 días de incubación a temperatura de 37°C., el medio en los tubos se renovó. Durante el séptimo día se calcularon los puntos de extremo según se describe en el Diario Americano de Higiene de L. J. Reed y de H Muneck, 27, 493 (1938).
- 25.
30. Aún cuando la invención se ha descrito y se



- ha ilustrado haciendo referencia a modalidades específicas de la misma, se comprenderá que en sus aspectos más amplios la invención no está limitada a dichas modalidades y que pueden recurrirse a variaciones y sustituciones de dichos equivalentes, que queden dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.
- 5.

NOTA

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento se refiere a una solicitud de patente presentada en
- 10: Norteamérica con fecha 17 de agosto de 1965, Ser. número: 480.482, acogiéndose, por lo tanto, a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España: "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN VIRUS DE SARAMPION VIVO ATENUADO"; caracterizándose por lo siguiente:
- 15: 1ª.- Procedimiento para preparar un virus de sarampión vivo atenuado adicionalmente, caracterizado porque comprende introducir un virus de sarampión vivo atenuado que se ha adaptado para crecer en un cultivo de tejido de embrión aviario, y que produce un alto régimen de reacción febril y de erupción en los niños, hacia la membrana corio-alantóica de
- 25: los huevos aviarios en el óvulo, incubar dichos huevos
- 30:



- a una temperatura de aproximadamente 35°C., hasta aproximadamente 38°C., durante un período de tiempo suficiente para estimular el crecimiento de dicho virus, cosechar el virus producido de esta manera, introducir en la membrana corio-alantóica de los huevos aviaros en el óvulo dicho virus cosechado, incubar dichos huevos a una temperatura de aproximadamente 35°C., hasta aproximadamente 38°C., durante un período de tiempo suficiente para estimular el crecimiento de dicho virus,
5. cosechar el virus producido de esta manera, y repetir las etapas cuarta y quinta un número suficiente de veces, hasta que se establezca completamente el crecimiento del virus, cosechar el virus establecido, introducir dicho virus establecido en la membrana corio-alantóica de los huevos aviaros en el óvulo, incubar dichos huevos a una temperatura de aproximadamente 28°C., hasta aproximadamente 35°C., durante un período de tiempo suficiente para estimular el crecimiento de dicho virus, cosechar el virus producido de esta manera, introducir dicho virus establecido cosechado hacia la membrana corio-alantóica en los huevos aviaros en el óvulo, incubar dichos huevos a una temperatura de aproximadamente 28°C., hasta aproximadamente 35°C., durante un período de tiempo suficiente para estimular el crecimiento de dicho virus establecido, cosechar el virus establecido producido de esta manera, y repetir las etapas décimoprimer y décimosegunda un número de veces suficiente para producir un virus de sarampión vivo atenuado adicionalmente,
10. la antigenicidad del cual es suficiente para producir
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



una respuesta inmunogénica.

2ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque los huevos aviaros en el óvulo son huevos de pollo en el óvulo.

5. 3ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la temperatura de incubación de las etapas segunda y quinta es de aproximadamente 35°C., hasta aproximadamente 38°C., y la temperatura de incubación de las etapas novena y décimosegunda, es aproximadamente de 34°C.

10. 4ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el virus de sarampión atenuado vivo se hace pasar en serie durante un total de treinta pasadas para producir un virus de sarampión vivo atenuado adicionalmente, la antigenicidad del cual es suficiente para producir una resistencia inmunogénica.

15. 5ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el virus de sarampión atenuado vivo se hace pasar a través de un total de once veces para establecer el crecimiento del virus, y dicho virus establecido se hace pasar diecinueve veces adicionales.

20. 6ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el virus de sarampión atenuado vivo es de la cepa Edmoston, de virus de sarampión vivo.

25. 7ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la incubación de la última vez se continúa hasta que haya un crecimiento sufi-

30.



ciente de virus, para producir una concentración útil del mismo y cosechar un material de vacuna que contiene el virus de sarampión vivo atenuado adicionalmente resultante en una concentración relativamente elevada.

5. 8ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque se incorpora un estabilizador en el material de la vacuna y el producto resultante se liofiliza.

10. 9ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el virus de sarampión vivo atenuado adicionalmente cosechado, de la pasada final en la membrana corio-alantóica de los huevos aviarios en el óvulo, se inocula en un cultivo de tejido aviario, que incuba a una temperatura de aproximadamente 28°C., hasta aproximadamente 37°C., hasta que el virus se ha multiplicado para producir una concentración útil del mismo y se cosecha un material de vacuna que contiene el virus de sarampión vivo atenuado adicional resultante, en una concentración relativamente elevada.

15. 10ª.- "Procedimiento para preparar un virus de sarampión vivo atenuado"; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

Esta memoria consta de diecisiete hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 17 AGO. 1966  
AMERICAN CYANAMID COMPANY.-

J. GÓMEZ ACEBO Y MODEI  
p. p. Firmados: A. GARCIA BRAVO

