

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



19 ES	21	NUMERO	10 A 1
	22	448,573	
		FECHA DE PRESENTACION	
		4-6-76	

P.- 63,229

HOE 75/B 003

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
P 25 25 733.4	10-6-75	Rep. Fed. Alemana

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K	

64 TITULO DE LA INVENCION
"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE VACUNAS DE VIRUS"

71 SOLICITANTE (S)
BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Marburg/Lahn, República Federal Alemana.

72 INVENTOR (ES)
Dr. Dieter Bernhardt y Dr. Heinz Restle.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ

LFG/

1 La invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de las vacunas de virus con auxilio de cultivos de células permanentes.

5 En los procedimientos conocidos para la obtención de vacunas de virus se trabaja con cultivos de células estacionarias (procedimiento de monocapa, con células BHK de cultivos en suspensión). Las células reproducidas en el medio nutriente son separadas por métodos físicos, por ejemplo, por sedimentación, centrifugación  
10 y/o filtración del medio nutriente, se suspenden en un nuevo medio, infectado con el virus y se separa luego de su crecimiento.

15 Estos procedimientos tienen la desventaja, que la separación de las células del medio nutriente es larga y costosa. Para llevar a cabo los requisitos descritos deben instalarse laboratorios especiales. Las células pueden durante la obtención ser perjudicadas por métodos físicos. En los procedimientos no pueden llevarse en forma cuantitativa, sino que están mucho más conectadas con pérdidas de células. Además, los cultivos de células pueden ser impurificados por otros microorganismos. Estos se reproducen asimismo en el cultivo y aparecen en el producto final, es decir en la vacuna.

25 Se ha encontrado ahora un procedimiento para la obtención de una vacuna de virus que se caracteriza, por el hecho que las células se reproducen en un medio nutriente, que contiene 2 a 10%, preferentemente 2-3% de suero, se diluye el medio luego de la reproducción con medio nutriente libre de suero, se infecta con el virus,  
30 se lleva a reproducción el virus en forma conocida y se

1 elabora la vacuna.

El procedimiento es también caracterizado, por-  
que la reproducción de las células y la dilución de la  
suspensión de células es llevada a cabo reiteradamente y  
5 que la síntesis de virus en la suspensión de células se  
lleva a cabo; sin necesidad que las células sean previa-  
mente separadas del medio de suspensión.

Según la invención pueden ser cultivadas todas  
las células permanentes, en la medida que los cultivos  
10 de suspensión puedan ser reproducidos. Una significancia  
económica tiene hasta ahora solamente las células BHK (Ba-  
by Hamster Kidney-célula), las cuales fueron obtenidas a  
partir de MacPherson y Stoker (Virology 14, 359-370, 1961),  
así como la célula IBRS-2, que fue descrita por Ribeiro  
15 u.a. en Archivos de Instituto Biológico 38, 279-281, 1971,  
y que constituye una permanente célula de riñón porcino.  
La invención no está limitada sin embargo a estos siste-  
mas de células.

En la suspensión de células obtenidas según la  
20 invención pueden reproducirse todos los tipos de virus  
que pueden ser reproducidos en células permanentes. Espe-  
cialmente apropiado es el virus MKS (Maul y Klauenseuche-  
Virus), los Reoviren Tipo I, II y III, el virus Adeno de  
porcinos y los Enterovirus de porcinos así como virus de  
25 Herpes. La invención no está sin embargo limitada a estos  
virus.

Como medio nutriente pueden proporcionarse los  
medios comerciales tales como los medios de Eagle, TCM  
199 así como de Hanks o de Earle. A estos medios pueden  
30 proporcionarse si se desea sustancias conocidas y comer-

1 ciales, por ejemplo fosfato de triptosa, hidrolisato de lactalbúmina, caseína peptona, glucosa, galactosa, lactosa así como extracto de levadura.

5 Como medios nutrientes apropiados pueden mencionarse las siguientes soluciones:

Medio Eagle's 59		89,0% en peso
Fosfato de triptosa	solución al 2,95%	5,0% en peso
Bicarbonato de sodio	5,0 %	2,5% en peso
Glucosa	20,0 %	2,0% en peso
10 Extracto de levadura	5,0 %	1,0% en peso
Neomicina		0,5% en peso

15 El medio de Eagle es una mezcla de aminoácidos y vitaminas en solución salina de Earle. Su composición fue divulgada por Eagle en Ciencia 130, 432, 1959. El fosfato de triptosa puede obtenerse en el comercio (Oxoid o Difco) y se constituye de peptón triptosa, fosfato de disodio, glucosa y sal de cocina. La neomicina es un antibiótico y está contenido en el medio empleado en una concentración de 1000/ml.

20 El procedimiento de la invención está especialmente caracterizado, porque el contenido de suero es de 2-10%, preferentemente 2-3%. Como suero se emplea un éster dicáustico bovino - o suero de terneros, pero pueden emplearse los mismos resultados con otros sueros. En la  
25 práctica se emplearon hasta el momento aditivos de suero de 10% y más. Es un objetivo de la presente invención, disminuir significativamente esta cantidad. De todos modos el agregado de suero según la invención puede ser de menos del 10%.

30 En la Tabla siguiente se presentan comparati-

1 vamente las cantidades de células de diez ensayos. La  
 concentración de partida era de 0,2-0,3 Mio BHK célula  
 por mililitro, que fueron llevados a suspensión por em-  
 5 pleo de 2,5% y 10,0% de suero de ternero durante 48 ho-  
 ras. Las cantidades de células se determinaron por colo-  
 ración vital con azulado en la cámara conteo.

Ensayo		
Nº	2,5% suero de terneros	10% suero de terneros
1	1,8 Mio.	1,7 Mio.
10 2	1,6 Mio.	1,5 Mio.
3	1,55 Mio.	1,85 Mio.
4	2,5 Mio.	1,7 Mio.
5	3,0 Mio.	2,0 Mio.
6	1,65 Mio.	1,8 Mio.
15 7	1,08 Mio.	0,98 Mio.
8	2,05 Mio.	1,5 Mio.
9	2,1 Mio.	1,6 Mio.
10	1,6 Mio.	1,6 Mio.
Promedio.Crecimiento 1,898 Mio.		

20 De los diez ensayos con suero de ternero de  
 2,5% se obtuvo un crecimiento medio, que se encontraba  
 con 1,9 Mio células en alrededor de la mitad o más, que  
 cuando se empleaba el procedimiento según la técnica con  
 10% de suero de terneros.

25 Para la reproducción de virus la suspensión de  
 células se diluye con medio nutriente libre de suero. Pa-  
 ra la infección posterior se recomienda una relación de  
 célula-virus de 10:1 a 500:1.

30 Luego del procedimiento de suspensión mencio-  
 nado según el estado de la técnica se obtiene los títulos

1 de virus de  $10^{5,0}$  a  $10^{7,65}$  por mililitro. Los títulos de virus obtenidos según la invención se encuentran entre  $10^{6,75}$  y  $10^{8,5}$ , por lo tanto alrededor de diez veces mayor que con los procedimientos comunes.

5 Ejemplo 1

10 100 ml del cultivo de célula BHK obtenido en forma conocida en el medio nutriente descrito en página 2 con un agregado de 2,5% de suero de bovino, que tiene un contenido de células de 2,5 Mio por mililitro, se diluye en cuatro etapas en una relación 1:8 con igual medio nutriente y se lleva a reproducción durante 48 horas a 37°C.

15 Tal como lo muestra el esquema siguiente, pueden en 4 x 48 horas los 100 ml llevarse a 400 litros de una suspensión de célula con 2,5 Mio células/ml.

	<u>ESQUEMA</u>		
1	100 ml		2,5 Mio célula/ml
	Etapa I	Diluir 1:8	
	800 ml		300.000 célula/ml
5		Luego de 48 hrs. a 37°C	
	800 ml		2,5 Mio célula/ml
	Etapa II	Diluir 1:8	
10	6,4 l		300.000 célula/ml
		Luego de 48 hrs. a 37°C	
	6,4 l		2,5 Mio célula/ml
15	Etapa III	Diluir 1:8	
	51,2 l		300.000 célula/ml
		Luego de 48 hrs. a 37°C	
	51,2 l		2,5 Mio célula/ml
20	Etapa IV	Diluir 1:8	
	400 l		300.000 célula/ml
		Luego de 48 hrs. a 37°C	
25	400 l		2,5 Mio célula/ml
		Diluir 1:2,5	
	1000 l		1 Mio célula/ml
		Infección con virus	

30

1            Para infección con virus se diluyen los 400 li-  
tros obtenidos en relación 1:2,5 con el mismo medio nu-  
triente, esta vez sin agregado de suero, así a 1.000 li-  
tros con un contenido de células de 1 Mio por mililitro.  
5            La dilución se infecta con virus MKS uno del tipo A5 Han-  
nover, C T81s ó 0,1 Lausanne en relación célula-virus  
100:1, agregándose la suspensión que contiene el virus  
bajo condiciones estériles a la suspensión de células.  
40 horas después de la infección se enfría todo a 4°C,  
10           se centrifuga para el alejamiento del escombros de célu-  
las, se mezcla para purificación con 2% de cloroformo y  
se separa una fase inferior del cloroformo con sedimento  
de proteína y se rechaza. Finalmente el producto se ad-  
sorbe con hidróxido de aluminio y se inactiva por etile-  
nimina a 4°C. Este producto constituye la vacuna MKS.  
15

Es bien asimilable, activo frente a enfermeda-  
des de fiebre aftosa y está estable durante 24 meses a  
4-6°C.

20           En las Tablas que siguen se describen los tí-  
tulos de inflexión de 6, respectivamente 7 ensayos con  
vacunas de los tipos de virus mencionados.

25

30

Título de infección de Virus-MKS TIPO A en cultivos de células en suspensión BHK.

	Número de Ensayo						
	1	2	3	4	5	6	7
Cantidad de células/ml en Mio durante la in- fección	1,05	1,0	0,85	1,05	1,45	1,3	1,4
Cosecha en horas p.i.	20	20	18	22	22	20	22
Título / ml	$10^{7,75}$	$10^{8,0}$	$10^{8,25}$	$10^{7,5}$	$10^{8,25}$	$10^{7,5}$	$10^{8,5}$

Título de infección de Virus-MKS TIPO C en cultivos de células en suspensión BHK.

	1	2	3	4	5	6
Cantidad de células/ml en Mio durante la in- fección	1,3	1,5	1,0	1,1	1,3	1,35
Cosecha en horas p.i.	22	20	22	44	24	24
Título / ml	$10^{7,5}$	$10^{6,75}$	$10^{8,5}$	$10^{7,5}$	$10^{7,25}$	$10^{7,0}$

Título de infección de Virus-MKS TIPO 0 en cultivos de células en suspensión BHK.

	Número de Ensayo						
	1	2	3	4	5	6	7
Cantidad de células/ml en Mío durante la infección	0,9	0,95	0,925	1,10	1,175	0,95	1,4
Cosecha en horas p. i.	44	20	20	27	24	21	22
Título / ml	$10^{7,05}$	$10^{7,75}$	$10^{8,25}$	$10^{7,75}$	$10^{7,75}$	$10^{8,0}$	$\geq 10^{8,5}$

Tal como se observa de las cantidades en tercer línea los títulos de virus son cercanamente a diez veces mayor que aquellos obtenidos de suspensiones de virus de acuerdo al estado de la técnica.

Ejemplo 2

450 ml de una suspensión de IBRS-2-células con 670.000 células/ml se diluyen según el Ejemplo 1 con el medio nutriente allí mencionado a 1,5 lt (200.000 células/ml) y se mantienen a 37°C. Luego de 72 horas la cantidad de células es de 670.000 por mililitro. La suspensión de células formada se diluye con 1:3,35 con el mismo medio nutriente a 5 lt y las células (200.000/ml) se llevan a 37°C para reproducción. Luego de 72 horas se contaron 680.000 células/ml. La cantidad de células obtenida se lleva a 1:2 a 10 lt con el mismo medio nutriente pero esta vez libre de suero, y se infecta con virus MKS TIPO C. Luego de 21 horas se lleva la suspensión a 4°C y se mide el título de infección. Constituye  $10^{7,6}$  KID<sub>50</sub>/ml. La vacuna MKS se obtiene tal como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

Según el Ejemplo 2 se obtiene en dos etapas a partir de 500 ml de una suspensión IBRS-2-células con una dilución de 1:4 y un tiempo de reproducción de 72 horas a 37°C un volumen de 8 lt de una suspensión de células con una cantidad de células de 650.000/ml. La suspensión de células se diluye a 1:2, con un medio nutriente libre de suero se infecta con un virus Adeno de cerdo y se incuba a 37°C durante 72 horas. Se diluye luego nuevamente a 1:2 con medio nutriente libre de suero y se mantiene durante 48 horas a 37°C. En total 120 horas después de la infección, se enfría a 4°C y se estima el título de infección.

Comprende  $10^{5,5}$  KID<sub>50</sub>/ml. De la suspensión de

1 virus obtenida se consigue una vacuna contra el virus A-  
deno de cerdo.

Ejemplo A

5 Según el Ejemplo 1 se obtiene 6 lt de la suspen-  
sión de células BHK. Las células, cuya cantidad comprende  
2,1 Mio célula/ml se diluye a 1:3 con medio nutriente li-  
bre de suero a 700.000 células/ml, se infecta con Reovi-  
rus de Serotipo III y se incuba a 37°C. 48 Horas después  
10 de la infección nuevamente se diluye con el medio 1:2 men-  
cionado. 96 Horas después de la infección se enfría la  
suspensión de células que contiene el virus a 4°C y se mi-  
de el título de infección. Corresponde a  $10^{7,7}$  KID<sub>50</sub> por  
mililitro. La suspensión de células obtenida sirve para  
la obtención de una vacuna frente al Reovirus Serotipo  
15 III.

20

25

30

1 - REIVINDICACIONES -

5 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:

10 1ª.- Procedimiento para la obtención de vacunas de virus en cultivos de células por reproducción de células en un medio nutriente e infección de las células con un virus, caracterizado por el hecho, que las células se reproducen en el medio nutriente, que contiene 2 a 10%, preferentemente 2 a 3% de suero, y este se diluye con más medio nutriente en el transcurso de la reproducción de las células, llevándose a cabo la última dilución antes de la infección de las células sin su separación con un medio nutriente libre de suero.

15 2ª.- Procedimiento para la obtención de vacunas de virus.

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

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

Madrid,

08. SET. 1975

P.A.

25 Alberto de Elzaburu  
Por Poder

30