

426.186



PATENTE DE INVENCION  
=====

Le A 14 715-Sp.

## Memoria Descriptiva

sobre:

Procedimiento para la obtención de una vacuna viva contra el virus parainfluenza-3 (virus PI-3).

=====

*Solicitante:*

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad alemana, residente en  
Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana.

Int. Cl. C 12 k
-----------------

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de una nueva vacuna viva para inmunizar las reses contra la infección por el virus -  
5. de parainfluenza-3 (virus PI-3).



El virus de parainfluenza-3 (PI-3), muy propagado en muchos países, ataca preferentemente las terneras y las reses jóvenes. Debido a la difusión y a la alta contagiosidad del agente provocador, casi no es posible mantener alejado el virus PI-3 de las cabañas de reses.

5. En los últimos años se ha comprobado que al presentarse simultáneamente, o mas tarde, una doble infección con clamidios o micoplasmos se provocan enfermedades clínicas muy graves, especialmente en los animales jóvenes de las grandes cabañas de reses. Sin la participación del virus PI-3 las infecciones por clamidios y/o micoplasmos resultan por el contrario relativamente inaparentes.

10. La infección por PI-3 en el ser humano y en el animal se puede diagnosticar, independientemente del aislamiento del virus, mediante la demostración de anticuerpos específicos en el conocido ensayo de inhibición de hemaglutinación (HAH). Aquí la diagnosis depende del nivel del título y del desarrollo del título y exige por lo tanto varias comprobaciones, bajo circunstancias con largas series de dilución de suero obtenidas en distintos tiempos. Como antígeno para el ensayo HAH se emplea el virus PI-3.

15. Las infecciones secundarias que se presentan en relación con una infección de PI-3, implicadas por bacterias, clamidios, micoplasmos y otros agentes provocadores microbiales, se pueden influenciar parcialmente en forma positiva por terapéuticos usuales bacteriostáticos. La infección por el virus mismo, sin embargo, no se puede reducir. En la intensificación creciente de la cabaña de reses es por lo tanto imprescindible una profilaxis de inmunización específica contra -
- 20.
- 25.



la infección por el PI-3.

5. Como sustancias inyectables entran en consideración vacunas muertas o vivas. En la vacuna muerta, el efecto en los terneros jóvenes es dudoso, además, la protección no se mantiene demasiado tiempo, la inmunidad local de las mucosas del tracto respiratorio es relativamente reducida, no se evita una segregación de larga duración en las infecciones puras y representa, por lo tanto, un peligro extraordinariamente grande en el mercado de los animales.

10. Las vacunas vivas producen por el contrario, también en los terneros jóvenes, una protección buena y de larga duración. Además de la inmunidad humoral se produce también en los órganos respiratorios una inmunidad de las mucosas que, debido a la patogénesis de la infección del PI-3, se le adjudica una importancia especial.

15. En las vacunas vivas actualmente en el mercado se trata sin embargo exclusivamente de las así llamadas vacunas atenuadas es decir, las cepas de virus PI-3 patógenas se pasan en cultivos de tejidos adecuados hasta que hayan perdido sus propiedades patógenas originales para el huésped natural. Para ello se necesitan pasadas en serie en una magnitud de aproximadamente 100. En tales vacunas vivas obtenidas a base

20. de virus atenuados no se puede excluir la posibilidad de un aumento de la virulencia en las repetidas pasadas rápidas de animales, especialmente en las reservas acumuladas previstas para vacunas. Otra desventaja de una cepa de virus atenuada consiste en que por el proceso de la atenuación continua no solo se varía la patogenidad sino también la especificidad antigénica. Esto puede tener como consecuencia que la protec

25.



ción de inmunización inducida por los virus de tal manera modificados ya no se desarrolle o solo incompletamente contra los virus patógenos.

Existía una verdadera necesidad de hallar una vacuna que no tuviese las desventajas antes mencionadas de las vacunas muertas y vivas.

5.

Se ha descubierto ahora que, sorprendentemente, la cepa de virus PI-3 aislada del tracto respiratorio de una res, que ha sido depositada en la American Type Culture Collection, era de por sí apatógena y sin ninguna atenuación adicional, es decir, evitándose las desventajas antes mencionadas de una cepa de virus PI-3, atenuada, produce una protección de inmunidad total.

10.

La cepa de virus PI-3 ATCC VR-739, objeto de la presente invención, se aisló como descrito a continuación, se cultivó en cultivos de células y se formuló a una vacuna.

15.

1) Aislamiento de la cepa de virus PI-3 ATCC VR-739

La cepa de virus Parainfluenza-3 ATCC VR-739 se aisló del tracto de respiración de una res con ayuda de la técnica de cultivo de tejidos, empleando células renales de terneras secundarias embrionales en medio según Earle bajo adición de un 0,5% de hidrolizado de lactalbúmina y un 3% de suero de ternera inactivado libre de anticuerpos.

20.

2) Activación de la cepa de virus PI-3 ATCC VR-739

El cultivo de la cepa de virus PI-3 ATCC VR-739 se efectúa, según los procedimientos generalmente usuales y conocidos, sobre cultivos de células primarias, por ejemplo, sobre células de epitelio renales de terneros, células traqueales ó también sobre cultivos de células

25.



permanentes, tal como células de testes de ternero. El medio virulento de las pasadas 1 - 20 se recolecta después de una incubación de 2 a 3 días.

3) Formulación de la vacuna

5. La cepa de virus PI-3 cultivada se emplea directamente como vacuna líquida, o bien después de agregar estabilizadores adecuados, se emplea en una forma secada por congelación según procedimientos usuales. En caso dado se puede mezclar con adyuvantes adecuados. Asimismo es posible una combinación con otras vacunas, tal como virus inyectable

10. IBR/IPV (IBR = Rhinotracheitis bovina infecciosa, IPV = Vulvovaginitis pustulosa infecciosa).

Las soluciones de virus obtenidos según el procedimiento de la presente invención se pueden aplicar formuladas según los métodos usuales en forma de soluciones, jarabe, emulsión, suspensión, spray, unguento, pasta, crema, loción, aerosol, tabletas, etc. Con preferencia se aplica la vacuna intranasalmente, como spray, o intramuscularmente.

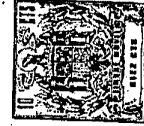
15.

Las formulaciones se preparan en forma en si conocida, por ejemplo, diluyendo la cepa de virus PI-3 ATCC-739 con disolventes adecuados y/o excipientes inertes, no tóxicos, sólidos, semi-sólidos o líquidos, en caso dado empleando emulsionantes y/o agentes de dispersión, de pulverización y de propulsión y empleando estabilizadores adecuados.

20.

Como disolventes, sustancias de carga, emulsionantes o bien dispersantes sean mencionados: agua, disolventes orgánicos no tóxicos o bien diluyentes, tales como parafinas (por ejemplo, fracciones del -

25.



petróleo crudo), aceites vegetales (por ejemplo aceite de cacahuete/  
aceite de sésamo), Alcoholes (por ejemplo alcohol etílico, glicerina),  
glicoles (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol) y agua; sus-  
tancias de carga sólidas, tales como, por ejemplo, los minerales natu-  
5. rales molturados (por ejemplo, ácido silícico altamente disperso, sili-  
catos), azúcar (por ejemplo, azúcar de caña, lactosa y glucosa); emul-  
sionantes, tales como emulsionantes no ionogenos y aniónicos (por ejem-  
plo, éster polioxietilénico de ácido graso, éter polioxietilénico de -  
alcohol graso, alquisulfonatos y arilsulfonatos), dispersantes (por --  
10. ejemplo, lignina, deslixiviaciones sulfíticas, celulosa metilica, fécu-  
la y polivinilpirrolidona) y lubricantes (por ejemplo, estearato de --  
magnesio, talco, ácido estearínico, laurilsulfato sódico).

Como estabilizadores sean mencionados: aminoácidos, azúcar,  
proteínas, polisacáridos, polialquilenglicoles. Estos estabilizadores  
15. se pueden agregar tanto en solución acuosa como también en estado lio-  
filizado.

Para comprobar la inocuidad se aplicaron en cada caso 5 cc de  
virus de cultivo con un contenido de  $10^{6,5}$  KID<sub>50</sub>/cc (KID<sub>50</sub> = dosis in-  
fecciosa de cultivo) en cada caso a 4 terneros, específicamente libres  
20. de anticuerpos, en forma intramuscular e intranasal. Dos grupos se man-  
tuvieron bajo condiciones de mantenimiento y alimentación normales, los  
otros dos grupos se mantuvieron durante la noche a 4°C y durante el día  
a 25-35°C durante 5 días. Los animales no mostraron en los 4 grupos nin-  
gún sintoma clínico de enfermedad, a pesar de poderse demostrar el vi-  
25. rus PI-3 hasta el 7º día en la secreción nasal de los animales inyecta



dos. De los tampones de nariz de los animales inyectados intramuscularmente no se pudo demostrar la presencia de virus PI-3.

5. La comprobación de la eficacia se efectuó análogo a la comprobación de la inocuidad, en cada caso con tres grupos de 4 animales cada uno. Los animales se cargaron sin embargo después de la vacunación en cada caso con 5 cc de una suspensión de una cepa de virus PI-3 patógena con  $10^{7,0} \text{KID}_{50} / \text{cc}$ .

10. Ninguno de los animales de los dos grupos vacunados mostró síntomas clínicos, mientras los 4 animales del 3º grupo sin inyectar mostraban, 2 días post infect., un aumento de fiebre y segregación aumentada de secreción nasal. Después de cesar la segregación de virus se pudo apreciar en los animales de los dos grupos vacunados un título de anticuerpos de 1:64 a 1:512.

15. Además se pudo demostrar, después de la inyección en terneros jóvenes, a pesar de los anticuerpos transmitidos pasivamente a través de colostro, un aumento de virus en las mucosidades nasales. Justamente así se logra en los terneros jóvenes un efecto sinérgico.

20. Como se ha descrito, en esta vacuna se cumplen las exigencias de inocuidad y eficacia venciendo tanto las desventajas de las vacunas muertas como de las vacunas vivas a base de virus atenuados. El virus de cultivo así obtenido se puede emplear como antígeno para la demostración de la infección por PI-3 en HAH.

Ejemplo para la obtención de una vacuna viva

25. Cultivos de células de testes de terneros, permanentes, en medio de mantenimiento libre de suero se inyectan en recipientes de vi



- drio adecuados con cepas de virus de parainfluenza-3 ATCC-739. Después de una incubación de 2 a 3 días se comprueba el crecimiento del virus y se recoge el medio virulento. Después de centrifugar para retirar los restos de células se congela a  $-60^{\circ}\text{C}$  la suspensión de virus.
5. Después de comprobar la esterilidad, título de virus y liberar de virus extraños, se llena el material de inyección y se distribuye bien líquido o liofilizado.

Ejemplo para la obtención de un antígeno de parainfluenza-3 para el ensayo de inhibición de hemaglutinación.

10. El virus de cultivo obtenido según el ejemplo de arriba se comprueba en sus propiedades específicas de hemaglutinación, se liofiliza y se distribuye como diagnóstico.

- N O T A -

15. 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 Alemania, con fecha 11 de mayo de 1.973, bajo el número P 23 23 847.3, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios 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:
25. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA VACUNA VIVA CONTRA EL VIRUS PA-



RAINFLUENZA-3 (VIRUS PI-3), caracterizandose por lo siguiente:

5. 1º. Procedimiento para la obtención de una vacuna viva contra el virus parainfluenza-3 (virus PI-3), por cultivo sobre cultivos de tejidos según métodos en sí conocidos, caracterizado porque se emplea la cepa de virus de parainfluenza-3 ATCC VR 739 en sí apatógena.

2º. Procedimiento para la obtención de una vacuna viva contra el virus parainfluenza-3 (virus PI-3), tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

10. Esta memoria consta de 9 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid. 13 JUL 1974

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT,

J. GÓMEZ ACEDO Y MODET

p.p. Firmado: L. García Fernández