

C 12 K 5/00, 7/00 A 61 K 27/00 C 12 K 9/00

SECCION TECNICA	
CLASIFICACION I. P. C.	
CLASE C 12	A 61
SUBCLASE K	K

PATENTE DE INVENCION

Ref: 11229.



373631

Memoria Descriptiva

sobre:

Procedimiento para la obtención de una vacuna activa
contra la enfermedad de Maret.

=====

Solicitante

NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION, entidad
inglesa, residente en Kingsgate House, 66-74 Victo-
ria Street, Londres S.W.1., Inglaterra.

=====

Este invento se refiere a la producción de ma-
terias antigénicas y, en particular, se refiere a una
materia antigénica útil en la preparación de productos
intermedios de vacunas y de vacunas para el tratamien-
to o prevención de la enfermedad de Maret.

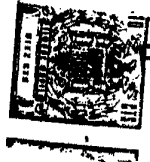
5.

373651



- La enfermedad de Marek es una enfermedad que afecta a las aves y constituye una de las condiciones infecciosas más graves de los pollos en los tiempos presentes y que afecta a toda clase de aves incluyendo a las aves empleadas para la cría y reproducción y productoras de
5. huevos y a sus polluelos. Es una enfermedad linfoproliferativa infecciosa en la que son comunes los tumores linfoides de las vísceras y actualmente se dispone de evidencia indicativa de que la causa de la enfermedad es un
10. virus o agente del tipo del virus del grupo herpes. El aislamiento del virus en el estado de confinamiento en células ha sido conseguido por el inventor de la presente y sus colegas en experimentos de cultivos en tejidos que se caracterizan porque capas monomoleculares de células
15. de los riñones de pollos se inoculan con células de los riñones de aves enfermas y se incuban a $38,5^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera húmeda de un 5 % de dióxido de carbono en aire. Al cabo de 7 a 10 días a partir de la inoculación de la
20. materia infecciosa, se observa un efecto citofático como de virus. El examen al microscopio de las células muestra partículas intranucleares que semejan virus herpes. El virus se encuentra fuertemente enlazado dentro de las células y no se puede separar fácilmente de la célula en forma infectiva.
25. Se ha descubierto ahora que durante la migración del virus en el cultivo en células, se alteran ciertas características del virus. Entre los cambios más importantes observados está una dramática reducción en la patogenicidad del virus después de un cierto número de migraciones. Esta pérdida de poder patógeno se cree que es
- 30.

373631



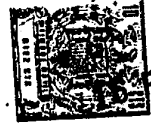
tá asociada con la pérdida del antígeno A del virus o, alternativamente, con la emergencia y elección de una variante del virus de la que se encuentra ausente el antígeno A.

5. Se ha descubierto también que el virus agotado de antígeno A que sale durante el paso posee todavía otros componentes antigénicos y, además, que los antígenos retenidos dan lugar a anticuerpos que confieren a las aves una medida muy notable de protección contra el peligro que supone el virus virulento bien por inoculación del agente infectivo o por transferencia del mismo desde una a otra ave como ocurre en el curso de una infección natural. Estas observaciones del desarrollo de una forma inmunogénica de un virus oncogénico, v.g., un virus causante de tumor, son totalmente sin precedentes y conducen a la posibilidad de producir, por primera vez, una vacuna eficaz contra dicho virus.

10. Se ha descubierto también que el virus agotado de antígeno A que sale durante el paso posee todavía otros componentes antigénicos y, además, que los antígenos retenidos dan lugar a anticuerpos que confieren a las aves una medida muy notable de protección contra el peligro que supone el virus virulento bien por inoculación del agente infectivo o por transferencia del mismo desde una a otra ave como ocurre en el curso de una infección natural. Estas observaciones del desarrollo de una forma inmunogénica de un virus oncogénico, v.g., un virus causante de tumor, son totalmente sin precedentes y conducen a la posibilidad de producir, por primera vez, una vacuna eficaz contra dicho virus.
15. Según este invento, se obtiene material antigénico por migración de un virus patógeno de la enfermedad de Marek en células de aves y continuando la migración hasta que el virus ha adquirido un grado de carencia de poder patógeno apropiado para la preparación de una vacuna activa.

20. Según este invento, se obtiene material antigénico por migración de un virus patógeno de la enfermedad de Marek en células de aves y continuando la migración hasta que el virus ha adquirido un grado de carencia de poder patógeno apropiado para la preparación de una vacuna activa.
25. La forma atenuada del virus producida por migración según el invento, posee también otras características deseables además de sus propiedades protectoras. Por ejemplo, el virus atenuado ha demostrado ser notablemente estable en el sentido de que no revierte a un estado patógeno después de la inoculación en las aves. Además, proporciona protección no solamente contra la amenaza de
- 30.

- 4 -
373631



- la estirpe patógena de la que se obtuvo sino también contra otras estirpes del virus, incluyendo estirpes especialmente agudas o graves. Aún más, el virus atenuado muestra muy poca tendencia a propagarse de las aves inoculadas a las aves sin inocular de la misma bandada o corral, lo cual supone una ventaja especialmente importante en el uso práctico de las vacunas basadas en el virus atenuado vivo o activo. Otra de las ventajas ofrecidas por las vacunas basadas en virus atenuados es que reducen virtualmente la incidencia de otras enfermedades de las aves, en particular la coccidiosis. Se cree que esta reducción se debe a la mejora general experimentada en la salud conseguida por la reducción en la incidencia de la enfermedad de Maret.
- 5.
- 10.
15. El procedimiento de este invento puede aplicarse a cualquier estirpe o clase de enfermedad de Maret. Se obtienen resultados especialmente buenos con la estirpe o clase HPRS 16 del virus y como esta clase particular ha sido extensamente investigada en los experimentos realizados con anterioridad al invento, se recomienda de un modo especial su uso para conseguir los fines del invento. No obstante, también se pueden encontrar otras clases o estirpes del virus en el campo de la investigación que pueden obtenerse fácilmente de aves infectadas para conseguir los fines del invento.
- 20.
25. Otras especies tienen diversos grados de poder patógeno pero, respecto a las características de cultivo y las demás propiedades importantes, son esencialmente del mismo tipo según se evidenciará por los experimentos descritos más adelante. Así,
30. dos clases o estirpes de virus, llamadas estirpes de



373631

- Frant, aisladas de una bandada de aves mantenidas libres de ciertos agentes patógenos específicos, difieren notablemente en su poder patógeno pero, no obstante, pueden experimentar atenuación para producir una forma protectora del virus. Otras estirpes relacionadas con
5. la clase HPRS 16 son, por ejemplo, las estirpes o clases HPRS 24 y HPRS B14. De un modo similar, estirpes o clases disponibles en los Estados Unidos de América y conocidas como JM, GA, CAL-1, y CONN-A son también susceptibles de atenuación según este invento. En particular la
10. estirpe o clase JM se desarrolla y produce un efecto citopático similar a las estirpes HPRS y de Frant y contienen los mismos antígenos A, B y C. Según se ha indicado anteriormente, el virus resulta difícil de aislar en cantidad de las células sin experimentar ciertos cambios y,
15. por lo tanto, es preferible emplear virus asociados con células como inóculos y como medio para transferir el virus de una migración a la siguiente.

- Se pueden utilizar muchas especies de células de
20. aves para llevar a cabo el proceso de atenuación, por ejemplo células de gallinas, patos, codornices, faisanes y pavos, siendo preferibles las células de gallos y gallinas. Cuando se emplean cultivos en células y tejidos, se ha descubierto que las células de riñón o embriones
25. fibroblásticos son eminentemente idóneas como células hospedantes. Por ejemplo, los virus patógenos aislados de tumores u otros tejidos de gallos y gallinas pueden someterse repetidamente en cultivos de células de riñones de pollos hasta que se obtiene la atenuación necesaria. Esto suele comenzar entre el 20º y 30º procesos mi
- 30.

373631



- gratorios y con frecuencia se descubre que, por ejemplo, después del 31º o el 39º procesos migratorios el virus ha adquirido las propiedades apropiadas para la producción de una vacuna atenuada in vitro. Para asegurar
5. que se obtiene una vacuna de la más alta calidad, las células empleadas para los procesos migratorios se han de encontrar de preferencia inicialmente libres de virus. Se han obtenido resultados muy alentadores cuando la atenuación se conseguía en parte por migración en un tipo
10. de célula y se completaba por migraciones ulteriores en un tipo diferente de célula aviar. Por ejemplo, se ha descubierto que se obtienen ventajas muy particulares con el uso de fibroblastos de embrión de pollo y un método preferido para llevar a cabo el proceso de atenuación comprende el someter al virus a proceso migratorio
15. primeramente en células de riñón de pollo o de otras aves seguido de migración en fibroblastos de embrión de pollo. Uno de los procedimientos más atractivos desarrollado hasta el momento emplea fibroblastos de embrión de
20. pollo para la mayoría de las migraciones en los procesos de atenuación. Así, el virus patógeno puede experimentar aproximadamente de 1 a 6 migraciones aproximadamente, preferiblemente de 3 a 4 migraciones, en células de riñón de pollo con el fin de adaptar al virus al sistema celular,
25. seguido de unas 15 a unas 20 migraciones en el fibroblasto de embrión de pollo. El empleo de dos tipos de sistemas celulares permite un mayor control en la pureza del producto final y las grandes propiedades selectivas de los fibroblastos de embrión de pollo para el virus de la
30. enfermedad de Marek son particularmente importantes a es-

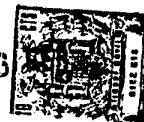


373631

te respecto. Asimismo, los fibroblastos de pollo son un tipo particularmente conveniente para emplear en gran escala.

- 5. El número de procesos migratorios necesarios para conseguir el grado apropiado de atenuación puede determinarse en general fácilmente por experimentación. De este modo se pueden experimentar los cultivos en cada estadio para observar la presencia del antígeno A mediante el experimento bien conocido de difusión en gel
- 10. (Chubb and Churchill Vet. Rec. 1963, 81, 4). Se observará que el número de migraciones depende en cierto modo del grado de patogenicidad de la extirpe o clase original elegida. Normalmente suele ser innecesario exceder de 30, y en algunos casos unas 40. migraciones y suele ser frecuente el empleo de un número de procesos migratorios significativamente menor a los números arriba citados, especialmente con el método preferido de dos estadios referido anteriormente.
- 15.

- 20. El cultivo del virus en células aviares se puede conseguir empleando una amplia variedad de medios nutritivos y se han obtenido resultados muy satisfactorios con una pluralidad de medios normales y modificaciones de los mismos. Por ejemplo, ha supuesto una ventaja utilizar hidrolisato de sal equilibrada de Earle/lactalbúmina
- 25. (Medio N° 1, vease el Ejemplo 1). También se han obtenido buenos resultados, particularmente con cultivos primarios de fibroblasto de embrión de pollo, con el uso de Medio N° 2 consistente en SM 199 (84 %), caldo de cultivo de fosfato de triptosa (30 g/l, 5 %), suero de ternera (5 %) y penicilina/estreptomicina (como en el Medio
- 30.



373631

- Nº 1). La composición del SM 199 ha sido expuesta por Morgan et al, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 1 (1950). También se puede emplear una modificación del Medio Nº 2 (Medio Nº 3) en la que el SM 199 se reemplaza por medio de Eagle de contenido aumentado en vitamina y aminoácido (Macpherson et al, Virology 16, 147 (1962). Igualmente se puede emplear otra modificación del Medio Nº 2 (Medio Nº 4) en la que se emplean sales de Hank en lugar de sales de Earle.
- 5.
10. Se observará que el procedimiento del invento conduce a la producción de materia antigénica en forma de virus de la enfermedad de Marek, antigénica pero no patogénica, o de un modo más específico, a una estirpe o clase libre de antígeno A protectora, del virus. De un modo más particular la materia antigénica comprende células aviáres que contienen virus atenuados asociados con células. Dicha materia es útil como materia de siembra en la producción de una vacuna y queda comprendida per se dentro del alcance del presente invento. Una clase particular de dicha materia comprende células de pollo que contienen una forma atenuada de la estirpe o clase HPRS 16 del virus, y un cultivo de células de los riñones de pollos que contienen virus atenuados ha sido depositada con la colección de virus veterinarios mantenida por el Laboratorio Central de Veterinaria (Central Veterinary Laboratory), Weybridge, Surrey, donde se encuentra identificada con el número de referencia LEU/16/AT.
- 15.
- 20.
- 25.
30. Con el fin de producir una vacuna, los virus atenuados obtenidos según se ha descrito anteriormente pueden cultivarse adicionalmente en el mismo sistema celular

- 5 ..
373631



16 FEB. 1972

utilizado para el proceso de atenuación o en sistemas relacionados. De este modo y si se desea, el virus puede ser transferido de uno a otro sistema celular en un estadio ulterior del proceso. Por ejemplo, la atenuación y multiplicación del virus puede realizarse en células cultivadas y después transferirse el virus a la corriente sanguínea de aves intactas y obtenerse una vacuna recuperando la sangre de los animales.

5.

Las vacunas producidas según este invento pueden administrarse de diversos modos, v.g., por inyección subcutánea, intramuscular, intranasal o intraocular en el polluelo o en el embrión. La inyección intramuscular en una pata del pollo es una vía particularmente preferible de administración.

10.

15.

A continuación se ilustra el invento en los ejemplos que siguen:

Ejemplo 1

Preparación del Cultivo Celular:

Se disecaron los riñones de pollos de una a ocho semanas de edad inmediatamente después de sacrificados, se cortaron finamente con tijeras y se lavaron tres veces agitándolos en 20 cc de sustancia salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,2), seguido de decantación. Se dispersaron las células por tripsinización, añadiéndose 20 cc de tripsina al 0,05 % (Difco 1:250 tripsina) en PBS a los riñones picados, en un matraz cónico. Se permitieron cuatro ciclos de cinco minutos de tripsinización, empleando nueva tripsina en cada ciclo y un agitador magnético. La suspensión celular obtenida de cada ciclo de tripsinización se añadió a 1,0 cc de suero de

20.

25.

30.



373631

5. ternera para inhibir la tripsina y después se sometió a centrifugación por espacio de 5 minutos a 1.000 rpm en una centrifugadora MSE Minor para depositar las células. Se volvió a formar una suspensión con la masa de células en un medio de desarrollo de cultivo celular (Medio Nº 1) y se contaron las células empleando un hemocitómetro. Se diluyó esta suspensión celular hasta contener 2×10^6 células por cada 5,0 cc. en el medio de desarrollo.

Medio Nº 1

10.	Solución salina equilibrada de Earle.....	84 %
	Caldo de fosfato de triptosa (30 g/litro)...	5 %
	Hidrolisato de lactalbúmina (50 g/litro)....	5 %
	Suero de ternera (inactivado térmicamente)..	5 %
	Penicilina (20.000 Us/cc.)	} 1 %
15.	Estreptomocina (20 mg/cc.)	

Se añadieron 2×10^6 células en 5,0 cc de medio de desarrollo a cada recipiente de cultivo (platos Falcon de plástico - 50 mm). Los cultivos celulares se incubaron a 37-38,5°C en atmósfera humectada de CO₂ al 5 %. Cuando las capas monomoleculares fueron confluentes, normalmente al cabo de 3 días de incubación, se cambió el medio por otro medio de mantenimiento. La composición de este medio fué igual que la del medio de desarrollo a excepción de que se redujo el caldo fosfato de triptosa y el suero de ternera al 2 % del volumen total. Las capas monomoleculares se infectaron en el día en que confluyeron y después de haberse añadido el medio de mantenimiento.

Aislamiento del virus de los pollos infectados:

30. Para este fin se halló satisfactoria la migración 25ª de la estirpe o clase HPRS-16 de la enfermedad aguda



373631

de Maret.

5. Tumores linfocitos de ovarios se forzaron a través de una gasa estéril de acero inoxidable de 13,90 cm² (medida 978) sobre un plato petri ejerciendo presión manual con una espátula esterilizada. Se preparó una suspensión con el tejido pasante en PBS pipetándola vigorosamente. Después de dejarla reposar en la mesa de trabajo durante 2 minutos en un recipiente de cristal para dejar que sedimentaran los trozos de mayor tamaño de tejido,
10. se separó la suspensión celular sobrenadante y se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos en una centrifugadora MSE Minor. Se volvió a preparar una suspensión con el depósito celular en un volumen conveniente de medio de desarrollo del cultivo celular. La suspensión resultante se
15. hizo pasar inmediatamente después a través de una gasa de acero inoxidable de medida 150 en una jeringuilla con microfiltro. El filtrado consistiría principalmente en células únicas tumorosas. Estas células se contaron en un hemocitómetro y se ajustó la concentración celular a aproximadamente 10×10^6 células por 1,0 cc. Después se inoculó 0,5 cc de esta suspensión celular en cada capa monomolecular confluyente de riñón de pollo. En esta primera pasada de aislamiento, los cultivos se incubaron durante
20. 10 a 14 días más con cambios de medio en intervalos de 3 días.
- 25.

Migración del Virus:

30. Cuando el efecto citopático del virus se encontraba bien desarrollado en las células, se separaron de la superficie sobre la que se desarrollaban por dispersión con tripsina al 0,05 % en verseno (EDTA). Las células en sus



373631

- pensión fueron separadas de la mezcla de tripsina-verse-
ne, se volvió a preparar una suspensión con las mismas
en medio de desarrollo y se utilizó la suspensión para
infectar nuevas capas monomoleculares confluentes. Debi-
do al hecho de que el virus se encontraba asociado con
las células, el aumento de efecto citopático de proceso
a proceso migratorio fué lento. Por lo tanto, en los
primeros procesos migratorios el número de recipientes
empleados no puede ser de más del doble en cada proceso
migratorio, pero en los últimos procesos migratorios se
puede mejorar hasta alcanzar un aumento de cuatro veces
u ocho veces el número de cultivos.

Características del Virus Atenuado:

- Los virus sometidos continuamente a proceso migra-
torio en cultivo celular de riñón de pollo quedan atenua-
dos al cabo de cinco a seis meses. Los virus atenuados
produjeron un mayor régimen de desarrollo del efecto ci-
topático de forma que el periodo comprendido entre cada
proceso migratorio se redujo de 7 días a 3 días. Los vi-
rus atenuados produjeron placas macroscópicas 1,0 - 1,5
mm de un lado al otro, en las capas monomoleculares de
los riñones de pollos en un periodo de 6 a 7 días. En los
cultivos muy infectados no se pudo detectar antígeno por
la técnica de Ochterlony suelto en el medio de cultivo,
mientras que en el caso de los virus atenuados, dicho en-
tígeno se liberó. Fué necesario concentrar el medio de
los cultivos infectados hasta 50 veces mediante extracción
de agua o por precipitación de los antígenos con sulfato
de amonio para demostrar satisfactoriamente la ausencia de
este antígeno.

373631

16 FEB 1953



5. El virus atenuado no indujo la enfermedad clínica de Marek cuando se administró a polluelos de un día de edad una estirpe o clase susceptible (v.g., estirpe o clase HPRS-RIR) por vía intravenosa o intraabdominal en forma de una suspensión celular de riñón de pollo infectado.

Producción de Vacuna Experimental:

10. Virus seminales en forma de células infectadas de riñón de pollo congeladas almacenadas en dimetilsulfóxido (DMSO) en un refrigerador de nitrógeno líquido se descongelaron rápidamente y se emplearon para inocular capas monomoleculares confluentes de riñón de pollo. Una dosis de aproximadamente 10^3 unidades formadoras de placas resultó satisfactoria por cada plato petri de 50 mm. Estos
15. cultivos se sometieron a migración a intervalos apropiados (v.g., 3-6 días) de acuerdo con la eficacia con que se desarrolló el efecto citopático. Las células de cada cultivo infectado se emplearon para infectar 2 a 8 nuevos cultivos de acuerdo con el nivel de efecto citopático. Al
20. cabo de 6-10 de dichas migraciones, determinadas según la cantidad de vacuna necesaria, la suspensión recogida de células infectadas de riñón de pollo se distribuyeron en ampollas y se almacenaron en DMSO al 7,5 % en un refrigerador de nitrógeno líquido. Se realizó un cálculo aproximado de las células infectadas en cada recipiente mediante coloración de placas en las capas monomoleculares
25. de riñón de pollo.

Dosis:

30. Se calculó una dilución apropiada de la vacuna almacenada de forma que cada polluelo que hubiera de ser va

373631



cunado recibiera una dosis de aproximadamente 5×10^2 a aproximadamente 7×10^3 unidades formadoras de placas. Un diluyente apropiado fué una solución salina fisiológica tamponada a un pH de 7,2.

5. Vía de Administración:

La inoculación se llevó a cabo inmediatamente después de la dilución de la vacuna. La vacuna se administró por vía intraabdominal (intraperitoneal) en un volumen de 0,2 a 1,0 cc., v.g., 0,5 cc por polluelo.

10. Producción en gran escala:

El virus se desarrolló en gran cantidad empleando capas monomoleculares de riñón de pollo en matraces Roux o botellas Thomson. Para producir cultivos de capas monomoleculares en estos recipientes, se sembraron matraces

15. Roux con 40×10^6 células de riñón de pollo recién tripsinizadas en 10 cc de medio de desarrollo y botellas Thomson con 80×10^6 células en 200 cc. En este caso, se emplearon los mismos medios de desarrollo y mantenimiento a excepción de que se reemplazó la solución salina equilibrada de Earle por solución salina equilibrada de Hank. Se

20. sometió al virus a un número suficiente de migraciones, que normalmente no excedieron de 10, y se recogieron cuando un número suficiente de cultivos para el lote de vacuna necesaria mostró efectos citopáticos que comprendían

25. más del 10 % de la lámina celular.

Almacenamiento de la Vacuna:

Las células infectadas recogidas se separaron de la mezcla de tripsina y verseno por centrifugación, según se ha descrito anteriormente. Se volvió a formar suspensión con las células en medio de desarrollo que contenía

30.

- 15 -
373631



16 FEB 1942

- un 10 % de suero de ternera y un 7,5 % de dimetilsulfóxido. Se ajustó la concentración celular a aproximadamente 4×10^6 células por 1,0 cc y se distribuyó la suspensión celular en ampollas que se cerraron herméticamente. La relación o régimen de enfriamiento desde $+4^{\circ}\text{C}$ hasta -40°C se reguló a un régimen de 1°C por minuto. Después de encontrarse a -40°C se trasladaron las ampollas rápidamente al refrigerador de nitrógeno líquido.
- 5.

Pruebas de las Immunogenicidad en los Pollos.

10. Se ha averiguado que las unidades formadoras de 500 - 7.000 placas inoculadas en polluelos de un día a dos semanas de edad no produce efecto adverso en un periodo de observación de 20 semanas. Una exposición ulterior a la enfermedad por contacto con virus virulentos al cabo de 3 a 4 semanas de la vacunación demostró dar una sólida protección en aquellos vacunados contra un 50 % o más de mortalidad en los pollos de contrastación expuestos a la enfermedad.
- 15.

20. Con el fin de proporcionar una prueba corriente o prueba de rutina de la inmunogenicidad de los lotes de vacunas, se deben inocular 20 polluelos de un día de edad intraabdominalmente con vacuna mientras que otros 20 se mantienen aislados en otro lugar como muestras de contrastación sin vacunar. Al cabo de cuatro semanas, ambos grupos de pollos vacunados y sin vacunar se exponen a los efectos de la enfermedad mediante inoculación con células que contienen virus virulentos.
- 25.

Prueba de Propagación:

30. Un grupo de aves vacunados con HPRS RIR se dejaron en contacto directo con un grupo de aves susceptibles



5. y en contacto indirecto con un segundo grupo de aves susceptibles a la misma clase o estirpe durante 18 semanas. Al cabo de 9, 11 y 18 semanas se sangraron todos los grupos y se determinó la presencia de anticuerpos por experimentación en sueros. Al cabo de 18 semanas de la vacunación se tomaron muestras de sangre de todas las aves y se experimentó en las capas externas de la sangre para determinar la presencia de virus de la vacuna. La tabla que sigue expone los resultados obtenidos:

10.	<u>Pruebas de Propagación</u>	<u>Vacunados</u>	<u>Contacto Directo</u>	<u>Contacto Indirecto</u>
	Número de aves	15	8	14
	Anticuerpos + al cabo de 11 y 18 semanas	7	0	0
	Virus aislados	4	0	0

15. Prueba de Estabilidad:

Se experimentó la clase o estirpe HPRS 16 atenuada para averiguar su estabilidad aislando el virus de la sangre de 7 pollos viraémicos, al cabo de 15 semanas de haber sido vacunados cuando tenía un día de edad, con HPRS 16 de 39ª migración. La capa externa de estas 8 muestras de sangre se enfrió e inculó en 15 pollos de un día de edad vacunados con HPRS RIR. Durante un periodo de observación de 18 semanas estas aves permanecieron clínicamente normales. Los virus aislados de la circulación de dos de estos pollos mostró la ausencia característica del antígeno A de virus atenuado.

Ejemplo 2

Aislamiento y Atenuación:

30. Una clase o estirpe de virus de la enfermedad de Marek de patogenicidad natural baja se aisló de los ri-

- 17 -
373631



5. ñones de pollos de 4 semanas de edad de una bandada de cría "libres de patógenos específicos" mantenida en aislamiento y libres de virus de leucocitis, acefalomieli-tis aviar, bronquitis infecciosa, enfermedad de Newcas-tle, laringotraqueitis infecciosa, virus CELO y GAL, My-coplasma gallisepticum y S. pullorum.

10. Se tripsinizaron los riñones y se cultivaron en el medio de lactalbúmina de Earle, según se describe en el Ejemplo 1. Se observó al microscopio el efecto cito-pático típico de las microplacas de la enfermedad de Ma-ret. Después se sometió el virus a migración 12 veces en cultivos celulares de riñón de pollo en medio N° 3, 12 veces en fibroblasto de embrión de pollo en medio N° 3, y 12 veces más en cultivos de fibroblasto de embrión de pato en medio N° 3. La estirpe de virus así obtenida se experimentó para hallar su difusión en gel y se demos-tró que había perdido su antígeno "A".

Pruebas de Patogenicidad:

20. a) 50 pollos (de un día de edad) de "Sykes Línea 50" genéticamente susceptibles, que poseían anticuerpos maternos, se inocularon con $10^{4.5}$ unidades formadoras de placas (pfu) de la estirpe atenuada de Frant por pájaro y por vía intramuscular. Estos animales no mostraron síntomas clínicos durante once meses. Pusieron huevos fértiles, de los cuales se empollaron más de 100 y se mantuvieron y observaron los pollos para hallar signos de la enfermedad. Unos especímenes histológicos de siete aves del grupo inoculado demostraron encontrarse libres de lesiones de la enfermedad de Maret.
- 25.
30. b) Se llevaron a cabo experimentos similares uti-

373631



lizando 20 pollos "Sykes Linea 50" (de un día de edad), que tenían anticuerpos materno, inoculando a las aves con dosis de 10^3 pfu y se obtuvieron resultados similares.

5. c) Un grupo de pollos rojos "Rhode Island" genéticamente susceptibles vacunados con HPRS y que tenían anticuerpos maternos, se inocularon con dosis de 10^4 pfu por ave. Se averiguó que estas aves eran clínicamente normales al cabo de 12 semanas de la inoculación.

10. d) Cuatro grupos de 10 pollos Brown Leghorn, libres de anticuerpo, se inocularon con dosis de aproximadamente 10^4 por ave. Permanecieron clínicamente normales durante seis semanas; se sacrificaron y no mostraron lesiones macroscópicas.

15. Pruebas de inmunogenicidad:

a) Se inoculó a un grupo de pollos "Sykes Linea 50" de un día de edad, como sigue:

27 con 10^4 pfu de la 36ª migración del virus por ave.

20. Al cabo de 10 días, el grupo inoculado junto con dos grupos de contrastación de 27 y 25 aves, respectivamente, se expusieron al efecto de la enfermedad mediante inoculación con una dosis de 150 pfu del nivel de 7ª migración del virus HPRS 16 por ave. Las mortalidades observadas seis meses mas tarde fueron como sigue:

25.

Grupo	Inoculados	Contrasta ción	Contrasta- ción
Número de.aves	27	27	25
Número de aves muertas	5	27	21



373631

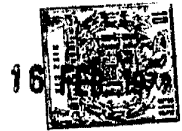
Los resultados obtenidos demuestran que el grupo inoculado se encontraba protegido y que un gran porcentaje de las aves sobrevivió al riesgo de la inoculación.

- b) En un experimento adicional se inocularon grupos de 20 pollos "Sykes Línea 50" (de un día de edad) con dosis diferentes de los virus atenuados de Frant y HPRS 16. Al cabo de 20 días las aves, junto con grupos de contrastación no vacunados, se expusieron a la inoculación por vía intramuscular con la estirpe o clase atenuada de HPRS 16 empleando una dosis de 10^2 pfu por ave. Todos los pollos se sacrificaron al cabo de 5 meses y se sometieron a examen macroscópico para determinar las lesiones sufridas.

Los resultados obtenidos fueron los que siguen:

Dosis pfu/ave	Estirpe atenuada de Frant			Estirpe atenuada HPRS 16		Contrastación
	<u>9×10^3</u>	<u>9×10^2</u>	<u>9×10</u>	<u>3×10^2</u>	<u>3×10</u>	
Número de aves	20	20	20	20	20	10
Número de aves con lesiones	2	5	15	5	12	8

- c) Con el fin de hallar la mejor dosis necesaria para proteger a las aves contra las formas naturales de infección, se inocularon grupos de 20 pollos del mismo tipo con estirpe de Frant atenuada a varios niveles de dosificación y se expusieron manteniéndolos en contacto con un grupo de otras 20 aves previamente inoculadas con 100 pfu por ave de la estirpe aguda sin atenuar HPRS 16 para proporcionar una fuente de infección. Se sacrificaron todas las aves al cabo de cinco meses y los resultados indicados a continuación muestran la incidencia de la enfermedad de Marek en los grupos representativos.



373631

Dosis pfu/ave	10 ³	10 ²	10	Ninguna. Grupo de contrastación	Aves fuente de infección
Número de aves	20	20	20	20	20
Número de aves con lesiones	0	2	8	17	20

Es evidente que una dosis de 1.000 pfu por ave proporciona una protección adecuada contra la infección procedente de otras aves en la bandada.

Prueba de Estabilidad:

5. Se experimentó la estabilidad de la estirpe de Frant atenuada aislando el virus de la sangre de un pollo "Sykes Linea 50" inoculado en el experimento para hallar la ausencia de patogenicidad y desarrollando el virus en un cultivo de riñón de pollo libre de enfermedad de Marek. La experimentación en cultivo de tejido demostró que la estirpe carecía de antígeno "A". Veinte pollos "Sykes Linea 50" de un día de edad inoculados con la estirpe o clase aislada permanecieron clínicamente normales durante 6 meses por lo menos, lo cual indica que no hubo inversión a la forma patógena.
- 10.
- 15.

Prueba de Oncogenicidad:

20. Se realizaron pruebas en bolsas de las mejillas de hámsters (marmotas de Alemania) según el método reconocido. Ninguno de los animales que recibieron la estirpe atenuada en asociación con células de fibroblasto de embrión de pollo mostraron síntomas de ninguna clase. Estos resultados quedaron confirmados en dos grupos de tres hámsters recién nacidas, que no mostraron síntomas clínicos al cabo de 8 semanas de tratamiento.

373631



Pruebas de Propagación:

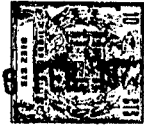
5. Un grupo de aves "Sykes Línea 50" vacunadas se dejaron en contacto con aves susceptibles durante 4 meses. Se tomaron muestras de sangre quincenalmente de ambos grupos y se experimentó en sus sueros para hallar la presencia de anticuerpo y de virus de la vacuna. Al cabo de 11 semanas de la vacunación se tomaron muestras de sangre de todas las aves y se experimentó en las capas externas de su sangre para hallar la presencia de virus de la vacuna. La tabla que sigue muestra los resultados obtenidos:

	Vacunados con <u>10⁵ pfu/ave</u>	<u>En contacto</u>
Número de aves	5	10
Anticuerpo detectado	<u>todos</u> positivo al cabo de 10 semanas	<u>Ninguno</u> positivo al cabo de 4 meses
Virus aislados	3	0

Prueba de Protección contra virus agudos diferentes:

15. Se eligieron 3 grupos de 18 aves "Brown Leghorn" libres de enfermedad de Marek. El primer grupo se inoculó con una estirpe atenuada de "Frant N° 2" en circunstancias independientes y no relacionadas con el aislamiento de la estirpe de Frant descrita anteriormente. Cada ave recibió 500 pfu del virus de "Frant N° 2" y se utilizó como riesgo por contacto para aves susceptibles de contrastación (Grupo 2) y un tercer grupo vacunado con 1.000 pfu por ave de la estirpe atenuada de Frant. Se tomaron muestras de sangre de las aves a intervalos y se experimentó en sus sueros para hallar la presencia de an

373631



- ticuerpos a la vacuna y a los virus "Frant Nº 2". Al ca
bo de ocho semanas de haber comenzado el experimento,
solamente dos de las aves vacunadas tenía anticuerpos
a los virus de la enfermedad aguda, mientras que ocho
5. de las once aves de contrastación tenían dicho anticuer
po. El experimento demostró también que las estirpes
atenuadas se propagarían libremente a cualquiera de los
contactos, según cabría esperar que ocurriera en granjas.

Pruebas de Idoneidad para utilización como Vacuna:

10. Se experimentaron migraciones de la estirpe de
Frant para hallar micoplasma y se descubrió que se encon
traban libres de dicha contaminación. Entonces se reali
zaron experimentos en granja con una vacuna que contenía
estirpe atenuada de Frant en forma asociada con células
15. fibroblásticas de embrión de pollo, incluyendo varios mi
les de aves. La vacuna (0,2 cc, 10^0 pfu) se inyectó por
vía intramuscular en las patas de las aves. En cada ca
so se inoculó la mitad de la bandada con 1.000 pfu por
vía intramuscular. Siempre que se presentó incidencia
20. de la enfermedad de Marek en aves sin inocular de la ban
dada, aquellas que habían recibido la vacuna permanecie
ron inafectadas.

Ejemplo 3

Experimento con la estirpe HPRS 16:

25. Esta estirpe, al cabo de 15 migraciones según el
Ejemplo 1, se sometió a migración 12 veces más en célu
las de riñón de pollo, en Medio Nº 1; 12 veces en célu
las fibroblásticas de embrión de pollo en Medio Nº 3, y
12 veces en células fibroblásticas de embrión de pato en
30. Medio Nº 3. La estirpe se experimentó entonces en pollos

373631



5. "Sykes Línea 50" de un día de edad, que se inocularon con 10^3 pfu de la estirpe y después se tuvieron clínicamente en observación durante seis meses. No aparecieron síntomas y hubo una ausencia completa de lesiones cuando se sometieron todas las aves a un examen postmortem.

Ejemplo 4

Experimentos con la estirpe "Frant No. 2":

10. Esta estirpe altamente patógena, llamada estirpe "Frant N° 2", se adaptó primeramente a las células de riñón de pollo mediante tres migraciones en cultivos en Medio N° 3, y se atenuaron mediante 15 migraciones adicionales en cultivos primarios de fibroblasto de embrión de pollo empleando Medios N° 2 y 3. La estirpe demostró haber perdido completamente su antígeno "A", y era apatógena, inmunogénica y su uso ofrecía seguridad en vacunas
15. según los experimentos o pruebas ya descritos.

Ejemplo 5

20. Se atenuó el virus de estirpe JM de la enfermedad de Marek por migraciones en células de riñón de pollo (3 migraciones empleando Medio N° 1) seguido de migraciones en fibroblastos de embrión de pato (3 migraciones) empleando Medio N° 3. Finalmente la estirpe fué sometida de 15 a 18 migraciones en fibroblastos de embrión de pollo empleando Medio N° 2. La estirpe atenuada así obtenida se hallaba libre de antígeno "A" y tenía una gran pureza. Los agentes de leucosis y otras materias contaminantes a aves presentes en los riñones de pollos se eliminan por selección en procesos subsiguientes de migración en las células fibroblásticas de pato y pollo.
25. La estirpe se experimentó según los procedimientos expues
- 30.

373631



tos en el Ejemplo 2 y demostró ser altamente satisfactoria como vacuna.

Ejemplo 6

5. Se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 5 empleando estirpes GA, CAL-1 y CONN-A separadamente para producir virus atenuados. Cada virus atenuado se elaboró en forma de vacuna.

Ejemplo 7

10. Este ejemplo describe los resultados obtenidos con experimentaciones a gran escala utilizando la vacuna preparada según se ha descrito en el Ejemplo 1.

15. Se vacunaron pollos de un día de edad y de tres semanas de edad por vía intraabdominal (intraperitoneal) con una sola dosis de la vacuna preparada a partir de estirpe atenuada de HPRS 16. Cada pollo recibió una dosis del orden de 0,2 a 1,0 cc, de la vacuna. Los pollos se mantuvieron en condiciones normales de una granja durante un periodo de 235 días. La incidencia de la enfermedad de Maret y otras enfermedades no especificadas, particularmente coccidiosis, en los pollos vacunados y en grupos de contrastación no vacunados se expone en las tablas que siguen:

<u>1er Experimento</u>	<u>Un día de edad</u>	<u>3 semanas de edad</u>	<u>Sin vacunar</u>
Número total	1.000	1.000	2.000
Mortalidad total	5 0,05 %	8 0,08 %	42 2,1 %
Mortalidad por enfermedad de Maret	0 0 %	0 0 %	17 0,85 %
Mortalidad por enfermedad no especificada	5 0,05 %	8 0,08 %	25 1,25 %

373631



<u>2º Experimento</u>	<u>Un día de edad</u>	<u>3 semanas de edad</u>	<u>Sin vacunar</u>
Número total	1.250	1.250	2.500
Mortalidad total	18 1,44 %	19 1,52 %	67 2,68 %
Mortalidad por enfermedad de Maret	1 0,08 %	1 0,08 %	7 0,28 %
Mortalidad por enfermedad no especificada	17 1,36 %	18 1,44 %	60 2,4 %

<u>3er Experimento</u>		<u>Sin vacunar</u>
Número total	879	2.700
Mortalidad total	29 3,24 %	443 16,4 %
Mortalidad por enfermedad de Maret	9 1,03 %	115 4,3 %
Mortalidad por enfermedad no especificada	20 2,21 %	328 12,1 %

<u>4º Experimento</u>		<u>Sin vacunar</u>
Número total	900	6.100
Mortalidad total	36 4 %	1.789 29,3 %
Mortalidad por enfermedad de Maret	12 1,33 %	1.076 17,6 %
Mortalidad por enfermedad no especificada	24 2,67 %	713 11,7 %

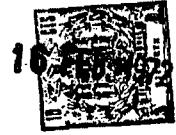
- N O T A -

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 corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Inglaterra, con fecha 18 de noviembre de 1968, bajo el número 54717/68, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Conve-

5.

10.

373631



nios 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, sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA VACUNA ACTIVA CONTRA LA ENFERMEDAD DE MARET; caracterizándose por lo siguiente:

5.

1ª.- Procedimiento para la obtención de una vacuna activa contra la enfermedad de Maret, caracterizado porque, después de la atenuación de virus vivos de la enfermedad de Maret en células aviares, el virus atenuado se formula como un componente antígeno de la vacuna.

10.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el virus atenuado se encuentra virtualmente exento de antígeno A.

15.

3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la atenuación del virus se efectúa en células de pollos o patos, especialmente células del riñón o fibroblastos.

20.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la atenuación se efectúa haciendo migrar primero el virus en células de riñón embionarias de polluelos y después en fibroblastos embrionarios de polluelos o fibroblastos embrionarios de pato.

25.

5ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el número total de migraciones entre la cepa original y la cepa de la vacuna del virus es por lo menos de 20, preferiblemente por lo menos de 25.

30.

6ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cepa de vi

373631



rus es la cepa NPREC. 16.

7^a.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se utiliza virus asociado con células aviares.

5. 8^a.- Procedimiento para la obtención de una vacuna activa contra la enfermedad de Marek, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 27 hojas escritas a máquina por una sola cara.

10.

Madrid

16 FEB. 1972

NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION

J. GOMEZ ACEBO Y MODRY
Firmado: F. Hernández Ruiz