

414982



414982

P.- 54.296

Hop 72/B008

F. E. 5-6-75

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl.: C12K; A61K

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en Marburg/Lahn, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA VACUNA COM-
PATIBLE POR VIA INTRAVENOSA CONTRA MOQUILLO Y HEPA-
TITIS CONTAGIOSA CANIS" (Clase Internacional C12k, A61k)

25.4.73

- 1 -

414982



Objeto del invento son una vacuna contra el moquillo y la Hepatitis contagiosa canis, su preparación y su utilización para la inmunización de perros.

5 El moquillo es una enfermedad infecciosa febril, peligrosa y muy propagada para el perro, cuyo agente patógeno pertenece al grupo de los mixovirus. Dependiendo de la forma de evolución, el moquillo conduce a síntomas de enfermedad catarrales, respiratorios, pulmonares, intestinales o nerviosos. Un peligro de infección especial
10 existe para los perros jóvenes y para animales viejos no protegidos, cuando se les reúne con perros enfermos o infectados, por ejemplo en los locales del vendedor, en comercios zoológicos, clínicas, etc.

15 La hepatitis canina, también denominada Hepatitis contagiosa canis (H.c.c.), es, lo mismo que el moquillo, una enfermedad viral muy propagada, que está acompañada con inflamación hepática y formación de edema y que para los perros jóvenes tiene un desenlace mortal la mayor parte de las veces.

20 Ya se han conocido vacunas combinadas eficaces contra el moquillo y la hepatitis, que se han acreditado también en la práctica. No obstante, dado que contienen coadyuvantes tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, éstas sólo pueden ser administradas por vía
25 subcutánea. En el caso de vacunación subcutánea, no obs-

414982



tante, una inmunidad activa se establece totalmente en ge
neral sólo después de 14 días tras la administración de
la vacuna.

5 Debido al tráfico canino acrecentado en el co-
mercio de perros, en la expedición de perros, en comer-
cios zoológicos, en exposiciones y en clínicas, aumentan
cada vez más las posibilidades de infección debidas a es
tos contactos. Por lo tanto, la vacunación normal, que
sólo conduce a una protección suficiente después de alre
10 dedor de 14 días, no es bastante para proteger contra una
infección en el momento de efectuarse la vacunación o po
co después de ella.

15 Por lo tanto existe una urgente necesidad de
una vacuna que garantice una protección contra infeccio-
nes ya con mayor prontitud, convenientemente inmediatamen
te después de la administración.

20 Se ha encontrado ahora una vacuna que es com-
patible por vía intravenosa contra el moquillo y la He-
patitis contagiosa canis, que contiene virus atenuados
de moquillo y virus inactivados de Hepatitis contagiosa
canis, y está caracterizada por estar libre de coadyuvan
tes. Objeto de la solicitud es además la preparación de
una vacuna combinada compatible por vía intravenosa con
tra el moquillo y la Hepatitis contagiosa canis, y la
25 utilización de la misma para la inmunización de perros.

414982

21



La vacuna combinada de acuerdo con el invento
comunica una protección de efecto inmediato contra las
dos enfermedades. Este efecto protector que se estable-
ce inmediatamente se convierte ya después de corto tiem-
5 po en una inmunidad activa duradera. Ya tres días des-
pués de la administración por vía intravenosa se pueden
detectar anticuerpos de H.c.c. Al mismo tiempo se esta-
blece la inmunidad activa contra el moquillo, a saber
sin quedar afectada por los procesos que se provocan por
10 los virus inactivados de H.c.c.

Se ha manifestado que virus de gran pureza ejer-
cen un efecto de interferencia y bloquean las células
susceptibles a la infección con virus patógenos. Median-
te cultivo en un tejido homólogo de cultivo se obtienen
15 virus de gran pureza, que son especialmente apropiados
para la administración por vía intravenosa y son bien com-
patibles.

Los virus del moquillo y virus de H.c.c. son
reproducidos de modo conocido, preferiblemente sobre te-
20 jido homólogo, por ejemplo de acuerdo con la memoria de
patente alemana 1.138.888 o de acuerdo con DULBECCO y
VOGT, J. exp. Med. 99, 167 (1954). Los virus de moquillo
obtenidos son combinados con virus inactivados de hepati-
tis, pudiendo procederse por ejemplo de acuerdo con la
25 memoria de patente alemana 1.076.892. Con el fin de ele-



var la concentración de virus puede concentrarse la suspensión de virus mediante ultrafiltración y dejarse libre de células mediante filtración.

Ejemplo.

5 De un riñón de perro recientemente extraído se recupera en condiciones lo más estériles que sean posibles la zona cortical renal. Esta es recogida en una cubeta de Petri y desmenuzada a trocitos de un tamaño de 4 a 5 mm. Estos trocitos de tejido son lavados con una solución
10 tampón de fosfato (pH 7,5) de acuerdo con R. Dulbecco y M. Vogt (J. of Exp. Med. 99, página 167, 1954). A continuación de ello se efectúa la tripsinización de los trocitos de región cortical renal con una solución al 0,25% de tripsina en baño María a 37°C. Por medio de la tripsi
15 nización se separan células individuales desde los trocitos orgánicos. El sedimento de estas células disueltas es recogido y se interrumpe la tripsinización por enfriamiento a baja temperatura en baño de agua helada. Median
20 te centrifugación primero a 1000 vueltas por minuto y, después de lavar dos veces con solución de tampón de fosfato (pH 7,5), a 600 vueltas por minuto se eliminan la solución de tripsina y los corpúsculos sanguíneos contenidos en el sedimento. Entonces, 2 ml de células de riñón
25 lavadas son suspendidos en una mezcla de 900 ml de medio de cultivo que consta de solución de Eagle con un conte

414982



nido de 0,5% de producto hidrolizado de lactoalbúmina y 100 ml de suero de ternero. A 100 ml de esta suspensión de células se añade una mezcla de antibióticos que consiste en 20.000 U.I. de penicilina, 20.000 γ de estreptomina y 20.000 γ de neomicina, y se ajusta un valor de pH de 6,8 con una solución al 2,8% de bicarbonato de sodio, que contiene una adición de 0,002% de radicales fenólicos. Con esta suspensión de células se alimentan recipientes de cultivo estériles, por ejemplo matraces de Fernbach, pequeños matraces de Erlenmeyer o tubitos de Rollrand con aproximadamente 8% de su capacidad volumétrica. Aproximadamente 4 a 6 días después de la carga deben alimentarse por reemplazamiento de la solución nutritiva las células renales que han crecido totalmente junto al musgo epitelial y eventualmente se debe ajustar posteriormente el valor de pH con una solución de bicarbonato de sodio en los días subsiguientes. Tan pronto como se ha estructurado completamente el musgo de células, es inoculado con una suspensión que contiene un virus de H.c.c. cultivado a partir de hígado canino y adaptado por algunas pasadas junto al cultivo de tejidos. En este caso se procede retirando la solución nutritiva consumida y reemplazándola por solución nutritiva de nueva aportación, que es mezclada en la proporción de 1:100 con una suspensión de virus de H.c.c. El medio de cultivo consiste en 750 ml de me-

414982

21



5 dio de Hank, 250 ml de Medio de 199 según J. F. Morton y
R.C. Parker (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. V. 73, página 1,
1950) y una adición de bicarbonato, Rojo de fenol y anti-
bióticos, tal como arriba se indica. El virus de H.c.c.
10 es cosechado por decantación de la suspensión de células
después de alrededor de 6 a 7 días, después de que se ha
establecido un efecto citopatógeno completo y se ha efec-
tuado una separación de las células epiteliales muertas.
El contenido de virus de H.c.c. o el carácter antigéno
10 de la suspensión son comprobados mediante inoculación de
tubitos de cultivo en diferentes diluciones (valoración
de virus) o mediante investigación en la reacción de fi-
jación del complemento (R. F. C.).

15 El virus de H.c.c. obtenido a partir del culti-
vo de tejido posee una concentración de virus de $10^{8,5}$
DI₅₀/ml o una concentración de antígeno de 1:40 medida
en la R.F.C. Para la preparación de la vacuna de acuer-
do con el invento, la suspensión de virus de H.c.c. es
concentrada hasta una concentración cuádruple con ayuda
20 de un ultrafiltro de circulación, bajo enfriamiento con
hielo, de manera que se logra un índice de R.F.C. del
concentrado de 1:160. La suspensión de virus de H.c.c.
recuperada del cultivo de tejido, concentrada mediante
ultrafiltración, es mezclada con 0,1 a 0,2% de una solu-
25 ción al 35% de formaldehído y es inactivada a la tempera

414982



tura ambiente durante una semana. A continuación se determina el contenido de formaldehído libre de la vacuna de H.c.c. de acuerdo con Tannenbaum y se le fija químicamente por adición de una cantidad de 1,5 a 2 veces mayor de la estequiométrica de bisulfito de sodio. La porción de vacuna de H. c. c. así preparada es reunida en fase líquida, bajo enfriamiento con hielo, junto con la porción de vacuna de moquillo, que contiene virus atenuado vivo de moquillo y es producida de acuerdo con la memoria de patente alemana 1.138.185, se carga en frasquitos cada uno de 2 ml, y se seca por congelación.

Ensayo en cuanto a la compatibilidad con perros.

La vacuna preparada de acuerdo con el invento fue investigada en ensayos con animales en cuanto a compatibilidad y a actividad. En total 150 perros de diferentes razas recibieron la vacuna inyectada en la Vena saphe na, brachiocephálica o yugularis. Ni durante la inyección ni inmediatamente después o a continuación de la inyección se observaron ningún tipo de reacciones, tales como perturbaciones en la circulación, reacciones de choque o alergias. La actividad de las vacunas preparadas de acuerdo con el invento fue ensayada en perros y en cobayas.

Ensayos en cobayas.

El cobaya es, según Salenstedt, un animal de ensayo apropiado para el ensayo de antígenos de H.c.c. Tres

414982



grupos, cada uno de 5 cobayas, fueron inoculados compara
tivamente con 3 vacunas diferentes contra el moquillo y
la hepatitis. Para ello se utilizaron una vacuna contra
el moquillo y la hepatitis que contiene del modo usual
5 hidróxido de aluminio (Vacuna número 1), una vacuna de
ensayo que se corresponde en su contenido de antígeno con
la Vacuna número 1 pero no contiene nada de $Al(OH)_3$, Va-
cuna número 2, y la Vacuna número 3 preparada de acuerdo
con el invento. Cuatro semanas después de la vacunación
10 se desangraron los cobayas y se investigaron mezclas de
suero de cada grupo en cuanto a anticuerpos de H.c.c.
en el ensayo de neutralización en el cultivo de tejido.
Las mediciones de anticuerpos se llevaron a cabo según
15 métodos conocidos: (Ackermann, O.: Estudios experimen-
tales comparativos acerca de vacunas contra el moquillo y
la hepatitis viral canina. Small Anim. Pract. 6,171
(1965) y dieron los resultados que se especifican en la
Tabla 1.

25.4.73

414982



Tabla 1.

Examen serológico de la actividad de diferentes vacunas contra el moquillo y la hepatitis en cobayas.

5 Grupo de cobayas	Vacunas utilizadas y modo de administración	Concentración de anticuerpos de H.c.c. DNV/ml.
I	0,5 ml de Vacuna núm. 1, vía subcutánea	179.000
10 II	0,5 ml de Vacuna núm. 2 sin Al(OH) ₃ , por vía intravenosa	29.000
III	0,5 ml de Vacuna número 3, por vía intravenosa	619.000

15

DNV/ml = dosis neutralizadora del virus por ml de suero.

Estos resultados muestran que el contenido acrecentado de antígenos de H.c.c. en la vacuna preparada de acuerdo con el invento hace innecesaria la adición de hidróxido de aluminio y conduce a un buen desarrollo de anticuerpos contra la H.c.c. en el cobaya.

Ensayo en cuanto a la actividad en perros.

Para la comprobación de la seguridad y rapidez del efecto protector de la vacuna preparada de acuerdo

414982

21



con el invento (Vacuna número 3) contra H.c.c. se llevó a cabo un ensayo con 20 cachorros sensibles a la H.c.c., que tenían una edad de 7 a 10 semanas.

5 Los cachorros fueron divididos en 5 grupos cada uno de 4 animales. De modo correspondiente a esta división se llevó a cabo la administración por vía intravenosa de la vacuna preparada de acuerdo con el invento (Vacuna número 3) en los grupos de perros individuales respectivamente 3, 2 y 1 día antes de la infección con virus de H.c.c. patógeno así como de modo simultáneo con
10 dicha infección. El quinto grupo sirvió como testigo. La infección se produjo en todos los perros, incluidos los perros testigo, mediante administración por vía oral de 2 ml de un extracto de virus de H.c.c. infeccioso. Se es
15 cogió este modo de infección con el fin de imitar a las condiciones naturales. El resultado de la infección de carga fue experimentado por investigación clínica y medición de temperatura realizada dos a tres veces por día. En el caso de los perros vacunados e infectados simultáneamente y con una parte de los animales vacunados de
20 uno a dos días antes de la infección apareció una reacción febril de corta duración. No se pudieron comprobar en los perros vacunados síntomas clínicos de otro tipo. Por el contrario, los animales testigo mostraron claros
25 síntomas de enfermedad tales como inapetencia, abatimien

414982

21



to, postración y fiebre que se mantienen durante varios días. Detalles acerca del transcurso del ensayo y de los resultados del mismo pueden observarse en la Tabla 2.

5 En otro ensayo con perros se investigó el desarrollo de anticuerpos después de administración por vía intravenosa de las vacunas preparadas de acuerdo con el invento (Vacuna número 3). En este ensayo, de 11 cachorros de tres camadas se vacunaron 8 y se dejaron 3 como cachorros testigo. De los perros que tenían una edad de 10 y 11 semanas se tomaron antes de la vacunación, 2, 3, 4, 7 y 14 días después de la administración por vía intravenosa de la vacuna preparada de acuerdo con el invento (Vacuna número 3), así como 1 y 2 semanas después de una segunda vacunación, que se efectúa 14 días tras de 15 la primera vacunación, con una vacuna contra moquillo y H.c.c. usual en el comercio, se tomaron muestras de sangre. El suero obtenido a partir de las muestras fue investigado en cuanto a anticuerpos de moquillo y de H.c.c. (de acuerdo con Ackermann, O: Estudios experimentales 20 comparativos acerca de vacunas contra el moquillo y la hepatitis viral canina, Small Anim. Pract. 6, 171 (1965)). El resultado del desarrollo de anticuerpos de H.c.c. está registrado en la Tabla 3, y el desarrollo de anticuerpos de moquillo está registrado en la Tabla 4. Para la 25 mejor visualización, el resultado de ambas Tablas ha si-

414982



do representado gráficamente de nuevo en la figura con
utilización de valores medios. En este caso para la re-
presentación del desarrollo de anticuerpos de H.c.c. se
tomaron en consideración sólo dos cachorros, que en el
5 momento de la vacunación por vía intravenosa eran sensi-
bles al H.c.c., o no poseían ningún anticuerpo maternal.

De los resultados de ensayo se pueden obtener
las siguientes conclusiones finales:

Mientras que en el caso de la administración
10 usual de vacunas por vía subcutánea se encuentran anti-
cuerpos detectables como muy pronto después de una sema-
na, después de la administración de la vacuna preparada
de acuerdo con el invento (Vacuna número 3) sorprenden-
temente ya 3 días después de la vacunación se podían de-
15 tectar anticuerpos de H.c.c. humorales. La H.c.c. posee
normalmente un tiempo de incubación de 3 a 6 días. En el
caso de infección y vacunación intravenosa simultáneas ya
están presentes anticuerpos de H.c.c. humorales antes de
la aparición de los primeros síntomas de enfermedad, de
20 manera que se reprimen una reproducción adicional de vi-
rus patógeno de H.c.c. y la manifestación de la enferme-
dad. Por consiguiente, se sofoca en embrión la infección
de H.c.c. y ya no se manifiesta clínicamente. Si la vacu-
nación se efectúa en un momento anterior a aquel en que
25 se efectúa la infección, este mecanismo de inmunidad es

414982



5 todavía más eficaz; se observó que en dichos casos tampo
co aparecieron reacciones febriles efimeras, que normal-
mente pueden considerarse como expresión de una viremia.
Si en el momento de la vacunación por vía intravenosa
10 existe todavía una buena concentración de anticuerpos ma-
ternales (véanse perros Nº 3.288 hasta 3.291, Tabla 3),
en el caso de utilización de un antígeno inactivado de
H.c.c. se desarrolla una protección activa, que es refor-
zada por una segunda vacunación. Sin vacunación, tal co-
15 mo puede verse en el perro testigo Nº 3.291 no vacunado,
es degradado el anticuerpo maternal. Mediante la rápida
actividad contra el moquillo se llevaron a cabo ya ensa-
yos minuciosos con el antígeno de moquillo vivo conteni-
do en la Vacuna nº 3 (Ackermann, O. (1969). Los cua-
20 dernos azules para el veterinario 40,5), que demuestran
la actividad de este antígeno.

Con la vacuna preparada de acuerdo con el in-
vento (Vacuna nº 3) se desarrolló un agente de vacu-
na que puede ser administrado por vía intravenosa por cau-
20 sa de su composición, y está indicado sobre todo en el ca-
so de peligro acrecentado de infección. Comunica a perros,
en el caso de administración por vía intravenosa, una pro-
tección contra el moquillo y la H.c.c. que se establece
inmediatamente, que se basa en la interferencia o el blo-
25 queo de las células y en el rápido desarrollo de anticuer-

414982



pos y que se convierte en una inmunidad activa duradera.

Tabla 2.

Examen clínico del efecto protector de la Vacuna número 3 contra moquillo y H.c.c. después de administración por vía intravenosa.

5

10

15

20

25

Perro Nº	Anticuerpos de H.c.c. antes de la vacunación	Momento de la vacunación con Vacuna nº 3 contra moquillo -H.c.c.	Infección de carga	Resultado de la infección de carga
2430	Ninguno	3 días antes	2 ml de virus patógeno de H.c.c. por vía per-oral	s.p. —
2443	"	de la infección		s.p. —
2457	"			s.p. —
2466	"			s.p. —
2431	Ninguno			2 días antes
2444	"	de la infección		s.p. —
2458	"			s.p. ^
2467	"			s.p. ^
2432	Ninguno			1 día antes
2445	"	de la infección		s.p. ^
2459	"			s.p. ^
2468	"			s.p. —
2433	Ninguno			Simultáneamente con la infección
2446	"	s.p. ^		
2460	"	s.p. ^		
2469	"	s.p. ^		
2539	Ninguno	Testigos con infección	e. ^	
2525	"		e. ^	
2526	"		e. ^	
2532	"		e. ^	

414982



s.p. = sin particularidades λ = fiebre efímera
 e. = enfermo de H.c.c. μ = fiebre prolongada
 --- = Transcurso normal de
 temperatura

5

Tabla 3.

Desarrollo de anticuerpos de H.c.c. después de administración por vía intravenosa de Vacuna número 3 contra moquillo y H.c.c.

10

Perro Nº	DNV de H.c.c. antes de la vacu- nación	1ª vacu- nación	Anticuerpos de H.c.c.-DNV/ml		
			2.d.p.v.	3.d.p.v.	4.d.p.v.
3233	0		0	13.000	29.000
3234	0	Vacuna	0	3.000	29.000
3235	0	nº 3 con	0	10.000	62.000
3255	0	tra mo-	0	10.000	62.000
3256	0	quillo y	0	3.000	62.000
3288	215.000	H.c.c.	161.000	100.000	29.000
3289	100.000	i.v.	22.000	18.000	62.000
3290	215.000		100.000	100.000	62.000
3236	0	Testigos	0	0	0
3257	0		0	0	0
3291	133.000		161.000	100.000	62.000

15

20

414982



Tabla 3. (Continuación)

	Anticuerpos de H.c.c. -DNV/ml		2ª Vacu- nación	Anticuerpos de H.c.c. -DNV/ml	
	7 d.p.v.	14 d.p.v.		1 s.p.	2 s.p.
5	100.000	62.000		178.000	100.000
	133.000	29.000		29.000	62.000
	287.000	29.000	Candur	287.000	6.186.000
	133.000	29.000	SH	1.334.000	1.780.000
	13.000	13.000		133.000	288.000
	62.000	13.000	s.c.	287.000	62.000
	62.000	13.000		62.000	133.000
10	62.000	13.000		62.000	133.000
	0	0		0	0
	0	0		0	0
	22.000	0		0	0

15

d.p.v. = días después de primera vacunación

s.p. = semanas después de segunda vacunación

DNV de H.c.c. = Dosis neutralizadora de virus de H.c.c.
por ml de suero

414982



Tabla 4.

Desarrollo de anticuerpos de moquillo después de administración por vía intravenosa de Vacuna número 3 contra moquillo y H.c.c.

Perro Nº	DNV de moquillo antes de la vacu- nación	1ª vacu nación	Anticuerpos de moquillo DNV/ml		
			2 d.p.v.	3 d.p.v.	4 d.p.v.
3233	0	Vacuna nº 3 contra moquillo y H.c.c. i.v.	0	0	0
3234	0		0	0	0
3235	0		0	0	0
3255	0		0	0	0
3256	0		0	0	0
3288	0		0	0	1.000
3289	0		0	0	600
3290	0		0	0	0
3236	0	Testigo	0	0	0
3257	0		0	0	0
3291	0		0	0	0

20

414982



Tabla 4. (Continuación)

	Anticuerpos de moquillo DNV/ml		2ª vacunación	Anticuerpos de moquillo DNV/ml	
	7 d.p.v.	14 d.p.v.		1 s.p.	2 s.p.
5	62.000	3.500.000		7.500.000	>10.000.000
	216.000	1.000.000	Candur	>10.000.000	>10.000.000
	62.000	3.500.000	SH	>10.000.000	>10.000.000
	350.000	6.100.000		>10.000.000	10.000.000
	100.000	10.000.000	s.c.	>10.000.000	10.000.000
	46.000	1.000.000		7.500.000	10.000.000
10	215.000	4.600.000		>10.000.000	>10.000.000
	46.000	350.000		7.500.000	>10.000.000
	0	0		0	0
	0	0		0	0
15	0	0		0	0

Las explicaciones de las abreviaturas véanse en la Tabla 3.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en República Federal Alemana, el 26 de Mayo de 1972, bajo el N° P 22 25 548.7, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

414982^{ED}



5

REIVINDICACIONES

10

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15

1ª.- Procedimiento para la preparación de una vacuna compatible por vía intravenosa contra moquillo y Hepatitis contagiosa canis y que está exenta de coadyuvantes, caracterizado porque se combinan virus atenuados de moquillo y virus inactivados de Hepatitis contagiosa canis, se concentra eventualmente de manera conocida mediante ultrafiltración, y se filtra hasta dejar libre de células.

20

25

2ª.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA VACUNA COMPATIBLE POR VIA INTRAVENOSA CONTRA MOQUILLO Y HEPATITIS CONTAGIOSA CANIS.

30.1.74

- 20 -

M

414982⁻² FEB.



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

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

Madrid, 2 FEB. 1974

P.A.

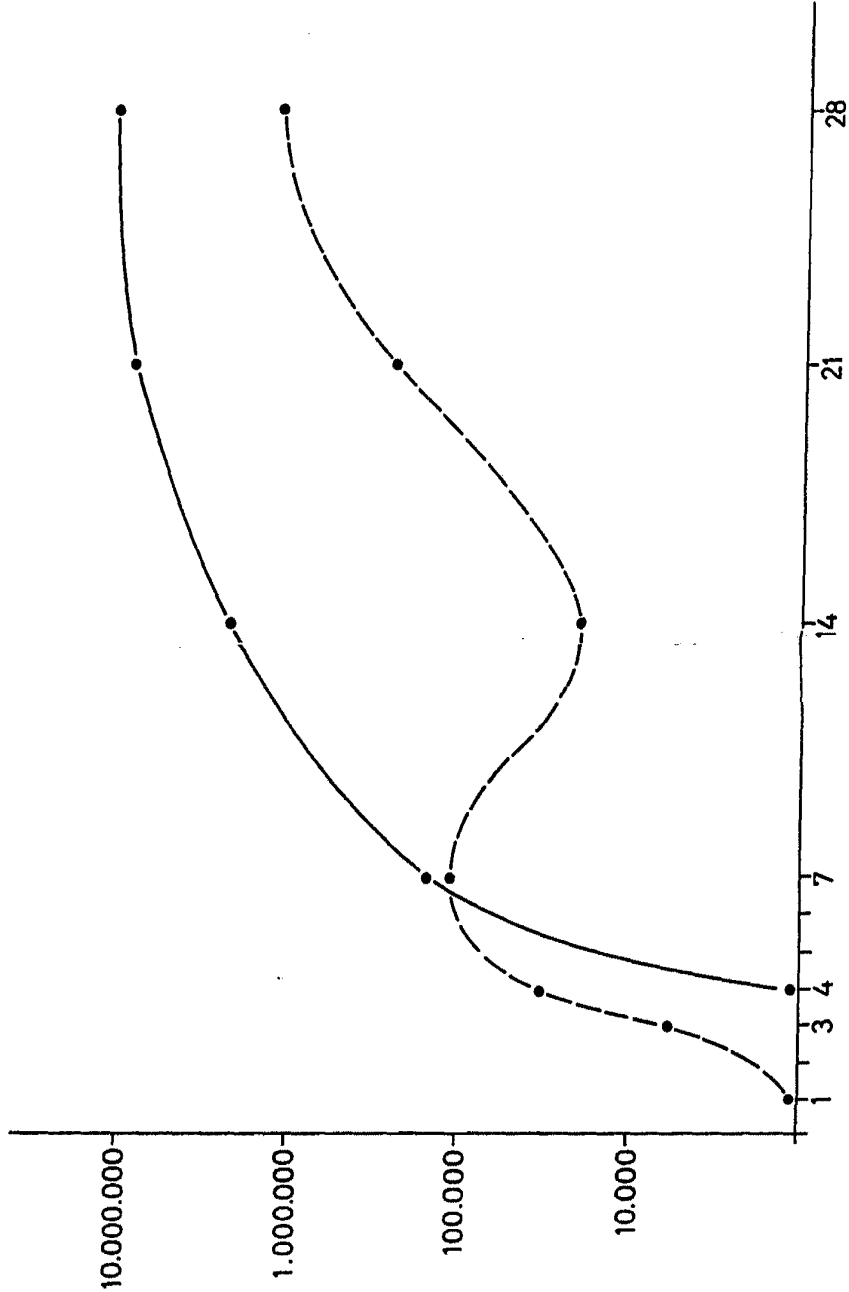
[Handwritten signature]


30.1.74
MCM

[Handwritten mark, possibly 'A']

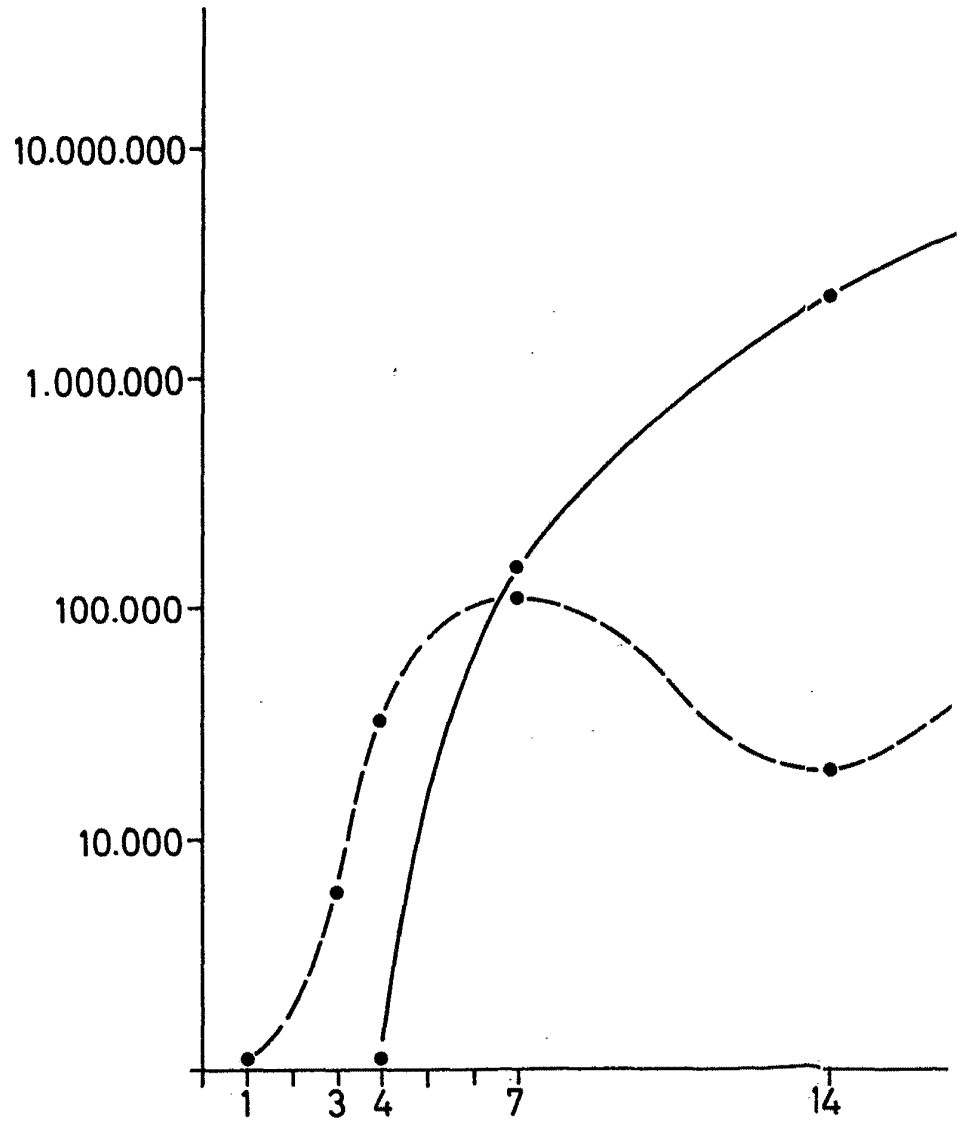
414982

414982

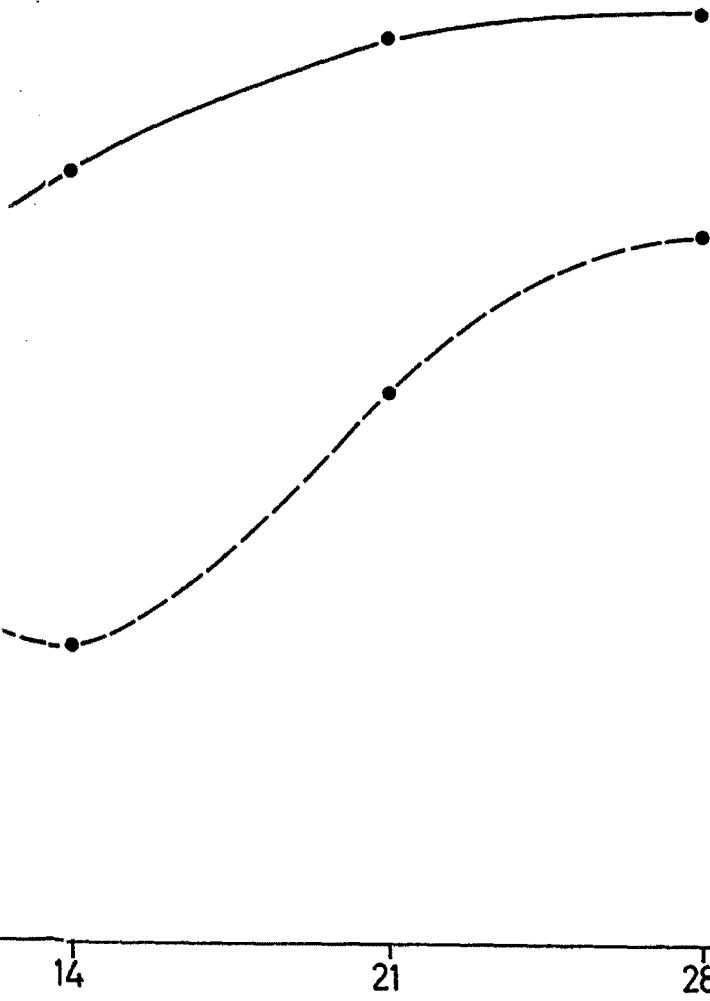



 ALBERTS
 PER. P. 10/1

414982



414992



Alberto de Lisberg
Alberto de Lisberg
For Police