



342343

A61K 00/00

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERK & CO., INC.

Residencia: RAHWAY, New Jersey - EE.UU.

Enunciado: "UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE
UNA VACUNA CONTRA LA RUBEOIA"

R/G.

342343

-7 JUL



1 Este invento se refiere a vacunas y particularmente a
un virus de rubeola vivo y atenuado que se inocular en el
hombre para protegerlo contra la rubeola, conocida común-
mente en Estados Unidos por sarampión alemán. El invento
5 también incluye la puesta a punto de la variedad atenuada
de virus.

Debido a la naturaleza atenuada del virus, produce
solamente una reacción febril y otras reacciones clínicas
extremadamente suaves. No obstante, provoca un alto nivel
10 de anticuerpos contra el virus en el hombre y en los ani-
males y este anticuerpo es esencial para la protección
contra la infección por el virus y contra la enfermedad.

La rubeola es generalmente una enfermedad leve de los
niños, aunque pueden producirse complicaciones como encef-
15 falitis, artritis y neuritis. Las lesiones mentales perma-
nentes son menos frecuentes que en el caso del sarampión
ordinario.

El aspecto grave de la enfermedad es su retraso hasta
la edad adulta, con infección de mujeres en el primer tri-
20 mestre de embarazo. El virus infecta al feto y el resulta-
do es un desarrollo defectuoso del embrión que produce mi-
crocefalia, defectos visuales, malformaciones cardíacas,
anormalidades dentales y sordomudez.

Tan real es el peligro de la rubeola para el feto du-
25 rante los 2 ó 3 primeros meses de gestación que se ha su-



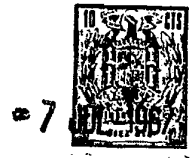
1 gerido que las niñas sean expuestas a la enfermedad para
 que la padezcan antes de alcanzar la edad reproductora.
 La vacuna del virus atenuada del presente invento hace po
 sible la inmunización sobre una base conocida.

5 En términos generales, el invento se refiere a la
 adaptación y propagación del virus de rubeola en cultivos
 de tejidos preparados a partir de huevos de pato con em-
 brión. Más particularmente, este invento está dirigido al
 desarrollo de una vacuna de virus de rubeola vivos y ate-
 10 nuados siguiendo una serie de pases en un cultivo de teji-
 do de embrión de pato. Este procedimiento comprende las si-
 guientes etapas: A, aislamiento del virus virulento en
 cualquiera de diversas células en cultivo y su adaptación
 al cultivo de células de embrión de pato; B, desarrollo
 15 del virus vivo atenuado mediante una pluralidad de pases
 en serie en tejido de embrión de pato; y C, preparación de
 la vacuna a partir de este virus vivo atenuado. Estas eta-
 pas se explicarán por separado.

A. Aislamiento y adaptación del virus virulento

20 El aislamiento y la adaptación del virus de rubeola
 puede llevarse a cabo en un cultivo de tejido de embrión
 de pato utilizando material clínico (por ejemplo un hiso-
 po de garganta) o un virus previamente propagado en otro
 tipo de cultivo de células, tal como riñón de mono o hue-
 25 vos con embrión. La incubación de los cultivos infectados

342343



1 puede llevarse a cabo a cualquier temperatura comprendida
entre 30°C y 38°C, preferiblemente a 30-34°C (óptima 32°C)
o a 35-38°C (óptima 36°C). A continuación se describen
los procedimientos de aislamiento representativos:

5 Procedimiento 1. El virus de rubeola se aísla en un
cultivo de tejido de embrión de pato a partir de material
clínico, por ejemplo de hisopos de la garganta de perso-
nas que padecen la rubeola.

10 Procedimiento 2. El virus de rubeola procedente de
material clínico se aísla en un cultivo de tejido de ri-
ñón de mono verde.

B. Desarrollo de la vacuna de virus de rubeola vivos
y atenuados

15 El virus establecido en A como causante de la rubeo-
la se añade a unos frascos de vidrio que contienen un cul-
tivo de tejido de embrión de pato preparado a partir de
embriones de pato de 10 días aproximadamente, desmenuza-
dos y tripsinizados. El medio de cultivo puede ser cual-
quiera de los que mantienen el desarrollo de las células
20 y puede ser por ejemplo el conocido medio 199 al que se
ha añadido suero de ternera. Después de la adición del
virus, los cultivos de células infectados se incuban en
pases sucesivos a 30-38°C y preferiblemente a 30-34°C
(óptimo 32°C) o 35-38°C (óptimo 36°C). Durante estos pa-
25 ses el virus se reproduce en gran cantidad y se atenúa.



1967

1 La serie anterior de pases se realizó utilizando un
inoculum diluido o sin diluir y se recogieron múltiples
cosechas a diversos intervalos. Las valoraciones se rea-
lizaron en cultivos de tejido de riñón de mono verde.

5 A intervalos apropiados se inocularon los cultivos con
1000 TDID₅₀ aproximadamente de un virus que presentaba
propiedades de interferencia (ECHO-11, Bunyamwera, etc.).
Los cultivos en tubo en los que al cabo de 3 ó 4 días de
la inoculación se observó la ausencia de la citopatología
10 de los virus interferentes se consideraron infectados con
el virus de rubeola.

A continuación el virus se recoge y se conserva con-
gelado o a otra temperatura baja para conservar la infec-
tividad del agente.

15 C. El virus de rubeola recogido después de esta se-
rie de pases repetidos resultó no ser patógeno para los
monos y los roedores, causaba solamente una enfermedad muy
leve en los receptores humanos y provocaba un nivel satis-
factorio de anticuerpo neutralizador. La infectividad del
20 virus se estabiliza mediante un estabilizador adecuado co-
mo sacarosa, albúmina humana, glutamina, fosfato o mezclas
de los mismos. Después de valoración para establecer su
potencia, la masa de virus se subdivide y se introduce en
ampollas para su empleo. El producto puede ser conservado
25 o distribuido congelado o preferiblemente se seca a par-

- 5 - 342343



1 tir del estado de congelación y se mantiene exento de hu
medad.

A continuación se dan algunos ejemplos ilustrativos.

EJEMPLO 1

5 El inoculum inicial es el obtenido por el Procedi-
miento 1 descrito anteriormente.

Después de separar la cabeza y las extremidades de
unos embriones de pato de 9 a 11 días de edad, se desmenu-
zan finamente en condiciones asépticas y el tejido desme-
nuzado se lava varias veces con líquido BSS de Hanks. El
10 tejido lavado se tripsiniza a 36°C utilizando tripsina al
0,25 % (Difco 1:250) en tampón tri-salino, durante 2 ó 3
horas. La suspensión de células y tripsina se recoge a
través de dos espesores de gasa estéril y se centrifuga
15 a 1500 rpm durante 5 minutos. Las células agrupadas se
vuelven a suspender en un medio de cultivo para su con-
taje. El medio de cultivo está constituido por medio 199
(Morgan, J.F. Morton, H.J. y Parker, R.C., Proc. Soc.
Exp. Biol. and Med., 73: 1-8, 1950) que contiene 2 % de
20 suero de ternera agamma (calentado a 56°C durante 30 mi-
nutos) y 50 mcg/ml de neomicina. Los cultivos de los fras-
cos se siembran a una concentración de 350.000 células
viables por mililitro. Después de un periodo de incuba-
ción de 36 á 48 horas a 36°C, el cultivo del frasco pue-
de ser utilizado para los pases en serie o para la prepa-
25

342343



1967

1 ración de la vacuna.

Los cultivos de tejido de embrión de pato se preparan en frascos de vidrio, utilizando medio 199 que contiene 2 % de suero de ternera inactivado como medio de cultivo. Tres o cuatro días después de la siembra, el medio de cultivo se saca asépticamente y los cultivos de los frascos se lavan cuatro veces con BSS de Hanks, a razón de 100 ml por lavado y se inoculan con 2,5 ml del virus de rubeola de siembra no diluido, antes mencionado, por frasco. Se añade a cada cultivo en frasco 60 ml de medio 199 que contiene 10 % de un estabilizador de la infectividad viral adecuado y los frascos se incuban a 30-34°C. En el medio de cultivo y mantenimiento se incorpora neomicina a una concentración de 50 mcg/ml. Se recogen múltiples cosechas a intervalos de 2-4 días y los cultivos de los frascos se alimentan de nuevo con medio de mantenimiento fresco que contiene el estabilizador antes mencionado. Se llevan a cabo diez pases sucesivos, todos ellos a una temperatura de 32°C aproximadamente. Las determinaciones de la infectividad de cada cosecha se realizan en cultivos de tejido de riñón de mono verde. Cada cosecha se recoge asépticamente en un recipiente estéril, se toman muestras para determinar la esterilidad microbiana y el resto se congela en ampollas en un baño de alcohol y hielo seco. Los fluidos conteniendo el virus se conservan a -70°C en

- 7 - 342343



1957

1 una unidad de congelación eléctrica, antes de seleccionar
la cosecha o cosechas para la preparación de la vacuna.
La cosecha o cosechas apropiadas se seleccionan después
de terminar las valoraciones de la infectividad. El mate-
5 rial seleccionado se saca del congelador y se funde. Se
toma una muestra para control y ensayo de seguridad. El
fluido restante se clarifica y se toma otra muestra para
determinar la seguridad en monos. Al fluido restante se
añade un estabilizador adicional apropiado. Los fluidos
10 se distribuyen en viales individuales y se secan. Des-
pués del proceso de secado, se tapan los viales y se se-
llan, conservándolos para la reconstitución en forma de
vacuna mediante la adición de agua estéril.

La potencia del producto se basa en la demostración
15 del poder infectivo en cultivos de células. Adicionalmen-
te, una vacuna atenuada inoculada parenteralmente en mo-
nos de forma regular induce un alto nivel de anticuerpo
neutralizador específico que permanece constante durante
1 año por lo menos.

20 Pruebas en el hombre. A 7 niños que no habían pade-
cido previamente la infección de la rubeola se administró
una dosis de la vacuna de virus atenuado de rubeola por
vía parenteral. Todos ellos desarrollaron un alto nivel
de anticuerpo neutralizador (1:16 - 1:64) dentro del mes
25 siguiente a la vacunación. La concentración de este anti-



1 cuerpo es aproximadamente igual a la alcanzada después de
la enfermedad natural. Los niños experimentaron una fie-
bre muy ligera, a veces ninguna, un picor muy suave y tran-
sitorio y una linfadenopatía clínicamente insignificante.

5

EJEMPLO 2

Se repite el procedimiento del Ejemplo 1 pero incu-
bando el virus de rubeola a 35-38°C, cerca de 36°C.

EJEMPLO 3

10 Se repite el procedimiento del Ejemplo 2 pero rea-
lizando tres incubaciones en serie del virus a 36°C y
después siete a 32°C.

15 Para atenuar todavía más el virus pueden realizarse
más de diez pases sucesivos del virus en el cultivo de te-
jido de embrión de pato. También la serie de pases puede
incluir la incubación en cultivos de riñón de mono verde
o en huevos de gallina con embrión. Este procedimiento es
ilustrado en los siguientes ejemplos en los que:

GMK representa un cultivo de riñón de mono verde.

EAM representa huevos de gallina con embrión.

20 DEF representa cultivo de tejido de embrión de pato.

EJEMPLO 4

2 GMK + 1 EAM + 9 GMK + 5 DEF (36°C) + 5 DEF (32°C)

EJEMPLO 5

25 2 GMK + 1 EAM + 13 GMK + 2 DEF (36°C) + 8 DEF (32°C)

342343



1

EJEMPLO 6

2 GMK + 1 EAM + 17 GMK + 10 DEF (32°0)

EJEMPLO 7

21 GMK + 3 DEF (36°0) + 7 DEF (32°0)

5

EJEMPLO 8

Un virus de rubeola adaptado al cultivo de tejido de embrión de pato se pasó por tres diluciones terminales seguidas de nuevos pasos por dicho cultivo de tejido para producir una reserva de vacuna.

10

El invento ha sido descrito haciendo particular referencia a diez pases en serie por DEF para asegurar la atenuación del virus, pero debe entenderse que puede ser suficiente un número menor. Por lo tanto, el invento considera una incubación única en DEF para conseguir el objetivo de un virus que provoque una respuesta de anticuerpo de la rubeola en individuos humanos con reducción de los síntomas, de otro modo graves, de la enfermedad. Es de esperar que los pases sucesivos después del primer cultivo en DEF produzcan una mayor atenuación.

15

20

En resumen, la Patente de Invención que se solicita, recaerá sobre las siguientes:

25

342343



1

REIVINDICACIONES

5

1. Un procedimiento de preparación de una vacuna contra la rubeola que provoque en el hombre una respuesta de anticuerpos contra el virus sin producir las severas manifestaciones clínicas de la enfermedad, cuyo procedimiento comprende de los pasos de

10

(1) aislar el virus de rubeola de material clínico mediante inoculación de cultivo de tejido de embrión de pato o de cultivo de tejido de mono verde e incubación de dicho cultivo a 30-38°; y

15

(2) pasar dicho virus sucesivamente por medios de cultivo un número de veces suficiente para atenuar el virus,

(a) siendo al menos diez de estos pases en medios que comprenden cultivo de embrión de pato de nueve a once días de edad, decapitados y amputados y desmenuzados y tripsinizados, en un medio de desarrollo de células a 30-38°,

20

(b) siendo seguido cada uno de estos pases por valoraciones de la infectividad en cosechas de muestra efectuadas en intervalos de 2 a 14 días, congelándose dichas cosechas hasta su examinación y reinoculándolas en medio de cultivo sin son demasiado virulentas.

25

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el embrión de pato tiene 10 días de edad.

342343



1 3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el
que la incubación se lleva a cabo a 35-38º.

 4. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que
la incubación se lleva a cabo a 30-34º.

5 5. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha
de recaer la patente de invención que se solicita: " UN PROCE-
DIMIENTO DE PREPARACION DE UNA VACUNA CONTRA LA RUBEOLA".

 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la pre-
sente Memoria descriptiva que consta de doce páginas mecano-
10 grafiadas.

Madrid, 26 de junio 1.967

BERNARDO UNGRIA

P.P.

15

342343