

347035

P - 36.615

AB/CV Cde 11317
S.2 "Vacin rage"

Memoria descriptiva



para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de INSTITUT FRANCAIS DE LA FIEVRE APHEUSE

~~entidad de nacionalidad~~ sociedad anónima francesa

con domicilio en 254 rue Marcel Mérieux, Lyon, Francia

por: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UNA VACUNA CONTRA
LA RABIA" (Clase Internacional C12d)

30-10-67

- 1 -

**POOR
QUALITY**



5 El presente invento se refiere a un nuevo procedimiento que permite preparar en condiciones particularmente interesantes una vacuna contra la rabia que presenta una concentración elevada en virus vivientes o en antígeno para la vacuna inactivada.

Además, la vacuna obtenida según este nuevo procedimiento puede ser utilizada sin peligro y asegura un poder de protección muy elevado.

10 El presente invento tiene por objeto un nuevo procedimiento de preparación de una vacuna contra la rabia, caracterizado por el hecho de que se cultiva una cepa de virus de la rabia sobre un cultivo, de una línea celular procedente de un órgano de mustélido o de una cepa celular o incluso sobre un cultivo de células primarias, en particular procedentes de primates, de mamíferos o de gallináceas, efectuándose el cultivo de la cepa de virus al mismo tiempo que el cultivo celular en un medio apropiado, y luego, después de que se haya molido el tejido celular, se separa el líquido que sobrenada, el cual se
15 utiliza como vacuna viviente o es luego inactivado por acción de un agente de inactivación tal como la β -propiolactona, el aldehído glicídílico o el formol, pudiendo ser ventajosamente liofilizada la vacuna para mejorar su conservación.
20

25 Según un primer modo de puesta en práctica del invento, que permite obtener una vacuna a base de virus inactivados, se parte de una cepa de virus fija del tipo Pasteur que ha sido adaptada a las células utilizadas para el cultivo.

30 En un segundo modo de puesta en práctica del proce-



dimiento según el invento, que permite obtener una vacuna
viviente, se parte de la cepa de virus modificada conocida
da con la denominación Flury H.E.P.

5 Conforme al invento, se puede elegir la línea celu-
lar que sirve para el cultivo del virus entre las líneas
de células de órganos de mustélidos, y, en particular, de
roedores tales como el ratón, la rata y el hamster.

10 Las células pueden proceder de diversos órganos ta-
les como la piel, el pulmón o incluso los riñones de es-
tos animales.

15 Se pueden utilizar, por ejemplo, según el invento,
las líneas celulares conocidas bajo la denominación BEK
o bajo la denominación NIL, o incluso cualquier otra lí-
nea celular realizada a partir de células de riñones de
hamster y, en particular, de hamster joven.

Para poner en práctica el procedimiento según el in-
vento, es necesario proceder de la manera conocida, a una
adaptación de la cepa de virus, a las células sobre las
cuales ha de ser efectuado el cultivo.

20 Conforme al invento, se puede utilizar, por ejemplo,
como medio de cultivo, una solución isotónica salina que
contiene ácidos aminados, vitaminas, glúcidos y suero, tal
como, por ejemplo, un medio de cultivo del tipo Stocker
Mc Pherson.

25 El cultivo del virus puede ser efectuado sobre una
suspensión celular en el medio de cultivo, pero se puede
utilizar igualmente un cultivo sobre pared de vidrio, en
frasco fijo o giratorio.

30 Parece preferible, sin embargo, elegir un cultivo
en capa en frasco giratorio.

11 NOV. 1967



Conforme al invento, el cultivo puede ser efectuado utilizando un solo medio, siendo el tiempo de cultivo de aproximadamente 72 a 96 horas para una temperatura del orden de 34 a 38°C.

5 Sin embargo, según un modo de puesta en práctica particular del invento, se puede realizar ventajosamente en primer lugar el cultivo en un medio que contiene suero durante, por ejemplo, un tiempo de aproximadamente 48 horas, a una temperatura de 34 a 38°C, después de lo cual
10 se prosigue el cultivo en un segundo medio de cultivo exento de suero y cuyo volumen es notablemente menor, por ejemplo diez veces menor que el volumen del primer medio de cultivo.

El cultivo, en este segundo medio sin suero, puede
15 proseguirse, por ejemplo, durante un tiempo de 24 a 48 horas, lo que corresponde a un tiempo de cultivo total de aproximadamente 72 a 96 horas.

Naturalmente, el suero contenido en el medio de cultivo debe ser un suero al cual se adaptan las células.

20 Conforme a otra característica preferida del procedimiento según el invento, se realiza al comienzo del cultivo una modificación del pH por introducción en el medio de una cantidad suficiente de gas carbónico para llevar su pH a un valor óptimo generalmente próximo a 7.

25 Cuando el cultivo ha terminado, se procede de manera convencional a una congelación seguida de una descongelación de las células que son luego molidas en un líquido que pueda estar constituido ventajosamente por el líquido que sobrenada del medio del cultivo.

30 Se procede luego a una centrifugación que tiene por

11 NOV.



finalidad eliminar los residuos celulares.

5 En el caso en que se prepara según el invento una vacuna a base de virus inactivados, se efectúa luego la inactivación añadiendo de preferencia β -propiolactona a una dilución comprendida entre 1/1000 y 1/6000.

La inactivación puede efectuarse a temperaturas comprendidas, por ejemplo, entre 0°C y 37°C durante tiempos que van de algunas horas a más de 24 horas.

10 Es así como a la temperatura de 0°C, se obtiene en 24 horas una inactivación suficiente con β -propiolactona con una dilución en volumen de 1/5000. Con esta misma dilución se obtiene igualmente una inactivación satisfactoria en 16 horas a 18°C.

15 Con una dilución de 1/2000, la β -propiolactona permite inactivar el virus en tres horas a 25°C, mientras que a una temperatura de 37°C, la misma inactivación se obtiene con una dilución de 1/4000 después de dos horas.

20 Según el invento, la β -propiolactona es preferida para inactivar el virus a causa de la buena reproductividad de los resultados y de la gran seguridad que confiere.

Cuando la preparación de la vacuna ha terminado, es ventajoso proceder a su liofilización, operando según una técnica convencional.

25 Conforme al invento, es igualmente ventajoso añadir a la vacuna antes de la liofilización, o en el momento del empleo, un líquido que contiene uno de los coadyuvantes habitualmente utilizados para la potencialización de las vacunas.

30 Se puede utilizar, por ejemplo, un coadyuvante oleo-

NOV. 1967



so constituido, por ejemplo, por un aceite mineral tal como el conocido con la denominación de "Drakeol" o de "Mayoline" emulsificado con el producto conocido con la denominación "Arlacel A".

5 Se puede utilizar igualmente un producto a base de aceite de cacahuete y de estearato de aluminio tal como el conocido con la denominación "Metabolizable oily adjuvant nº 65".

10 Se puede utilizar también como coadyuvante una solución de hidróxido de aluminio que contiene aproximadamente 2% de Al_2O_3 seco o incluso de fosfato de aluminio $Al PO_4$ a una concentración de 1%, siendo utilizados estos dos coadyuvantes, por ejemplo, a razón de 1 mg por ml de vacuna.

15 Con la finalidad de hacer comprender mejor el invento, se describirán ahora a título de ilustración y sin ningún carácter limitativo varios modos de puesta en práctica.

EJEMPLO I

20 Se realiza una suspensión de células de línea NIL por acción de la tripsina. Esta suspensión es infectada por adición de virus rábico fijo. Luego es distribuida en frascos de cultivo a los que se añade un medio de cultivo de Mac Pherson-Stoker y luego se colocan en estufa
25 a una temperatura de + 37°C.

Una vez que la capa celular es confluyente, las células infectadas son despegadas del cristal por acción de la tripsina y mezcladas con una suspensión de células no infectadas en la proporción de un volumen de suspensión
30 de células infectadas por 3 a 4 volúmenes de suspensión



de células no infectadas.

5 Esta mezcla se reparte luego en frascos de cultivo fijos o rodantes con adición de un nuevo medio de cultivo idéntico al medio de cultivo anteriormente indicado. Los frascos son mantenidos en estufa a una temperatura de + 37°C.

10 Una parte alícuota de la suspensión de células así obtenidas se toma para ser cultivada en láminas de vidrios en cajas de Petri. Estas láminas son utilizadas para controlar la cinética de la infección por virus.

Después de un tiempo comprendido generalmente entre 48 y 60 horas, se comprueba la presencia de inclusiones específicas intracitoplásmicas de tamaños varios.

15 El medio de cultivo inicial es sustituido entonces por un medio nuevo exento de suero a razón de un volumen de nuevo medio por 10 volúmenes de medio eliminado. El pH del medio es llevado a un valor de 7 por aportación de gas carbónico.

20 Los frascos se conservan durante todavía 20 a 24 horas a una temperatura de 37°C, y luego se congelan en masa a -30°C.

El líquido virulento se recoge después de la descongelación y agitación violenta de los frascos para realizar un buen despeque del asiento celular.

25 El líquido virulento es luego centrifugado para eliminar los residuos celulares, y luego es filtrado en filtro esterilizante. Los controles de esterilidad son efectuados en estas diferentes etapas. Además, se efectúa una toma que sirve para determinar la concentración infecciosa por inoculación intracerebral en el ratón, y que se

30



utiliza igualmente para la reacción de fijación del complemento.

5 La inactivación se efectúa luego por la β -propiolactona diluida a 1 por 4000, que se deja actuar durante 24 horas a una temperatura de 0°C y luego durante 2 horas a 37°C.

La vacuna es repartida luego en ampollas y liofilizada en presencia de lactosa que actúa como estabilizador.

10 Se efectúan luego controles de esterilidad bacteriológica y de inocuidad absoluta por pruebas clásicas para asegurarse de una buena inactivación y de la eficacia de la vacuna.

EJEMPLO II

15 Un frasco que contiene una suspensión de células diploides humanas (WI 38) es infectado por adición de virus rábico HEP. Esta suspensión se reparte en dos frascos de igual contenido que son completados con medio de cultivo de Eagle.

20 Hacia el tercero o el cuarto día, se asegura uno de la presencia en todas las células de inclusiones rábicas específicas.

25 Las células diploides así infectadas son puestas en suspensión después de tripsinación y son mezcladas con una suspensión de células diploides nuevas no infectadas. Esta mezcla se efectúa, por ejemplo, a razón de un volumen de suspensión de células infectadas por 10 volúmenes de suspensión de células no infectadas; el conjunto se distribuye en 20 frascos de cultivo.

30 La parte que sobrenada en el frasco infectado ini-



cial es igualmente repartida entre los 20 frascos que reciben cada uno una nueva cantidad de medio Eagle nuevo.

5 Una parte alícuota de la mezcla células infectadas + células no infectadas + parte que sobrenada infectada, se toma para ser cultivada en láminas de vidrio en cajas de Petri.

Hacia el cuarto o el quinto día, la inmunofluorescencia permite asegurarse de la presencia de inclusiones rábicas en todas las células.

10 En una variante, hacia el segundo o el tercer día del cultivo, se cambia el medio de cultivo por un medio que no comprende suero, siendo el volumen del medio nuevo, sin suero, por ejemplo 10 veces inferior al volumen del medio de cultivo inicial.

15 Se congelan los frascos de cultivo a una temperatura de -30°C.

20 Se recoge el producto virulento y se efectúa una toma destinada a probar la esterilidad bacteriológica y el poder infeccioso por inoculación intracerebral al ratoncillo recién nacido.

El virus es luego centrifugado, filtrado en filtro esterilizante y acondicionado en ampollas para ser liofilizado en presencia de un estabilizador constituido por lactosa.

25 Algunos frascos son separados para ser utilizados para un nuevo control bacteriológico y para las pruebas clásicas de eficacia de una vacuna viva no inactivada.

30 La presente solicitud que corresponde a la formulada en Francia, con fecha 22 de junio de 1967, bajo el número PV 111.547, se acoge a los beneficios del artículo



51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

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:

1.- Procedimiento de preparación de una vacuna contra la rabia, caracterizado por el hecho de que se cultiva una cepa de virus de la rabia sobre un cultivo de una línea celular procedente de un órgano de mustélido o de una cepa celular o incluso sobre un cultivo de células primarias, efectuándose el cultivo de la cepa de virus al mismo tiempo que el cultivo celular en un medio apropiado, y porque luego, después de haber molido el tejido celular, se separa el líquido que sobrenada, que se utiliza como vacuna viva o que, eventualmente, es luego inactivado por acción de un agente de inactivación.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la vacuna es luego liofilizada.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que para obtener una vacuna a base de virus inactivados, se parte de una cepa de virus fijo del tipo Pasteur.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que para obtener una vacuna vi-



11 NOV 1967

va, se parte de la cepa de virus atenuado conocida con la denominación Flury HEP.

5 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se utiliza para el cultivo del virus una línea celular procedente de un órgano tomado de un animal elegido en el grupo constituido por el ratón, la rata y el hamster.

10 6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se utiliza una línea celular procedente de un órgano elegido en el grupo constituido por la piel, el pulmón y el riñón.

7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se utiliza una línea celular procedente de células de riñón de hamster joven.

15 8.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se utilizan como cepa celular células diploides humanas.

20 9.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se utilizan para el cultivo de células primarias células de primates, de mamíferos o de gallináceas.

25 10.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se utiliza como medio de cultivo una solución isotónica salina que contiene ácidos aminados, vitaminas, glúcidos y suero.

30 11.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se efectúa el cultivo del virus durante un primer tiempo en un medio que contiene suero, y luego, durante un segundo tiempo, en un medio que puede estar exento de suero y que presenta un volumen no-



11 NOV. 1967

tablemente menor que el del primer medio.

12.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se efectúa el cultivo en cepa celular o en suspensión.

5 13.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que al comienzo del cultivo, se lleva el pH del medio a un valor óptimo generalmente próximo a 7, por introducción de gas carbónico.

10 14.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se realiza la inactivación del virus con ayuda de β -propiolactona a una dilución comprendida entre 1/1000 y 1/6000, o de otro agente de inactivación tal como el formol.

15 15.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se introduce en la vacuna un coadyuvante tal como un coadyuvante oleoso o un coadyuvante a base de compuestos que contienen aluminio.

16.- Procedimiento de preparación de una vacuna contra la rabia.

20 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines especificados.

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

Madrid, 11 NOV. 1967

P. A.

Alberto Quintanilla
[Handwritten signature]