

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



19 ES	11	NUMERO	10 A 1
	21		
	22	FECHA DE PRESENTACION	
			19-5-75

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:	52 FECHA	53 PAIS
51 NUMERO		

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K	

54 TITULO DE LA INVENCION
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN VIRUS VIVO ATENUADO DE VARICELA

71 SOLICITANTE (S)
PERCK & CO., INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
126 East Lincoln Avenue, RAHWAY, New Jersey, Estados Unidos

72 INVENTOR (ES)
Maurice R. Hilleman; Eugene B. Buynak; Beverly J. Neff

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON BERNARDO UNGRIA GOIEURU

1           Esta invención se refiere a una vacuna contra varice-  
la y a métodos para la preparación de esta vacuna.

5           En particular, la invención se refiere a una vacuna  
de virus vivo de varicela, atenuado, seguro y a un método de  
producción de la vacuna mediante la propagación seriada del  
virus de la varicela en sistemas de cultivo celulares.

10           La varicela es una enfermedad muy contagiosa, fundamen-  
talmente de la infancia. La enfermedad se caracteriza típica-  
mente por fiebre y aparición de una erupción macular que evo-  
luciona rápidamente a través de las fases de pápula y forma-  
ción de vesículas. La recuperación se produce habitualmente  
sin incidentes pero la enfermedad, incluso en su forma suave,  
es desagradable a la vista y puede dar lugar a cicatrices con-  
siderables producidas por las vesículas rotas. En algunos ca-  
15           sos, la enfermedad puede ser bastante grave ya que puede pro-  
ducirse una neumonía varicélica primaria en los niños o adul-  
tos. Complicaciones del sistema nervioso central tales como  
ataxia aguda del cerebelo con temblores e hipotonía muscular  
pueden preceder, acompañar o seguir a la infección de varice-  
20           la. Más raramente, se produce una implicación generalizada  
del sistema nervioso central con hemorragias, infiltración de  
células redondas perivasculares y desmielinización. También  
puede producirse neuritis y mielitis. La implicación de la  
piel también puede ser molesta con aparición de lesiones he-  
25           morrágicas, bulbosas o gangrenosas.

30           Por lo tanto, la prevención de la enfermedad mediante  
vacunación está justificada para evitar estos casos y un ob-  
jeto de esta invención es proporcionar una vacuna segura de  
virus vivos atenuados de varicela para este fin y un proce-  
dimiento para su preparación.

1

En el pasado varios investigadores han intentado la vacunación de voluntarios humanos susceptibles con resultados variables con respecto al "prendimiento" e intenso desacuerdo en cuanto a la eficacia protectora. Sin embargo, no aparecieron efectos adversos significativos a pesar del hecho de que estas vacunaciones intentadas eran de voluntarios susceptibles con virus totalmente virulentos en humor vesicular procedente de casos de varicela-zoster.

5

10

En la técnica anterior se ha citado la propagación de la varicela en diversos sistemas de cultivos celulares tales como amnios humano, fibroblastos de embriones humanos, células HeLa y tiroides humano pero antes de esta invención se creía en general que la única fuente de virus viables de varicela exentos de células era el humor vesicular. Caunt y colaboradores, *Journal of Hygiene*, 62, 413-424 (1964) citaron el aislamiento de los virus exentos de células a partir del tejido de tiroides humano y Brunell, *Virology*, 31, 732-4 (1967), describió el aislamiento de virus exentos de células de fibroblastos de embriones humanos. El humor vesicular es evidentemente una fuente inadecuada de virus vivos para la producción de una vacuna debido a sus existencias limitadas y a su virulencia. El tejido del tiroides humano es una línea celular humana primaria y por lo tanto es inaceptable como sistema de cultivo tisular para la propagación y atenuación de los virus para la producción de vacunas de virus vivos.

15

20

25

30

Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que el paso exento de células puede ser conseguido en preparados de cultivos tisulares adecuados, que pueden obtenerse en cantidad virus vivos de varicela extra-celulares útiles como antígeno y que a partir de los mismos puede prepararse una vacuna.

1 viva de varicela atenuada que evoca en el hombre una respuesta anticuerpo contra un virus de varicela virulento sin producir las graves manifestaciones clínicas de la enfermedad.

5 El procedimiento de esta invención comprende el paso seriado de virus de varicela virulentos en un sistema de cultivo tisular. El sistema de cultivo tisular puede ser uno cualquiera adecuado para la producción de vacuna y del que se sepa que mantiene el crecimiento del virus, tales como las cepas de células diploides humanas ilustradas por WI-38 y MRC-5,  
10 cepas de células diploides animales (resus fetal) y células primarias de origen simio. Los sistemas preferidos son de tejido testicular de mono y tejido de pulmón fetal humano diploides tal como el WI-38 preparados por métodos conocidos.

15 El cultivo se incuba a 30-38°C, preferiblemente a unos 32-36°C, durante 3 a 10 días aproximadamente. El tiempo práctico de incubación varía y está determinado por el grado de propagación viral indicado por observación microscópica (v.g. CPE). El inoculum puede ser una suspensión celular infectada o el virus liberado por métodos convencionales (v.g. sonificación).  
20

25 Cuando se observa el grado apropiado de infectividad, habitualmente después de unos 10 a unos 40 pasos seriados del virus, se retiran asépticamente los fluidos de mantenimiento. Debe observarse que el número de pasos seriados requerido puede depender del aislado o fuente particular de virus utilizado en la preparación de la vacuna. Después las láminas celulares se enjuagan varias veces con una solución fisiológica exenta de suero tal como solución reguladora de fosfato, solución salina (PBS) o solución salina equilibrada de Hanks. Se agrega  
30 un estabilizante adecuado tal como una composición constituida

1 por sacarosa, albúmina, glutamina y fosfato o similar, en un volumen del orden del 5 al 30 % del volumen original del fluido.

5 Se separan las células infectadas de la superficie de la vasija pasándolas al medio estabilizante por sistemas apropiados (v.g. congelación-descongelación o rascado de las células). Después se reúnen las suspensiones de células en el estabilizante y las células infectadas se rompen todavía más por medios apropiados tales como sonicación. La suspensión  
10 rota resultante se clarifica después por filtración para separar los residuos celulares y obtener un preparado de virus exentos de células. El preparado de virus resultante se subdivide después en un contenedor adecuado para su distribución como vacuna. La dosis puede ser del orden de 0,1 a 2,0  
15 ml conteniendo desde 100 hasta unos 1000 unidades infectadas en ampollas cerradas a la llama o en forma de producto liofilizado en viales tapados listos para su reconstitución en agua estéril. La administración puede realizarse por escarificación (punciones múltiples), por vía intradérmica o por  
20 vía subcutánea.

El virus de siembra para el procedimiento anterior se aísla en el humor vesicular procedente de un caso clínico de varicela y se mantiene en caldo de infusión de ternera a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

EJEMPLO 1

25 Vacuna de varicela viva atenuada, exenta de células, preparada mediante 20 pasos seriados en WI-38

Se realizan 19 pasos seriados de virus de varicela en un cultivo tisular de WI-38 de la forma siguiente:

30 El aislamiento inicial del virus de varicela se hace de una muestra de humor vesicular obtenida de un niño con va-

1 ricela clínica. La muestra de humor vesicular se recoge en  
caldo de infusión de ternera y se mantiene a  $-70^{\circ}\text{C}$ ; en el mo-  
mento del aislamiento, se descongela la muestra, se diluye con  
5 un volumen igual de caldo de infusión de ternera que contiene  
100 mcg de neomicina y 100 mcg de polimixina por mililitro y  
se incuba durante 30 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . La muestra se inocula en  
cultivos celulares establecidos de WI-38 de origen diploide  
fetal humano y se incuba a  $32^{\circ}\text{C}$ , constituyendo así el paso 1  
de una serie de subcultivos seriados.

10 Se observa la citopatología progresiva típica de la varice-  
la y cuando está suficientemente avanzada (13 días después de  
la inoculación), se decanta el líquido que sobrenada y se re-  
cogen las células infectadas por tripsinización. Después de separar  
la tripsina por centrifugación, se vuelven a suspender las  
15 células, se cuentan y se inoculan de nuevo en una serie fres-  
ca de cultivos celulares WI-38, constituyendo el segundo paso  
seriado a  $32^{\circ}\text{C}$ . Los pasos subsiguientes de suspensiones celu-  
lares infectadas se prosiguen de la misma forma. El paso de  
virus también puede ser iniciado a partir de suspensiones ce-  
20 lulares infectadas mantenidas a  $-70^{\circ}\text{C}$  con aditivos protectores  
criogénicos tal como glicerol, sorbitol o dimetilsulfóxido,  
que se sabe que preservan la viabilidad de las células.

Utilizando una suspensión de células infectadas del pa-  
so 19 como virus de siembra, se prepara una vacuna de varice-  
25 la viva atenuada, exenta de células, de la forma siguiente:

Se preparan unos cultivos celulares de WI-38 en fras-  
cos rodantes de vidrio empleando EMBE, preparado comercial de  
medio de Eagle en solución salina basal de Earle conteniendo  
30 10 % de suero de ternera fetal sin calentar como medio de desa-  
rrollo. Dos días después de la implantación, se tira el medio

1 de cultivo y los cultivos contenidos en los frascos se inoculan con aproximadamente  $2 \times 10^6$  células infectadas por frasco y se vuelven a alimentar con 100 ml de EBME conteniendo 2 % de suero de ternera agamma inactivado.

5 Tres días después de la inoculación el sistema vuelve a ser alimentado con 100 ml de EMBE conteniendo 2 % de suero de ternera agamma inactivado. La incubación se realiza a  $32^{\circ}\text{C}$  en un aparato rodante. Siete días después de la siembra, los cultivos contenidos en los frascos se lavan dos veces con solución salina de regulador de fosfato, a razón de 100 ml por lavado. A cada frasco se añaden 16 ml del estabilizante SPGA. Este último está constituido por los siguientes ingredientes:

15	Sacarosa	74,621 g
	Fosfato monopotásico	0,45 g
	Fosfato dipotásico	1,35 g
	L-glutamato monosódico	0,956 g
	Albumina humana (solución al 25 % de albumisol)	40 ml
20	Agua destilada estéril c.s. hasta	1 litro.

25 El estabilizante se prepara disolviendo los ingredientes en 800 ml de agua destilada estéril y llevando el volumen hasta 1 litro con agua destilada adicional. El pH de la composición debe estar comprendido entre 6,9 y 7,1. Se incorpora neomicina a una concentración de 50 mcg/ml a los medios de cultivo, lavado, mantenimiento y estabilizante. Se realizan valoraciones de la infectividad de cada cosecha en cultivos de células WI-38.

30 Después de la adición del estabilizante, el contenido de los frascos individuales se congela en cápsulas en un baño

1 de CO<sub>2</sub>-alcohol (alrededor de -70°C). El contenido de los fras-  
cos congelado se descongela rápidamente con intensa agitación,  
rompiendo parcialmente la lámina celular y liberando las célu-  
las al estabilizante líquido. Se reúnen los contenidos de los  
5 fracos, se toman muestras para determinar la esterilidad y la  
infectividad (determinadas después de la sonicación discon-  
tínua de una pequeña muestra) y se almacenan a -70°C en un  
congelador mecánicamente operado. Tres semanas más tarde, cuan-  
do las pruebas preliminares de esterilidad e infectividad son  
10 satisfactorias, las suspensiones de células en estabilizante  
reunidas se descongelan rápidamente y se transfieren a un apa-  
rato de sonicación fluida.

Alternativamente, puede omitirse el almacenamiento de  
las suspensiones reunidas de células en estabilizante a -70°C  
15 y el proceso puede ser proseguido completando en una sola ope-  
ración continua la sonicación fluida y el llenado.

El aparato de sonicación fluida tiene los siguientes  
componentes:

- 20 1) Disruptor sonicador de células y accesorios (watímetro,  
trompa disruptora ahusada 1/2" (12,7 mm) y accesorio de  
flujo continuo de acero inoxidable);
- 2) Vasiija de vidrio Pyrex de 4 litros, especial, con camisa  
de agua;
- 25 3) Cambiador de calor de tubo de acero inoxidable, espiralmen-  
te arrollado y provisto de doble pared;
- 4) Baño refrigerado y circulador;
- 5) Caudalímetro y
- 6) Microbomba de velocidad variable.

Las condiciones de operación son:

- 30 1) Potencia a la entrada: 120 vatios indicados en el watímetro

1

ultrasónico;

2) Caudal: 150 ml/minuto (medido en el caudalímetro y controlado externamente mediante la microbomba);

5

3) Ciclos de sonificación: cuatro, por ejemplo el volumen total desplazado a través del sonificador cuatro veces y

4) Temperatura de operación: 0-4°C.

10

El accesorio de flujo continuo, la vasija de retención de 4 litros, el cambiador de calor, el caudalímetro y la entrada a la microbomba se montan como una unidad antes de ser utilizados y se esterilizan. Las conexiones externas entre el baño circulante refrigerado y las porciones de doble pared del aparato permiten enfriar todo el aparato a 0-4°C y mantenerlo a esa temperatura durante el proceso de sonificación.

15

Después de la sonificación, que prácticamente rompe al 100 % de las células, la vacuna bruta pre-clarificada se muestra para las pruebas de control y seguridad. La vacuna restante se clarifica por filtración a través de un filtro de bujía sinterizado, de porosidad media (15 micras) de 7" x 8" (25,4 x 203 mm) y se recoge en un contenedor previamente enfriado. Antes de ser utilizado, el filtro de bujía es impregnado con 1 litro de estabilizante. Después de la clarificación, se toman muestras para las pruebas de seguridad animal y se centrifuga una muestra de 50 ml y el sedimento se vuelve a suspender en 0,5 ml de estabilizante (concentrado 100 veces) y se transfiere a unos portas para el examen microscópico para detectar la presencia de células intactas. No se observa ninguna.

25

30

La vacuna de varicela viva final, exenta de células, se dispensa en cantidades de 0,7-1,2 ml y se congela a -70°C o bien se congela a -70°C en viales con tapón de goma para

1 su subsiguiente preservación por liofilización, empleando técnicas muy conocidas como las descritas por Calnek y colaboradores, en Applied Microbiology, Noviembre 1970, vol. 20, nº 5, págs. 723-726. La infectividad fué demostrada en preparados de vacuna congelada en húmedo (-70°C) o liofilizada durante por lo menos 6 meses después de la preparación.

5 Puede prepararse una forma de dosificación conveniente reconstituyendo el material liofilizado al volumen original (0,7-1,2 ml) por adición de agua destilada estéril empleando alrededor de 0,1 a 1,0 ml de dicho material reconstituido para la administración parenteral como vacuna contra la varicela. La forma congelada en húmedo de la vacuna, que contiene de 0,7 a 1,2 ml de vacuna, puede ser descongelada antes de su empleo, siendo administrada parenteralmente una dosis de unos 0,1 a 1,0 ml de la vacuna.

10 EJEMPLO 2

Vacuna de varicela viva atenuada, exenta de células, preparada por 15 pasos seriados en WI-38

15 Se prepara una vacuna de varicela viva atenuada, exenta de células, empleando prácticamente el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1, a excepción de que se realiza un total de 15 pasos en cultivo tisular WI-38.

20 EJEMPLO 3

Vacuna de varicela viva atenuada, exenta de células, preparada por 15 pasos seriados en WI-38

25 Se prepara una vacuna de varicela viva atenuada, exenta de células, empleando prácticamente el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1 a excepción de que después de seis niveles de pasos seriados a 32°C, se inicia en el nivel del séptimo paso una nueva serie de pasos a 36°C y se conti-

30

1 núa a 36°C hasta el nivel del decimocuarto paso para la preparación de una vacuna en el decimoquinto paso.

EJEMPLO 4

5 Vacuna de varicela atenuada viva, exenta de células, preparada por 20 pasos seriados en WI-38

10 Se prepara una vacuna de varicela viva atenuada, exenta de células, empleando prácticamente el mismo procedimiento descrito en los Ejemplos 1 y 3, a excepción de que después de los seis niveles de pasos seriados a 32°C, se inicia una nueva serie de pasos a 36°C al nivel del séptimo paso y se continúa a 36°C hasta el nivel del decimonoveno paso para la preparación de una vacuna en el vigésimo paso.

EJEMPLO 5

15 Vacuna de varicela viva atenuada, exenta de células, preparada mediante 30 pasos seriados en WI-38

20 Se prepara una vacuna de varicela viva atenuada, exenta de células, empleando prácticamente el mismo procedimiento descrito en los Ejemplos 1 y 3, a excepción de que después de los seis niveles de pasos seriados a 32°C se inicia una nueva serie de pasos a 36°C al nivel del séptimo paso y se continúa a 36°C hasta el nivel del paso 29º para la preparación de una vacuna en el paso.

EJEMPLO 6

25 Vacuna de varicela viva atenuada, exenta de células, preparada mediante 40 pasos seriados en WI-38

30 Se prepara una vacuna de varicela atenuada viva, exenta de células, empleando prácticamente el mismo procedimiento descrito en los Ejemplos 1 y <sup>3</sup>A, a excepción de que después de los seis niveles de pasos seriados a 32°C, se inicia una nueva serie de pasos a 36°C al nivel del séptimo paso y se conti-

1      múa a 36°C hasta el nivel del paso 39º para la preparación  
de una vacuna en el paso 40º.

EJEMPLO 7

5      Vacuna de varicela atenuada viva, exenta de células, prepara-  
da mediante 20 pasos seriados en un cultivo tisular de célu-  
las testiculares de mono

10      Se prepara una vacuna de varicela viva atenuada, exen-  
ta de células, empleando prácticamente el mismo procedimiento  
descrito en el Ejemplo 1, a excepción de que en lugar del sis-  
tema de cultivo WI-38 se emplea un cultivo tisular conocido  
de células testiculares de mono con un total de 20 pasos se-  
riados.

EJEMPLO 8

15      Vacuna de varicela viva atenuada, exenta de células, prepara-  
da mediante 20 pasos seriados en cultivo tisular de células  
testiculares de mono

20      Se prepara una vacuna de varicela atenuada viva, exen-  
ta de células, empleando prácticamente el mismo procedimiento  
descrito en el Ejemplo 3, a excepción de que se utiliza un  
cultivo tisular conocido de células testiculares de mono en  
lugar del sistema de cultivo WI-38, con un total de 20 pasos  
seriados.

25      En resumen, la Patente de Invención que se solicita  
deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

30      1. Un procedimiento para la preparación de un virus  
vivo atenuado de varicela, exento de células, útil como anti-  
geno en una vacuna, que evoca en el hombre una respuesta anti-  
cuerpo contra un virus de varicela virulento sin producir las  
graves manifestaciones clínicas de la enfermedad, cuyo proce-  
m G

1 dimiento consiste en pasar seriadamente el virus virulento  
a 30-38°C en un preparado de cultivo tisular seleccionado en-  
tre el grupo formado por cepas de células diploides animales  
y humanas y células primarias de origen simiesco, un número  
5 de veces suficiente para atenuar el virus, seguido de libera-  
ción del virus atenuado de las células infectadas por soni-  
ficación en presencia de un estabilizante.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde  
la temperatura es 32°C.

10 3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde  
la temperatura es 36°C.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde  
el preparado de cultivo tisular es de cepas de células diploi-  
des humanas.

15 5. Un procedimiento según la Reivindicación 4, donde  
la cepa de célula diploide humana es el tejido pulmonar fe-  
tal humano.

6. Un procedimiento según la Reivindicación 5, donde  
el tejido pulmonar fetal humano es WI-38.

20 7. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde  
el preparado de cultivo tisular es de células primarias de  
origen simiesco.

25 8. Un procedimiento según la Reivindicación 7, donde  
las células primarias de origen simiesco son de tejido testi-  
cular de mono.

9. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde  
el preparado de cultivo tisular es de una cepa celular diploi-  
de animal.

30 10. Un procedimiento según la Reivindicación 9, donde  
la cepa celular diploide animal es de tejido de resus fetal.

1

11. Un procedimiento según la Reivindicación 6, donde el estabilizante es SPGA.

5

12. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN VIRUS VIVO ATENUADO DE VARICELA.

10

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de catorce páginas mecanografiadas.

Madrid, 19 de Mayo 1.975

BERNARDO UNGRIA

15

20

25

30

*MG*