

P.- 45.293

Hoe 69/B 015

SEC. DE ECONOMIA
CLASIFICACION C
CLASE 012 AGI
SUBCLASE k k

382146

24 JUL 1970



Memoria descriptiva

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad ~~de nacionalidad~~ alemana

con domicilio en Marburg/Lahn, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA VACUNA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA", (Clase Intern. Cl2k)

20-7-70

- 1 -

382146

24 JUL



El objeto del invento es un procedimiento para la preparación de una vacuna contra la fiebre aftosa.

Ya son conocidos procedimientos para la preparación de vacunas con virus inactivado de fiebre aftosa. En estos procedimientos se lleva a multiplicación el virus sobre la mucosa lingual de animales de ganado vacuno vivos (O. Waldmann, G. Pyl, K.O. Hobohm y H. Moehlmann, Zbl. Bakt. I, Orig. 148, 1, 1941), sobre mucosa lingual de ganado vacuno aislada in vitro (H.S. Frenkel, Bull. Off. Int. Epiz. 28, 155. 1947 y 39, 91 (1953), en cultivos celulares primarios de una única capa de riñones de terneros (B. Ubertini, B.L. Nardelli, A. Dal Prato, G. Panina y G. Santero (1963), Zbl. Vet. Med. 93-101) y en cultivos celulares de una única capa y en suspensión de riñón de cría de hamster (Macpherson y Stoker, Virology 16, 147, 1962). Las vacunas así obtenidas son apropiadas para inmunizar contra la fiebre aftosa a animales ungulados, tales como animales de ganado vacuno, de ganado porcino, corderos y cabras.

El cultivo del virus natural de fiebre aftosa (procedimiento de Waldmann) sobre la mucosa lingual de animales de ganado vacuno vivos presupone sin embargo el suministro de un gran número de animales de ganado vacuno sensibles a la fiebre aftosa, y en la mayor parte de los países del mundo productores de vacunas contra la fiebre aftosa está prohibido por razones de vigilancia de epidemias, dado que mediante la obtención natural del virus en los centros para obtención de virus creados para ello existe un peligro permanente de propagación de -



la epidemia. El cultivo de virus de fiebre aftosa según el procedimiento de Trenkel, a causa de la necesidad de la continua preparación de cantidades suficientes de mucosa lingual aislada de ganado vacuno recientemente sacrificado, tropieza en muchos lugares con considerables dificultades. El cultivo de virus de fiebre aftosa en cultivos de tejidos, especialmente sobre los denominados cultivos de una única capa es muy costoso y largo para la producción a gran escala. Finalmente, las vacunas de fiebre aftosa a base de virus de fiebre aftosa, que habían sido cultivados sobre líneas de células heterólogas, por ejemplo sobre la línea de células de riñón de cría de hamster, albergan en sí mismas el peligro de provocar síntomas alérgicos en los vacunados en el caso de vacunaciones repetidas e incluso en el caso de primeras vacunaciones.

Se ha encontrado ahora un procedimiento para la preparación de una vacuna contra la fiebre aftosa por cultivo de virus de fiebre aftosa, el cual está caracterizado porque se inicia la digestión enzimáticamente en estómagos de rumiantes limpios, se suspende el tejido digerido, en esta suspensión se multiplica el virus de fiebre aftosa, se adsorbe sobre hidróxido de aluminio y se inactiva de manera de por sí conocida; o en primer lugar se inactiva y a continuación se mezcla con un agente coadyuvante.

El procedimiento de acuerdo con el invento es apropiado para el cultivo en gran escala de virus de fiebre aftosa y para la producción en gran escala de vacunas contra la fiebre aftosa. Es sencillo y barato, y

382146



las materias primas están disponibles casi ilimitadamente. El virus de fiebre aftosa es cultivado sobre tejido homólogo en el procedimiento de acuerdo con el invento. La vacuna preparada a partir de éste no provoca ningún -
5 síntoma alérgico. Es eficaz, estable y bien tolerable o compatible.

Para la realización del procedimiento de -
acuerdo con el invento se parte de estómagos de rumiantes. Tal como es sabido, los estómagos de los rumiantes
10 son compuestos. Sus componentes más importantes son panza, redecilla, libro y cuajar. En el procedimiento de a acuerdo con el invento se utilizan convenientemente estómagos de animales de ganado vacuno, especialmente panzas y libros.

15 En una forma de realización preferida del -
procedimiento de acuerdo con el invento, los estómagos, después de la retirada desde el animal sacrificado, son lavados en frío, se retiran las columnas o pilares de la panza, las hojas del libro y las partes libres de vello-
20 sidad del fondo del estómago - en total estas partes pesan aproximadamente 1 a 1,5 kg según el tamaño del animal de ganado vacuno, - y se liberan de capas adiposas adherentes. Después del lavado y del cepillado en agua tibia y a continuación en etanol al 70%, los trozos de tejido
25 son recogidos en una solución salina isotónica que contiene un antibiótico (solución de lavado con antibiótico), y son desmenuzados, por ejemplo mediante una máquina picadora de carne, que tiene un tamaño de orificios de
6 a 10 mm.

30 Como solución salina isotónica que contie-



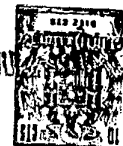
ne antibióticos, (solución de lavado con antibióticos) se utiliza ventajosamente una solución fisiológica de sal común, que contiene en cada litro 300 mg de estreptomycin y 210 mg de penicilina y cuyo valor de pH ha sido ajustado a 7,4. En lugar de estreptomycin y penicilina se pueden utilizar también otros antibióticos, tales como cloranfenicol.

La papilla de tejido es lavada con frecuencia con solución fisiológica de sal común hasta que los líquidos de lavado salientes están sólo débilmente enturbados, y a continuación de esto es digerida con una solución filtrada de modo estéril de un fermento proteolítico, preferiblemente una solución de tripsina a 28-40°C, preferiblemente a 37°C. Convenientemente se utilizan 0,1 a 0,5, preferiblemente 0,25% de tripsina en una solución fisiológica tamponada de sal común. Por 200 g de papilla de tejido se utilizan aproximadamente 500 ml de esta solución de tripsina. La duración de la acción de la tripsina asciende a aproximadamente 20-100, preferiblemente 60-90 minutos. La acción de la tripsina es interrumpida mediante suero de ganado vacuno u otro inhibidor de tripsina, tal como inhibidor pulmonar, inhibidor de haba de soja o ovomucoide (inhibidor de tripsina a partir de huevos de gallina). Si se utiliza suero de ganado vacuno, hay que cuidar de que el suero proceda de animales de ganado vacuno, que no hayan sido vacunados ya contra la fiebre aftosa. La tripsina puede ser eliminada por lavado desde la papilla de tejido también con solución fisiológica de sal común.

Después del tratamiento con tripsina, la pa

382146

24 JU



pilla de tejido es dejada libre de gérmenes por tratamiento durante 2 horas con solución de esterilización con antibiótico. Después del tratamiento con la solución de esterilización con antibióticos se decanta cuidadosamente la porción sobrenadante. Esta medida y todas las posteriores etapas de procedimiento se llevan a cabo bajo condiciones estrictamente estériles. Después de esto se lava la papilla de tejido con medio de Patty, y se introduce bajo condiciones estériles en un recipiente susceptible de ser cerrado, provisto con un agitador, y dentro de éste se inocular con una décima parte de su volumen de una suspensión de virus de fiebre aftosa.

La solución de esterilización con antibiótico contiene por ejemplo 750 mg de estreptomina, 1320 mg de penicilina y 310 mg de nistatina así como 9,6 g de hidrogenofosfato disódico por litro, pero la composición puede variar dentro de amplios límites. El valor de pH de dicha solución es de 7,8 . Por 200 g de papilla de tejido se consumen aproximadamente 600 ml de la solución de esterilización con antibiótico.

En calidad de virus de fiebre aftosa, con los cuales se puede llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con el invento, entran en consideración todos los tipos de virus habituales, por ejemplo los tipos de virus europeos O, A y C, los tipos de virus suramericanos O, A y C, los tipos africanos SAT 1, 2 y 3, así como los tipos asiáticos, por ejemplo Asia 1.

A continuación la carga de cultivo es llevada a aproximadamente 5 veces su volumen con medio de Patty modificado, es ajustado a pH 7,6-7,8 con solución al 10% de bi



carbonato de sodio, y la suspensión obtenida es agitada a 37°C y 60 vueltas/minuto. Al mismo tiempo, se introduce una mezcla filtrada de modo estéril de 95 partes de oxígeno y 5 partes de dióxido de carbono, y la carga de cultivo es saturada continuamente con oxígeno y dióxido de carbono. El medio de Patty (Am. J. Vet. Res. 21, 144 (1960)) corresponde a la solución salina equilibrada de Hanks - (Hanks and Wallace, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196 (1949)), la cual de acuerdo con Patty tiene además 10% de suero de ganado vacuno, 0,06 mg de penicilina/ml y 0,1 mg de sulfato de dihidroestreptomicina/ml. Para el procedimiento de acuerdo con el invento se aumentó el contenido de antibióticos a saber el de penicilina a 0,460 mg/ml y el de sulfato de dihidroestreptomicina a 0,3 mg/ml.

12 horas después del comienzo del cultivo y posteriormente a intervalos de 6 horas, se añaden por 1 litro de la suspensión aproximadamente 20 ml de una solución de cultivo con antibióticos. Se obtiene la solución de cultivo con antibióticos, por ejemplo, disolviendo 7,5 g de base de estreptomicina y 12 g de penicilina en medio para virus VM-3, al que se ha añadido 0,18% de glucosa. El medio para virus VM-3 tiene la siguiente composición:

8,00 g de cloruro de sodio/litro
0,30 g de cloruro de potasio/litro
0,18 g de cloruro de calcio/litro
0,09 g de cloruro de magnesio/litro
2,00 g de bicarbonato de sodio/litro

(Schwöbel y Siedentopf, Zbl. Bakt. I 181,

382146

24 JUL



3 (1961)).

Esta solución es completada hasta 1000 ml con solución de VM-3 que contiene 0,18% de glucosa, y es ajustada a pH 7,9-8,0 con una solución tampón.

5 Para la solución de cultivo con antibióticos se puede escoger también la siguiente composición:

7,5 g de base de estreptomicina/litro

12,0 g de penicilina/litro

9,6 g de hidrógenofosfato disódico/litro

10 Esta solución es ajustada a pH 7,9.

El valor del pH de la carga de cultivo es controlado de modo continuo y - cuando es necesario es regulado posteriormente a pH 7,6 hasta 7,8 por adición de solución al 10% de bicarbonato de sodio.

15 Después de 25 hasta 40 horas se hace cesar el cultivo de virus y se enfría la suspensión a 4°C. Con el fin de destruir las células y de obtener los virus que se encuentran en las células, se trata la carga con un vibrador mezclador. A continuación se centrifuga la suspensión de virus durante aproximadamente 10 minutos a 3000 vueltas/

20 minuto. La porción sobrenadante turbia es mezclada con 0,2-2% de cloroformo y es agitada vigorosamente bajo enfriamiento durante 10 minutos. Después de nueva centrifugación durante 10 minutos a 3000 vueltas/ minuto se obtiene un extracto casi transparente, que puede ser utilizado como antígeno para la preparación de vacunas de fiebre aftosa.

El contenido de virus del extracto obtenido es determinado con ratones. Grupos de 20 ratones de 5 a

30 7 días de edad aproximadamente reciben, en narcosis con



éter, cada uno 0,10 ml de las diluciones de virus 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} , inyectadas intraperitonealmente. La duración del ensayo es de 7 días. No se cuentan los casos de muerte antes del quinto día, ya que el tiempo de incubación es al menos de 5 días. Para las diversas diluciones se determina el punto final de 50% de acuerdo con Reed y Munch (Amer. J. Hyg. 27, 493 (1938)). La concentración de virus está dada en DL_{50} de ratón/ml, es decir la cantidad de virus que mata el 50% de los ratones.

La suspensión que contiene virus es mezclada, para la preparación de vacunas, bien con hidróxido de aluminio bien con fosfato de aluminio de pH 7,7 hasta 8,3, ascendiendo el contenido de hidróxido de aluminio o el de fosfato de aluminio a 0,1 hasta 3,0%, preferiblemente a 0,4 hasta 1,0%, y es inactivada de manera conocida, por ejemplo con formaldehído o con beta-propiolactona - convenientemente en presencia de 0,1 hasta 3,5%. preferiblemente 3% de saponina - o es inactivada mediante uno de estos métodos y a continuación es tratada con un agente coadyuvante para formar una suspensión de agua en aceite. Para esto son apropiadas, por ejemplo, en calidad de componente oleoso, vaselinas líquidas purificadas y en calidad de agente favorecedor de la emulsión sesquioleato de sorbitano o monooleato de polioxietilensorbitano. La vacuna acabada es ensayada en cuanto a la inocuidad, a la eficacia y a la estabilidad.

Inocuidad:

Para el ensayo en cuanto a la inocuidad se inyecta subcutáneamente en una cantidad de 0,1 ml, a 100 ratones, una vacuna preparada de acuerdo con el invento. Los

382146

24



animales son observados durante un intervalo de tiempo de 14 días. La vacuna es considerada como inocua cuando los animales, en el espacio del tiempo de observación, no muestran ningún síntoma de enfermedad.

5 Eficacia:

La eficacia de la vacuna de fiebre aftosa preparada de acuerdo con el invento es ensayada con animales de ganado vacuno de 1 año. Estos reciben 5,0 ml de los productos del procedimiento subcutáneamente y son infectados 10 21 días después de la vacunación cada vez con 10^4 DL₅₀ de ratón/ml de los correspondientes tipos de virus en la mucosa lingual. Al mismo tiempo, se infectaron del mismo modo también animales testigos. Se mostró que las vacunas de acuerdo con el invento protegían a los animales de ganado 15 vacuno contra una enfermedad de fiebre aftosa generalizada. Los animales testigo no vacunados, por el contrario, enfermaron de modo generalizado de fiebre aftosa.

Estabilidad:

Las vacunas preparadas de acuerdo con el invento 20 fueron almacenadas durante un año a 4-6°C. Después de este tiempo permanecían todavía enteramente eficaces.

Ejemplo 1

200 g de material de panza limpio (tejido y columnas-global) es recogida en solución salina isotónica que contiene un antibiótico (solución de lavado con antibiótico) y es desmenuzada en la máquina picadora de carne. La papilla de tejido obtenida es lavada con solu-

382146

24 JUL



384170

ción fisiológica de sal común. Después de esto se añaden
a la papilla de tejido 500 ml de una solución de tripsina
al 0,25% de pH 7,9 y se mantiene el conjunto durante 60
5 minutos a 37°C. Después se hace cesar la acción de la trip-
sina mediante 20 ml de suero de ganado vacuno natural. A
continuación la carga de ensayo es inoculada con 50 ml de
una suspensión del virus de fiebre aftosa suramericana ti-
po 0, cuya concentración de virus es de 10^{-7} DL₅₀ de ra-
tón/ml, y la carga total es completada a 1000 ml con medio
10 modificado de Patty. Con 20 ml de solución al 10% de bicar-
bonato de sodio se ajusta el valor del pH a 7,6 y se agi-
ta la suspensión obtenida a 37°C y 60 vueltas/minuto. El
valor de pH de 7,6 es controlado de modo continuo y, - cuan-
do es necesario - es corregido. Después de 12 horas, y lue-
15 go continuamente después de 6 horas, se añade solución de
cultivo con antibiótico.

Después de 30 horas de incubación se interrum-
pe el cultivo del virus y se enfría la carga a 4°C.

Para facilitar la extracción del virus, las
20 células son desmenuzadas por tratamiento con un vibromezcla-
dor y la suspensión de virus obtenida es centrifugada du-
rante 10 minutos a 3000 vueltas/minuto. La porción sobrena-
dante es agitada vigorosamente después de esto con 1% de
cloroformo durante 10 minutos, bajo enfriamiento, y es cen-
25 trifugada nuevamente durante 10 minutos a 3000 vueltas/mi-
nuto.

720 ml de la suspensión de virus obtenida,
cuya concentración de virus asciende a $10^{-7,3}$ de DL₅₀ de ra-
tón/ml, son mezclados con 230 ml de una suspensión al 2%
30 de hidróxido de aluminio, y además con 30 ml de una solu-

382146

382146

24



ción al 10% de saponina, 10 ml de tampón de glicocola de
pH 9,2 y 10 ml de una solución al 5% de formaldehído, y
son inactivados durante 96 horas a 26°C. En total a par-
tir de 200 g de material de partida se obtuvieron 1000 ml
5 de vacuna contra la fiebre aftosa. Esta vacuna fue ensaya-
da con crías de ratón de 5 a 7 días de edad. Se mostró co-
mo inocua.

Ejemplo 2

De acuerdo con el Ejemplo 1 se prepara una
10 suspensión de tejido a partir de material de panza y se
inocula con el virus de fiebre aftosa suramericano tipo
A (Concentración de virus $10^{-7,6}$ DL₅₀ de ratón/ml). El
cultivo del virus fue interrumpido después de 36 horas. La
concentración de virus de esta carga era de $10^{-7,3}$ DL₅₀ de
15 ratón/ml. La cosecha del virus y la preparación del virus
se llevaron a cabo de acuerdo con el Ejemplo 1. También es
ta vacuna se mostró como inocua en el ensayo en crías de
ratón.

Ejemplo 3

20 De acuerdo con el Ejemplo 1 se descompone te-
jido de panza con 0,25% de tripsina, se hace cesar la ac-
ción de la tripsina mediante 20 ml de suero de ganado va-
cuno y se inocula con el virus de fiebre aftosa suramerica
no tipo C (concentración de virus $10^{-7,2}$ DL₅₀ de ratón/
25 ml). Después de 32 horas de duración del cultivo, el virus
es cosechado (concentración de virus $10^{-6,8}$ DL₅₀ de ratón/



ml) y a partir de esto se prepara una vacuna de acuerdo con el Ejemplo 1. En el ensayo en crías de ratón esta vacuna era inocua.

Ejemplo 4

5 A partir de partes iguales de las vacunas mono-
novalentes obtenidas según los Ejemplos 1, 2 y 3 se produ-
ce por mezcla una vacuna trivalente contra los tipos O, A
y C y se ensaya en cuanto a la eficacia con 12 animales de
ganado vacuno de 1 año de edad en una dosis de 5,0 ml (sub-
10 cutáneamente). 21 días después de la vacunación se infec-
tan en la mucosa lingual, cada vez, 4 animales de ganado
vacuno jóvenes con el tipo de virus O₁, 4 animales de ga-
nado vacuno jóvenes con el tipo de virus A₂₄ y 4 animales
de ganado vacuno jóvenes con el tipo de virus C, a saber
15 cada vez con 10⁴ DL₅₀ de ratón/ml de los correspondientes
tipos de virus. Los animales vacunados eran inmunes contra
los tres tipos de virus, los animales testigo, también so-
metidos a una infección de carga o en blanco, enfermaron
por el contrario siempre de modo generalizado de fiebre -
20 aftosa del tipo con el que habían sido infectados. La va-
cuna preparada de acuerdo con el invento se mostró por con-
siguiente como enteramente eficaz.

La presente solicitud que corresponde a la
presentada en la República Federal Alemana, el 25 de Julio
25 de 1.969, bajo el número P 19 37 760.7, se acoge a los be-
neficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propie

24 JUL



dad Industrial.

REIVINDICACIONES

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 para la preparación de una vacuna contra la fiebre aftosa por cultivo de virus de fiebre aftosa, caracterizado porque se inicia la descomposición enzimáticamente en estómagos de rumiantes, se suspende el tejido descompuesto, se multiplica el virus de fiebre aftosa en esta suspensión, se adsorbe sobre hidróxido de aluminio y se inactiva de manera de por sí conocida; o en primer lugar se inactiva y a continuación se mezcla con un agente coadyuvante.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se utilizan panzas y libros de animales de ganado vacuno.

3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque para la digestión enzimática del material de tejido se utiliza tripsina.

4.- Procedimiento para la preparación de una

Handwritten signature and date: 20-7-70

20-7-70

24



vacuna contra la fiebre aftosa.

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

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

24 JUL 1970

Madrid,

P.A.

Alberto *Arta*
Por Poder

20-7-70

PBG.