

345972

P.- 36.426

GT/MD-B/4235 Huygelen,  
Peetermans Clase 3-Espagne



345972

**Memoria descriptiva**

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

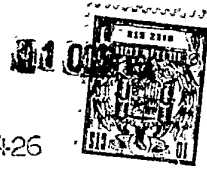
a nombre de RECHERCHE ET INDUSTRIE THÉRAPEUTIQUES R.I.T.

~~xantidad y de nacionalidad~~ sociedad anónima belga

con domicilio en 13, rue du Tilleul, Genval, Bélgica

por: " UN METODO PARA ATENUAR LA VIRULENCIA DE VIRUS DE  
RUBEOLA SIN PERDIDA DE ANTIGENICIDAD" (Clase Inter  
nacional C12k)

4.10.67



Esta invención se refiere a una vacuna de virus de rubéola vivo atenuado, capaz de inducir una inmuni-dad activa contra la rubéola, y a un procedimiento para producir esta vacuna.

5                   La expresión "virus vivo atenuado" empleada en esta Memoria descriptiva se refiere a una cepa de virus de rubéola (VR), cuya virulencia ha sido atenuada por al menos 15 pasos en serie o sucesivos sobre cultivos primarios de tejido de riñones de conejo.

10                   Según el procedimiento explicado más adelante en esta Memoria descriptiva, se obtiene un virus modificado y con ello una vacuna que presenta una elevada antigenicidad y que, al mismo tiempo, no produce ninguna reacción indeseable apreciable al ser inoculada a niños.

15                   La presencia de reacciones no deseables y, entre ellas y más particularmente, la posible diseminación del virus por los individuos vacunados, es uno de los problemas principales en el desarrollo de una vacuna de tipo vivo de rubéola.

20                   Es sabido que, además de las complicaciones tales como la encefalitis y la púrpura trombocitopénica, que son egraves pero muy raras, y también la artritis, que no es infrecuente pero sí es, generalmente, auto-limitada y de corta duración, la complicación más dramática de esta enfermedad es de naturaleza teratógena. La rubéola es, sin duda, un problema grave para las mujeres en el primer trimestre de embarazo, por su influencia en las malformaciones congénitas del feto, en los niños nacidos muertos o en los abortos.

30  
4.10.67.

A este respecto, es esencial que un niño que



recibe una vacuna de rubéola de tipo vivo no constituya un peligro potencial para ninguna mujer embarazada con la que pueda ponerse en contacto.

5                   Hasta ahora, el único medio de prevención posible contra estas complicaciones fetales de la rubéola era, o bien la administración de gamma globulina en grandes dosis a la mujer embarazada expuesta, o bien la exposición de mujeres jóvenes (adolescentes) a la rubéola antes de alcanzar la edad de tener hijos.

10                   La administración de gamma globulina está lejos de ser considerada por todos los especialistas como un tratamiento efectivo, y, por razones evidentes, la exposición a la enfermedad a una edad más joven no es una solución aceptable al problema.

15                   Se ha comprobado ahora, sorprendentemente, que los pasos en serie de virus de rubéola en cultivos primarios de tejido de riñones de conejo (RC) no sólo implica la atenuación de la virulencia, sino que también proporciona un método de preparar una vacuna de virus vivo de  
20 rubéola atenuado que no presenta ninguna reacción no deseable apreciable.

25                   La expresión "ninguna reacción indeseable apreciable" citada anteriormente quiere decir, no sólo que la inoculación de la vacuna según esta invención estimula la inmunidad sin provocar los síntomas patológicos usuales de la rubéola corriente, sino también que en los ensayos clínicos llevados a cabo con una vacuna según esta invención, no ha sido detectado, en contactos íntimos de individuos susceptibles, ninguna señal serológica ni virológica de infección.

30

4.10.67.

345972



Así pues, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para atenuar la virulencia de virus de rubéola sin pérdida de antigenicidad, consistiendo dicho método en hacer pasar sucesivamente una cepa de virus de rubéola al menos 15 veces sobre cultivos primarios de tejidos de riñón de conejo.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar (1) un virus vivo atenuado de rubéola obtenido por dicho método de atenuación, y (2) una vacuna activa contra la rubéola, que comprende como ingrediente activo virus de rubéola atenuado obtenido por dicho método de atenuación.

En otras palabras, la presente invención proporciona un método para preparar una vacuna activa contra la rubéola, consistiendo dicho método en hacer pasar sucesivamente una cepa de virus de rubéola al menos 15 veces sobre cultivos primarios de tejido renal de conejo y utilizar el virus atenuado de rubéola cultivado como ingrediente activo para una vacuna contra la rubéola, según cualquier sistema conocido por la técnica para la formulación de una vacuna.

Según esta invención, el virus de rubéola sufre un número suficiente de pasos sobre cultivos primarios de tejido renal de conejo hasta que se consigue su atenuación. Se ha comprobado que la atenuación requiere al menos 15 pasos, y preferiblemente desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 60 pasos, realizándose dichos pasos a una temperatura que no excede de 36°C.

Según una realización preferida de esta invención, la duración de cada paso está comprendida entre 3 y

4.10.67.



6 días.

Después se prepara una vacuna a partir de un paso apropiado en células primarias de RC, empleando cualquier método conocido por la técnica para esta preparación.

5

El virus de rubéola empleado para llevar a cabo esta invención es aislado de un caso clínico típico, utilizando por ejemplo escobillas o cepillos de garganta, o muestras de orina o de gargarismos. Las muestras son, o bien congeladas inmediatamente y mantenidas a -60°C hasta que son usadas, o bien inoculadas inmediatamente en un sistema de cultivo de tejidos adecuado, por ej. monocapas primarias de riñón de mono verde africano (RMV), o cualquier otro sistema de cultivo de tejidos conocido por la técnica para este aislamiento.

10

15

La presencia del virus de rubéola se comprueba refrendando cultivos con, por ejemplo, un enterovirus tal como el Echovirus 11 o el Coxsackievirus A 9 al 9º ó 10º día después de la inoculación.

20

Utilizando un antisuero específico preparado en conejos contra una cepa de VR conocida, es posible identificar virus de rubéola por ensayo de neutralización específico en células susceptibles, tales como las células de RMV. La ausencia de virus extraños de mono se comprueba en las células de RMV después de la neutralización por medio de antisuero de VR específico preparado en otro sistema celular.

25

Los cultivos primarios de células renales de conejo para los pasos sucesivos se preparan preferiblemente a partir de riñones de animales no mayores de 3 semanas.

30

4.10.67.

345972



Un medio de desarrollo preferido para los cultivos primarios de RC es el medio salino equilibrado de Hanks, suplementado con suero inactivado de ternero, hidrolizado de lactoalbúmina y caldo de fosfato de triptosa, pero también pueden emplearse otros medios conocidos por los expertos en la técnica. La temperatura de incubación es no mayor de 36°C. Los pasos sucesivos se llevan a cabo inoculando monocapas de RC con partes alícuotas del fluido que sobrenada procedente del paso anterior, y recolectando preferiblemente el virus entre el 3º y 6º día después de la inoculación. La valoración del virus recolectado puede llevarse a cabo utilizando el método de interferencia en tubos de cultivo de RMV, utilizando por ejemplo Echovirus 11 ó Cocksackievirus A 9, como se ha indicado anteriormente, para la operación de aislamiento.

Al cabo de un cierto número de pasos, no antes del 15º y preferiblemente entre aproximadamente el paso nº 20 y aproximadamente el nº 60, el fluido que sobrenada de los cultivos inculados se desecha el 6º día después de la inoculación, y las monocapas son lavadas con una disolución salina tamponada, por ejemplo disolución de Eagle o disolución de Hanks, y después son incubadas con un medio de mantenimiento, por ej. medio de Hanks suplementado con hidrolizado de caseína. Después de una posterior incubación durante 3 días, el fluido que sobrenada es recogido y clarificado por filtración o centrifugación.

Alternativamente, la recogida del virus se lleva a cabo después de congelar, descongelar y agitar el cultivo en el medio de mantenimiento y de centrifugarlo o filtrarlo subsiguientemente.

30  
4.10.67.

345972



El virus de rubéola (VR) recolectado, suplementado o no con un aditivo estabilizante, puede ser almacenado, bien en estado congelado, por ejemplo a aproximadamente  $-60^{\circ}\text{C}$ , o en estado de secado por congelación. La  
5 vacuna obtenida es administrada por vía subcutánea o intramuscular, después de su reconstitución si es necesario.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención; no han de ser considerados como limitativos del objeto de la misma.

10

#### Ejemplo 1

Un conejo de 3 semanas de edad, procedente de una colonia de crías, es examinado para asegurarse de la ausencia de lesiones patológicas, y es sacrificado. Se se  
15 paran asépticamente ambos riñones y se cortan en pequeños trozos, que se ponen en contacto con una disolución salina tamponada de tripsina (2,5 g/l), y la mezcla es agitada continuamente durante 10 minutos a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . El líquido se separa después por decantación y se  
20 sustituye por un volumen igual de disolución reciente de tripsina. Se continúa después la tripsinización, agitando mientras tanto, hasta agotamiento del tejido, separándose de vez en cuando las células en suspensión en el líquido, y después se centrifuga.

El sedimento celular obtenido se pone de nuevo  
25 en suspensión en disolución de Hanks y se centrifuga otra vez. Esta última operación se repite dos veces, y el sedimento de células final se pone en suspensión en un medio de desarrollo que consta de medio salino de Hanks equilibrado con 10% de suero de ternero inactivado, 0,5% de hidrolizado de lactoalbúmina y 0,1% de caldo de fosfato de tripto  
30

4.10.67.



sa, de forma que se asegure una concentración de aproximadamente  $10^5$  células por ml.

Partes alícuotas (1 ml.) de la suspensión de células obtenida, cada una de las cuales contiene aproximadamente  $10^5$  células, se vierten en 10 tubos de cultivo (12 mm. de diámetro) que son incubados a  $37^{\circ}$  durante 4 días, en una posición ligeramente inclinada. Después de este período de incubación aparece una monocapa completa. El medio nutricio es sustituido después por un volumen igual de medio nuevo, justamente antes de la inoculación del virus.

Antes y después de la inoculación del virus se utiliza el mismo medio nutricio, y todos los cultivos primarios de células de RC indicados en este ejemplo se preparan según la técnica que se acaba de explicar.

Partes alícuotas (0,1 ml.) de una cepa de virus de rubéola aislado en cultivos primarios de RMV y hecho pasar tres veces en este sistema para su posterior caracterización, son inoculadas en tubos de cultivo primarios de RC, que son incubados a  $34^{\circ}$  en una posición inclinada.

El sexto día después de la inoculación es recogido el líquido que sobrenada, y el virus recolectado es identificado y valorado empleando el método de interferencia descrito anteriormente.

La concentración en células de RMV después de este primer paso sobre células de RC es de  $10^{2,85}$   $\text{InD}_{50}$  por ml.

Partes alícuotas del líquido que sobrenada agrupado procedente del primer paso son inoculadas en otros tu

30  
4.10.67.



bos de cultivo primario de RC, que son incubados a 34°C.

El sexto día después de la inoculación es recogido el flúido que sobrenada. El virus es valorado como se ha indicado al final del primer paso. Este procedimiento es repetido hasta el paso 20º, variando el período de incubación de cada paso individual entre 3 y 5 días.

Desde el 9º paso en adelante, se observa un efecto citópático en las células primarias de RC.

Para el 21º paso en células de RC, se preparan cultivos primarios de células de RC en frascos de Roux de 500 centímetros cúbicos, utilizando la técnica explicada anteriormente.

Después de un período de incubación de 3 días a 36°C se obtiene una monocapa completa. Después, el flúido que sobrenada es desechado y sustituido por un volumen igual del mismo medio de desarrollo, y es inoculado con partes alícuotas del material vírico procedente del paso nº 20.

Después de una incubación adicional durante 6 días a 34°C, se desecha el flúido que sobrenada y se sustituye por un volumen igual de medio de mantenimiento, que consta de disolución de Hanks suplementada con 0,3% de hidrolizado de caseína. Después de una incubación adicional durante 3 días a 34°C, el flúido que sobrenada es recogido y clarificado por centrifugación.

Se toman muestras para su valoración, identificación y ensayo de seguridad, y el virus es almacenado a -60°C.

La concentración de virus es de  $10^5$  InD<sub>50</sub> por ml., determinada en células primarias de RHV por medio del

30  
4.10.67.



Sistema de interferencia.

Este material de virus es sometido después a ensayo de seguridad, incluyendo esterilidad bacteriana y ausencia de agentes extraños, por inoculación a conejos, hamsters, cobayas, ratones y monos.

5

Se llevan a cabo ensayos adicionales de seguridad en diferentes sistemas de cultivos de tejidos.

Se lleva a cabo un ensayo preliminar de potencia inoculando conejos y monos con  $10^{3,5}$  InD<sub>50</sub>. Los ensayos de neutralización de suero (NS) se llevan a cabo en células de RMV.

10

Los resultados se dan en las Tablas I y II siguientes.

345972

4.10.67.

4.10.67.

Tabla I

Respuesta de anticuerpos de monos inoculados intramuscularmente con  $10^{3,5}$  Ind<sub>50</sub>.

Mono n	Muestra de suero de preinoculación	Resultados del ensayo de NS frente a 30 Ind <sub>50</sub> en célu- las de RMV	25 <sup>º</sup>	32 <sup>º</sup>	45 <sup>º</sup>
225	< 1/4	ND	1/8	1/16	1/16
509	< 1/4	ND	1/4	1/16	1/32
611	< 1/4	< 1/4	1/8	ND	1/32
831	< 1/4	1/4	1/32	ND	1/32
619	< 1/4	1/4	1/8	ND	1/16
857	< 1/4	1/4	1/8	ND	1/16
1064	< 1/4	ND	1/32	ND	1/64
953	< 1/4	ND	1/16	ND	1/32
1053	< 1/4	ND	1/4	ND	1/8

ND = No determinado

º = días después de la inoculación



345972



Tabla II

Respuesta de anticuerpos de conejos inoculados subcutáneamente con  $10^{3,5}$  InD<sub>50</sub>.

	Conejo n	Muestra de suero antes de la inoculación	Resultados del ensayo de NS frente a 30 InD <sub>50</sub> en células de RHV 24 días después de la inoculación
5	1	< 1/4	≥ 1/8
	2	< 1/4	≥ 1/8
10	3	< 1/4	1/16
	4	< 1/4	1/8
	5	< 1/4	≥ 1/8
	6	< 1/4	1/16
	7	< 1/4	1/16
15	8	< 1/4	1/8

La preparación del virus se distribuye en viales de vidrio, cada uno de los cuales contiene un ml. de flúido.

Después, las ampollas son secadas por congelación y cerradas herméticamente.

Después de su reconstitución por adición de un ml. de agua destilada, la vacuna es inoculada por vía subcutánea a individuos susceptibles, siendo las dosis individuales de aproximadamente 125 InD<sub>50</sub>.

Los resultados de un ensayo de respuesta serológica realizado en un grupo de 25 niños seronegativos (15 que recibieron la vacuna y 10 controles que vivieron en estrecho contacto) se dan en la Tabla III.

De los 15 niños vacunados, 13 tuvieron una ele

30  
4.10.67.



vación de anticuerpos hasta 1/32 o más (2 de ellos, que se indican por ND, no estuvieron disponibles en el momento del ensayo). Ninguno mostró síntomas clínicos de infección. Los 10 que estuvieron en contacto permanecieron negativos serológicamente.

5

Tabla III

Respuesta serológica expresada en concentración de anticuerpos seroneutralizantes.

	Individuos	Edad años	Muestra antes de la vacunación	Situación	56 días después de la vacunación
	S.M.	2 1/2	< 4	V	32
	V.S.	2	< 4	V	≥ 32
10	M.J.	2	< 4	V	≥ 32
	N.R.	2	< 4	V	32
	H.A.	1	< 4	V	≥ 32
	DB.G	2	< 4	C	< 4
	VN.L	2	< 4	C	< 4
15	R.F.	2	< 4	V	≥ 32
	B.D.	2	< 4	C	< 4
	J.A.	1 1/2	< 4	C	< 4
	V.M.	1	< 4	V	≥ 32
	E.P.	1	< 4	V	≥ 32
20	L.T.	1	< 4	C	< 4
	G.C.	1	< 4	V	≥ 32
	A.M.	1	< 4	V	≥ 32
	R.O.	1	< 4	C	< 4
	L.A.	2	< 4	V	ND
25	D.A.	2	< 4	C	< 4

4.10.67.



Tabla III (Cont.)

	Indi- viduos	Edad años	Muestra an- tes de la vacunación	Situación	56 días des- pués de la vacunación
5	G.O.	2 1/2	< 4	C	< 4
	M.A.	2 1/2	< 4	V	ND
	J.A.	1	< 4	C	< 4
	P.A.	2 1/2	< 4	V	≥ 32
	D.B.	3 1/2	< 4	V	32
10	GB.K	5	< 4	V	8
	GB.F	4	< 4	C	< 4

V = vacunado

C = en contacto

15

Ejemplo 2

La técnica es la explicada en el Ejemplo 1, pero los pasos se continúan hasta el paso nº 30 en cultivos primarios de células de RC.

A partir de los mismos se prepara una vacuna, y se lleva a cabo un ensayo de seguridad como se ha explicado en el ejemplo 1.

La potencia de la preparación se determina en animales (monos).

Los resultados se dan en la Tabla IV.

345972

4.10.67.



Tabla IV

Respuesta de anticuerpos de monos inoculados por vía intramuscular con  $10^{2,5}$  InD<sub>50</sub>.

5	Mono n	Muestra de suero antes de la ino- culacion	Resultados del ensayo de NS frente a 10 InD <sub>50</sub> en células de RMV.	
			25 <sup>m</sup>	39 <sup>m</sup>
10	1098	< 1/4	1/8	ND
	1091	< 1/4	1/8	ND
	919	< 1/4	1/8	1/8
	943	< 1/4	1/16	1/16

m días después de la inoculación.

Ejemplo 3

15 Partiendo del material vírico procedente del paso nº 21 a 34°C obtenido en el ejemplo 1, se realizan 9 pasos adicionales en cultivos primarios de células de RC, pero a 28°C, incluyendo la última operación de la preparación de la vacuna.

20 La vacuna obtenida es sometida a ensayo de seguridad e inoculada a monos y conejos para realizar un ensayo de potencia.

Los resultados se dan en las Tablas V y VI siguientes.

**345972**

4.10.67.



Tabla V

Respuesta de anticuerpos de monos inoculados por vía intramuscular con  $10^{2,0}$  InD<sub>50</sub>.

5	Mono n	Muestra de suero antes de la inoculación	Resultados del ensayo de NS frente a $10$ InD <sub>50</sub> en células de RMV.	
			25 <sup>º</sup>	39 <sup>º</sup>
	1003	<1/4	1/8	1/16
	977	<1/4	1/8	1/8

10

º = días después de la inoculación.

Tabla VI

Respuesta de anticuerpos de conejos inoculados por vía intramuscular con  $10^{2,0}$  InD<sub>50</sub>.

15

Conejo n	Muestra de suero antes de la inoculación	Resultados del ensayo de NS frente a $10$ InD <sub>50</sub> en células de RMV.
		26 <sup>º</sup>
29	<1/4	1/8
30	<1/4	1/4
31	<1/4	1/16
32	<1/4	1/8
33	<1/4	1/4

20

25

º = días después de la inoculación.

Ejemplo 4

La técnica es la explicada en el ejemplo, pero los pasos son continuados hasta el paso nº 51 en cultivos primarios de células de RC, constando el medio final de mantenimiento de disolución de Hanks suplementada con 0,3%

30  
4.10.67.

345972



de hidrolizado de caseína, y conteniendo 50 microgramos de cloramfenicol por ml. de disolución de Hanks.

Después de la incubación durante 9 días a 34°C, el flúido que sobrenada es recolectado, clarificado por centrifugación y mezclado con un volumen igual de disolución estabilizante que consta de 30 g. de glutamato de potasio, 200 g. de sacarosa y 50 mg. de cloramfenicol por litro de agua destilada, y la mezcla es distribuída en viales de vidrio que contienen un ml. de agua.

Los viales son después secadas por congelación y cerradas herméticamente.

Después de su reconstitución por adición de un ml. de agua destilada, la vacuna es inoculada por vía subcutánea a 65 individuos seronegativos, llegando la concentración de las dosis individuales a aproximadamente  $10^{2,6}$  InD<sub>50</sub> en células de RMV ó  $10^{3,7}$  UFP (unidades formadoras de plaquetas) en células de RC 13. Un grupo de 30 niños seronegativos fue mantenido en contacto íntimo con los vacunados durante un período de 6 semanas.

Un ensayo de respuesta serológica realizado en el grupo de 65 individuos vacunados mostró que todos menos uno respondieron a la vacuna con una concentración media de anticuerpos de 1/128, determinada en el ensayo de Inhibición de hematoaglutinación (IHA). Ninguno mostró síntomas clínicos de infección. La totalidad de los 30 mantenidos en contacto permanecieron serológicamente negativos.

Ejemplo 5

La técnica es la explicada en el ejemplo 1, pero los pasos son continuados hasta el paso nº 61 en cult. 4.10.67.



5           tivos primarios de células de RC, constando el medio final de mantenimiento de disolución de Hanks suplementada con 0,3% de hidrolizado de caseína y con un contenido de 50 microgramos de cloramfenicol por ml. de disolución de Hanks.

10           Después de una incubación durante 9 días a 34°C, el flúido que sobrenada es recolectado, clarificado por centrifugación y mezclado con un volumen igual de disolución estabilizante, que consta de 30 g. de glutamato de potasio, 200 g. de sacarosa y 50 mg. de cloramfenicol por litro de agua destilada, y la mezcla es distribuída en viales de vidrio, con un ml. de agua cada uno.

            Después, los viales son secados por congelación y cerrados herméticamente.

15           Después de su reconstitución por adición de un ml. de agua destilada, la vacuna es inoculada por vía subcutánea a individuos seronegativos, llegando la concentración de las dosis individuales a aproximadamente  $10^{2,83}$  Ind<sub>50</sub> en células de RMV ó  $10^{3,9}$  UFP en células de RC 13.

20           Un ensayo de respuesta serológica realizado en un grupo de 7 individuos seronegativos mostró que todos respondieron a la vacuna con una concentración media de 1/64, determinada en el ensayo de IHA.

25           Ninguno mostró síntomas clínicos de infección.

            La presente solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña el 21 de Octubre de 1966, bajo el núm. 47.399, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

4.10.67.

**345972**

N O T A



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

5

1.- Un método para atenuar la virulencia de virus de rubéola sin pérdida de antigenicidad, que comprende hacer pasar sucesivamente una cepa de virus de rubéola al menos 15 veces sobre cultivos primarios de tejidos de riñón de conejo.

10

2.- Un método según la reivindicación 1, en el que el número de pasos sucesivos sobre cultivos primarios de tejido de riñón de conejo está comprendido entre aproximadamente 20 y aproximadamente 60.

15

3.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que los pasos son realizados a una temperatura que no excede de 36°C.

20

4.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la duración de cada paso sucesivo no es mayor de 5 días.

25

5.- Un método para preparar una vacuna contra la rubéola, que comprende hacer pasar sucesivamente una cepa de virus de rubéola según el método explicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y utilizar el virus de rubéola vivo atenuado recolectado como ingrediente activo para una vacuna contra la rubéola.

345972



6.- Un método para atenuar la virulencia de virus de rubéola sin pérdida de antigenicidad.

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

5 La presente Memoria consta de veinte hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

11 OCT 1967

P.A.

Alberto de Elguera  
Por Elguera

345972

4.10.67