

A 97359 Case P.c. 4928
LH(LDG)



342709

Memoria descriptiva

C12 K 00/00

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de CHAS. PFIZER & CO., INC.

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en 235 East 42nd Street, Nueva York, N.Y.,
Estados Unidos de America

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA VACUNA DESACTI
VADA DE COLERA PORCINO" (Clase Internacional C12k).



Esta invención se refiere a la preparación de un producto contra el cólera del cerdo. Más particularmente, se refiere a un procedimiento para preparar una vacuna desactivada del cólera porcino y su empleo para la inmunización de cerdos contra el cólera porcino.

El cólera porcino, conocido también como fiebre del cerdo, es una enfermedad grave, muy contagiosa, del cerdo causada por un virus filtrable. Usualmente sigue un curso grave con un 90 a 100% de mortalidad y puede hacerse crónica. El uso de un antisuero del cólera porcino fué el primer método utilizado para proteger a los cerdos contra esta enfermedad. Este fué seguido por otro método que consistía en una vacunación simultánea con suero y virus activo. Como el primer método sólo proporcionaba protección a corto plazo y el segundo no podía inmunizar adecuadamente a los animales en estado deficiente de salud, fué desarrollado el método de usar vacunas muertas o desactivadas. Ejemplos de éste último tipo son la vacuna de violeta de metilo, en la que el virus es matado empleando violeta de metilo y calor, y la vacuna Boynton, en la que el virus se mata por medio de eucaliptol y calor.

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una vacuna desactivada perfeccionada del cólera porcino, en el que se incorporan dos recientes innovaciones de procedimiento. La primera se refiere a la operación de cultivo o desarrollo, y la segunda a la operación de desactivación. Con respecto a la primera, el procedimiento general para obtener "sangre infectada con cólera porcino" o, más apropiadamente, virus activo de cólera porcino, consiste en cultivar tejidos del cerdo que



han sido inoculados con virus vivo de cólera porcino. Dichos tejidos se limitaban generalmente a la sangre y al bazo. Además, la operación de cultivo se hacía enteramente in vivo.

5 La primera innovación de la invención que se expone en la presente Memoria hace posible una operación de cultivo que conduce a un virus de alta concentración que está desprovisto de microorganismos contaminantes, es de potencia medible y de potencia ajustable. La razón por
10 la que permite conseguir un producto más predecible reside en el hecho de que la operación de desarrollo o cultivo se lleva a cabo in vitro en cultivos de varios tejidos del cerdo. Es particularmente efectivo el tejido de los testículos del cerdo. Con este procedimiento de desarrollo del
15 virus, es posible propagar y valorar virus en condiciones definidas, asegurando así la masa antigénica adecuada y específica requerida para preparar una vacuna contra el cólera porcino pura y potente. Esto contrasta con la producción de virus in vivo, en la que no se controla fácilmente la cantidad y calidad del virus obtenido con fines de
20 preparar una vacuna.

 La segunda innovación, de naturaleza secundaria, se refiere a la operación de desactivación. Aunque de importancia equivalente en comparación con la nueva operación de cultivo descrita anteriormente, es secundaria porque su valor se deriva de la operación primaria de cultivo. Es decir, la operación de desactivación es, aunque independiente, una consecuencia de la operación de cultivo. En
25 relación con el procedimiento de desactivación, se ha comprobado que son efectivos varios agentes desactivadores,
30

5.9.67



que incluyen el azul de toluidina con irradiación, la hidroxilamina y el óxido de etileno. El que es más particularmente preferido para desactivar virus es el azul de toluidina, del que se ha comprobado que es notablemente efectivo. Aunque se sabe que algunos virus son fotosensibles, ésto constituyó un nuevo descubrimiento con respecto al virus del cólera porcino cuando fué utilizado azul de toluidina. Este descubrimiento está en contraposición directa con el efecto del violeta de metilo sobre este virus. En los estudios de la firma solicitante, el violeta de metilo ha mostrado ser totalmente ineficaz para desactivar este virus. Así, la vacuna desactivada preparada por el método del violeta de metilo era desactivada en realidad por el procedimiento de almacenamiento al calor, más bien que por un producto químico desactivador específico. Al contrario que el violeta de metilo, el azul de toluidina desactiva rápidamente los virus de cólera porcino sin calor. Además, el empleo de azul de toluidina es nuevo porque el colorante se combina específicamente con el componente infeccioso del virus (el ácido nucleico) haciéndolo no infeccioso. Esto se consigue sin alteración de la capa exterior antigénica proteínica del virus. Teóricamente, este permite que el antígeno del virus desactivado estimule anticuerpos que son idénticos a los anticuerpos estimulados por el virus natural, dando así una protección más perfecta.

Cuando se utiliza azul de toluidina, el procedimiento de desactivación se completa con una operación de irradiación. La operación de irradiación consiste en líneas generales en hacer pasar el flúido del virus a través



de un tubo de vidrio de 76'2 cm. de largo y 1'3 cm. de diámetro, a una velocidad de un litro por minuto, mientras es irradiado simultáneamente por cuatro lámparas de alta intensidad, de 400 vatios, colocadas uniformemente a lo
5 largo del tubo a una altura de 35'6 cm. Naturalmente, sirve cualquier dispositivo de irradiación, y el método anterior es solamente una indicación de un procedimiento experimental satisfactorio.

Es posible, aunque menos preferido, utilizar
10 otros agentes desactivadores, por ejemplo hidroxilamina u óxido de etileno. Cuando se utiliza hidroxilamina, el virus del cólera porcino se combina con una cantidad de hidroxilamina suficiente para dar una concentración final de 0'5 M con respecto a dicho virus. Con respecto al óxido
15 de etileno, se prefiere una concentración final de virus de 1%.

Hasta hace poco tiempo, el medio más deseable de vacunar cerdos para protegerlos contra el cólera era la administración de virus vivo atenuado. No obstante, existe
20 actualmente una intensa creencia de que es preferible una vacuna desactivada o muerta, dados los recientes descubrimientos de que las vacunas vivas atenuadas pueden volver de nuevo con el tiempo a sus formas virulentas. Por tanto, con la patente necesidad de una vacuna desactivada
25 efectiva, la presente invención describe un producto que es tan efectivo como cualquier vacuna desactivada anterior.

Por consiguiente, la presente invención expone un procedimiento para preparar una vacuna desactivada contra el cólera porcino, que comprende desarrollar un virus
30

5.9.67

- 5 - 342709



de vacuna infectando un cultivo de tejido de cerdo de una sola capa con virus activo de cólera porcino, a un pH de aproximadamente 7'2 a aproximadamente 7'6 hasta que ha tenido lugar una repetición sustancial del virus, enfriar dicho virus de vacuna resultante hasta el estado de congelación, y después calentar dicho virus de vacuna y recuperar el virus virulento o activo; desactivar dicho virus activo; y recoger o recolectar el producto de vacuna desactivado.

10 La realización preferida del procedimiento anterior consta de las siguientes condiciones:

a) El empleo de tejido de los testículos del cerdo.

15 b) Una operación de desactivación que consiste en combinar el virus activo con azul de toluidina acuoso, en la que dicho azul de toluidina es añadido en una cantidad que da una concentración final de 2 microgramos de azul de toluidina por ml. de virus, y una irradiación subsiguiente.

20 c) Una operación de recogida o cosecha, que consiste en precipitar la vacuna a partir de una mezcla que comprende virus desactivado y óxido de aluminio hidratado, y subsiguientemente reconstruir el precipitado en disolución de cloruro de sodio tamponada con fosfato.

25 El producto de vacuna desactivada obtenido por el procedimiento de la presente invención se administra a los cerdos o puercos por vía parenteral, es decir, o bien intramuscularmente o subcutáneamente. Los valores de dosificación pueden variar entre aproximadamente 1 y 8 ml. de producto de vacuna; sin embargo, se prefiere adminis-

30



5 trar una segunda dosis para conferir inmunidad a largo
plazo. Cuando la vacuna, preparada por el procedimiento
expuesto en la Memoria, se administra subcutáneamente a
los cerdos, se confiere inmunidad a dichos cerdos, de modo
que son capaces de resistir el ataque de virus de cólera
porcino activos.

10 Los ejemplos siguientes se dan como ilustración, y
no han de ser considerados como limitativos de la inven-
ción, cuyo alcance es definido por las reivindicaciones ane-
xas.

EJEMPLO I

A. Operación de cultivo: De cerdos sanos de edad
comprendida entre las 4 y 16 semanas o más, se quitan los
testículos, y son desmenuzados asépticamente, y tratados
15 con tripsina para reducir la masa del tejido a una suspen-
sión de células. Las células se ponen después en suspen-
sión de nuevo a una concentración de 300.000 a 800.000 cé-
lulas por ml. en un medio nutriente que contiene 10% de
suero bovino u otro suero adecuado. Después de un período
20 de desarrollo de 48 horas a 37°C, el medio de desarrollo
es decantado, y las células son infectadas con virus acti-
vo de cólera porcino. Los cultivos son incubados después
a 37°C durante cuatro o cinco días (el pH de 7.2 es cons-
tante a lo largo de todo el experimento). Después de este
25 período, los cultivos de tejidos son congelados a -20°C.
Al día siguiente, después de descongelados, se recuperan
los flúidos del virus reuniéndolos a través de un filtro
de nylon para separar los restos del tejido.



B. Operación de desactivación: El virus activo anterior es combinado con azul de toluidina acuoso en la proporción de 1 ml. de azul de toluidina por cada 99 ml. de virus, lo que da como resultado una concentración final de 2 microgramos de azul de toluidina por ml. de virus. La operación de desactivación se completa haciendo pasar el fluido del virus a través de un tubo de vidrio de 76'2 cm. de largo y 1'3 cm. de diámetro a la velocidad de un litro por minuto, irradiando simultáneamente con 4 lámparas de alta intensidad, de 400 vatios, distribuídas uniformemente a lo largo del tubo a una altura de 35'6 cm.

C. Recogida(cosecha): El virus desactivado obtenido anteriormente es adsorbido sobre óxido de aluminio hidratado combinando el fluido de virus desactivado con dicha sustancia auxiliar de óxido de aluminio en proporción que da una concentración final de 12 mg. de óxido de aluminio hidratado por ml. de virus líquido. El precipitado es recogido después, y reconstruído en disolución de cloruro sódico tamponada con fosfato, hasta 1/2 del volumen original de virus.

EJEMPLO II

Se repite el procedimiento del Ejemplo I, utilizando los siguientes cultivos de tejido de cerdo en lugar del cultivo de tejido de los testículos de cerdo, con resultados comparables:

tejido renal del cerdo

tejido de ovarios de cerdo



EJEMPLO III

Un grupo de 14 cerdos, cada uno de los cuales pesaba entre 27 y 45 kg. son vacunados por vía subcutánea con una dosis de 3 ml. de vacuna desactivada de cólera porcino, preparada por el procedimiento del Ejemplo I.

5 Después de 21 días (después de la vacunación) los animales son inoculados, por administración parenteral, con 2 ml. de virus activo de cólera porcino. Después se observa cualquier síntoma de cólera porcino en los animales durante un período de 14 días después de la inoculación.

10 Ninguno de los 14 animales ensayados mostró ningún síntoma de cólera porcino, y todos sobrevivieron. Por el contrario, de 14 animales de control que sólo recibieron el virus de inoculación activo, murieron todos con síntomas de cólera porcino en el período de 14 días.

15

N O T A

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan a continuación para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

- 20 1.- Un procedimiento para preparar una vacuna desactivada de cólera porcino, caracterizado por desarro-

6.9.67

- 9 - 342709



5 llar un virus de vacuna infectando un cultivo de tejido de cerdo de una sóla capa con virus activo de cólera porcino, a un pH de aproximadamente 7'2 a aproximadamente 7'6, hasta que ha tenido lugar una repetición sustancial del virus, enfriar dicho virus de vacuna resultante hasta el estado de congelación, y después calentar dicho virus de vacuna y recuperar el virus activo; desactivar dicho virus activo; y recoger el producto de vacuna desactivado.

10 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que dicho cultivo de tejido de cerdo es un cultivo de tejido de testículos de cerdo.

15 3.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que la operación de desactivación consiste en mezclar dicho virus activo con azul de toluidina acuoso, añadiéndose dicho azul de toluidina en una proporción que da una concentración final de 2 microgramos de azul de toluidina por ml. de virus, e irradiar la mezcla resultante.

20 4.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado por el hecho de que dicha recogida o cosecha de producto de vacuna desactivado consiste en precipitar la vacuna a partir de una mezcla que comprende virus desactivado y óxido de aluminio hidratado, y subsiguientemente reconstruir el precipitado en disolución de cloruro de sodio tamponada con fosfato.

25 5.- Un procedimiento para preparar una vacuna desactivada de cólera porcino.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.



Esta Memoria consta de once hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

P.A.

Alberic de Elizaberry
Por Poder.

342709

6.9.67
AGV.