

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



PATENTE DE INVENCION

P.- 63.581
US-PHN 8166

(10) ES	(11) NUMERO	(12) A. I.
(21)	449.941	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	19-7-76	

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
597.654	21-7-75	EE.UU.

(42) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K	

(64) TITULO DE LA INVENCION

"UN METODO DE PREPARACION DE UN NUEVO VIRUS VIVO DE LA RABIA"

CONCEDIDA
15 ABR. 1977

(71) SOLICITANTE (S)

PHILIPS ROXANE INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64502, Estados Unidos de América.

(72) INVENTOR (ES)

Eben Arthur Slater.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ

LFG

1 FUNDAMENTO DE LA INVENCION.

En la inmunización de animales se han empleado ampliamente vacunas de varias cepas de virus de rabia.

5 Una de las cepas empleadas ha sido la conocida cepa Flury, que se ha usado para la inmunización de perros. La cepa Flury se aisló por paso de un virus a través de cerebros de pollo, y se adaptó para desarrollarse en huevos embrionados.

10 Las vacunas que contienen la cepa Flury del virus de la rabia han sido útiles en la inmunización de perros contra la rabia. Sin embargo, la vacuna Flury tiene ciertas desventajas. Contiene una cantidad relativamente alta de proteínas indeseables a las que puede ser sensible el animal en tratamiento, y contiene una cantidad re-

15 lativamente baja de virus activo.

La cepa E.R.A. del virus de la rabia se derivó del virus S.A.D., una cepa de virus fija, aislada originalmente a partir de un perro rabioso y propagada en cerebro de ratón y células renales de hamster, y después

20 se adaptó a un cultivo primario de tejido de riñón de cerdo. Una muestra de la cepa ERA del virus de la rabia se depositó en la American Type Culture Collection, Washington D.C. el 29 de octubre de 1964, y se registró allí con el número VR 332.

25 Las vacunas que contienen la cepa ERA adaptada al cultivo primario de tejido renal de cerdo se emplean ampliamente para inmunizar diversas especies animales incluyendo perros, gatos y ganado contra la rabia.

30 Para determinar si el virus de la rabia es ca-

1 paz de producir un número suficiente de anticuerpos de
rabia cuando se inyecta como vacuna en animales, se de-
termina la concentración de suero de los animales vacu-
nados. Para determinar tal concentración se ha empleado
5 un procedimiento largo y tedioso en el que se efectúan
ensayos de neutralización de suero-virus, preparando di-
luciones en serie del suero, mezclándolas con una canti-
dad letal de virus de la rabia, dejando que la mezcla de
virus-suero incube durante 1,5 horas a una temperatura
10 de 37°C para dejar que el anticuerpo de rabia neutrali-
ce el virus, e inoculación posterior de la mezcla de sue-
ro-virus en los cerebros de ratones jóvenes. La supervi-
vencia de los ratones inoculados comparada con testigos
es una medida de la concentración de anticuerpos de la
15 rabia.

Durante el paso a través de tejido primario
de riñón de cerdo, la cepa ERA del virus de la rabia cau-
saba ocasionalmente algunos pequeños cambios citopáticos
en los cultivos de tejidos. Sin embargo, la citopatolo-
20 gía era irregular, y no se encontró ninguna relación en-
tre los cambios citopáticos y la concentración de virus.
Abelseth Can. Vet. Jour. Vol. 5, n.º 4, abril 1964, pági-
nas 84-87, y especialmente la página 86.

25 Así pues, no es posible, por observación de
los efectos citopáticos, determinar la concentración de
la cepa ERA de virus de rabia, ni medir los anticuerpos
del suero en sistemas de cultivo de tejido.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION.

30 La invención, en este caso, se refiere a una
cepa de virus de rabia mejorada, a vacunas que contienen

1 tal cepa, y al uso de tales vacunas en la prevención de la rabia en animales.

Un objeto de esta invención es proporcionar una nueva cepa mejorada de virus de rabia.

5 Otro objeto es proporcionar una cepa de virus de rabia que es capaz de mostrar un efecto citopático muy reproducible que se correlaciona directamente con la concentración del virus.

10 Otro objeto más de la invención es proporcionar una vacuna mejorada de virus vivo de rabia atenuado. Estos y otros objetos de la invención se pondrán de manifiesto en la descripción que sigue.

DESCRIPCION GENERAL DE LA INVENCION.

15 La invención se refiere a un método de preparar una cepa atenuada modificada de virus de rabia capaz de producir un efecto citopático muy reproducible sobre un tipo de células seleccionado, y, más particularmente, capaz de producir un efecto citopático sobre el tipo de células compatible con la concentración del virus.

20 La invención se refiere además a vacunas de rabia que contienen la cepa de virus de rabia modificada de la invención.

25 Según la invención se proporciona una cepa atenuada mejorada de virus de rabia que tiene una actividad citopática muy reproducible. La actividad citopática de este virus está directamente relacionada con su concentración, proporcionando así un medio único de determinar cuando se ha producido una vacuna de la efectividad deseada. Las vacunas que contienen la cepa modificada de

30

1 virus de la invención son muy eficaces para proporcionar
inmunidad contra la infección por rabia, con producción
de un mínimo de efectos indeseados cuando se administra
a animales.

5 La cepa mejorada de virus de rabia de la inven-
ción se prepara a partir de la cepa ERA de virus de ra-
bia. La cepa ERA de la rabia ha sido identificada por M.
K. Abelseth, "Propagation of Rabies Virus in Pig Kidney
Cell Cultures", Can. Vet. J. 5, 84-87 (1964) y M. G. Abel-
10 seth, "An attenuated rabies vaccine for domestic animals
produced in tissue culture", Can. Vet. J. 5, 279-286
(1964), como derivada del virus de rabia descrito por P.
Fenje, "Propagation of rabies virus in cultures of ham-
ster kidney cells", Can. J. Microbiol., 6, 379-484 (1960).
15 Esta cepa ERA de virus de rabia se depositó en la Ameri-
can Type Culture Collection, Washington D.C. el día 29 de
octubre de 1964, y se registró allí con el número VR 332.

Según ha sido señalado por Abelseth en Can. Vet.
20 Jour. 5, 86, la cepa ERA, cuando se hace pasar a través
de células renales primarias de cerdo, producía ocasio-
nalmente efectos citopáticos en las células, sin ninguna
correlación con la concentración de virus.

Según la presente invención se ha desarrollado
una nueva cepa de virus de rabia, identificada aquí como
25 cepa PRI, por paso en serie de la cepa ERA a través del
tipo de células estables PK₂A de riñón de cerdo. Esta nue-
va cepa PRI muestra un efecto citopático muy reproducible
que puede usarse de modo rutinario para determinaciones
de virus y anticuerpos de suero.

30 Esto es, además de su utilidad en la preparación

1 de vacunas para la inmunización de animales contra la
rabia virulenta.

5 El tipo de células PK₂A de riñón de cerdo se
inició a partir del riñón de un cerdo adulto en noviem-
bre de 1955, por E. Stice de los Laboratorios Cutter. El
tipo de células se obtuvo de los Laboratorios Biológi-
cos Navales, San Diego, California.

10 Se ha encontrado que al cabo de 60 ó 70 pasos
en serie se produce un efecto citopático muy reproducí-
ble, que se correlaciona directamente con la concentra-
ción de virus. Se ha encontrado que, para lograr los re-
sultados más consistentes, son deseables 90 ó más pasos
a través del tipo de célula PK₂A.

15 En general, los pasos a través del tipo celu-
lar PK₂A se efectúan a aproximadamente 37°C. Sin embar-
go, pueden emplearse temperaturas de alrededor de 35°C
a 39°C.

20 Esta nueva cepa de la rabia, obtenida después
del número deseado de pasos en serie a través del tipo
celular PK₂A, es altamente inmunógena y no patógena pa-
ra los animales, y puede usarse en la preparación de u-
na vacuna contra la rabia útil para la inmunización de
animales tales como perros, gatos, ganado, caballos y
cerdos.

25 La cepa PRI puede hacerse pasar en serie a tra-
vés de cultivos de células renales primarias de perros
que estén exentos de agentes extraños, para dar vacunas
que tienen un grado óptimo de exención de tales agentes.
En general, se efectúan unos 10 ó más pasos en serie, y
30 usualmente se emplean alrededor de 30 a 60 pasos.

1 Las vacunas que contienen la cepa PRI de virus
de la rabia pueden diluirse con agua destilada o cual-
quier flúido inyectable farmacéuticamente aceptable, tal
como disolución salina fisiológica. Además, puede emple-
5 arse en la vacuna un estabilizante tal como gelatina hi-
drolizada o N-Z-amina en una cantidad de alrededor de 1
parte por 4 partes de virus.

Las nuevas vacunas de la invención pueden ad-
ministrarse a animales por inyección intramuscular.

10 La valoración de las vacunas de la invención
en perros, gatos y otros animales muestra una protección
consistente frente a un ataque por virus de rabia tan
virulentos como el CVS-31 y el virus "street" (glándula
salival NCDC ~~4~~ 1545).

15 En ningún caso se pudo mostrar, con un control
cuidadoso de los animales, ninguna reacción importante
ni enfermedad posterior causadas por la propia vacuna.
PREPARACION DEL CULTIVO DE TEJIDO DE PK₂A.

20 Se desarrollaron cultivos en monocapa, de cin-
co a siete días de edad, del tipo de células renales de
cerdo PK₂A, obtenido de los Laboratorios Biológicos Na-
vales, San Diego, California, en frascos normalizados
de 950 ml., y se hicieron subcultivos empleando una di-
25 solución en tripsina-versina. Las células se plantaron
después en proporción de 250.000 células por 1,0 ML de
LHE (disolución salina equilibrada de Earles más 0,5% de
producto de hidrólisis de lactoalbúmina), más 10% de sue-
ro de ternero adulto o fetal contenido en tubos de tapón
de rosca de 16 x 125 mm. El suero de ternero se había li-
30 berado previamente por filtración de anticuerpos de rabia

1 e inhibidores.

REPRODUCCION DE VIRUS PRI DE LA RABIA.

5 Tubos de PK₂A de un día de edad se inocularon con 0,2 ml de diluciones de virus. Los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente, protegidos contra la luz, antes de incubarlos a 37°C, para permitir la adsorción del virus en la monocapa de células.

10 Un día después de la inoculación, el medio de los tubos se sustituyó por un medio de nueva aportación que constaba de LHE 8% de suero de ternero y que tenía un pH de 7,4-7,6. Después, el medio de los tubos se sustituyó cada dos días por un medio de nueva aportación que constaba de LHE 4% de suero de ternero y que tenía un pH de 7,6-7,8.

15 Comenzando el cuarto día y acabando el séptimo día, se observó el efecto citopático (CPE). El desarrollo del CPE de la rabia se mostró primero por el desprendimiento de diferentes tamaños y distribuciones de células redondeadas de las monocapas de células normales. A medida que aumenta la infección del tubo, progresa el CPE. Los agujeros y las rasgaduras de la capa de células se hacen más evidentes en tubos fuertemente infectados que muestran una distribución de 70 a 90% sobre la capa de células si se observan durante un tiempo
25 suficiente.

Los pasos en serie se hicieron en células PK₂A, y se hicieron ensayos para determinación de capacidad de infección por valoración en ratones según las técnicas descritas en V-64 y la Monografía WHO Nº 23 "Laboratory Techniques in Rabies", WHO, Ginebra (1966).
30

Los datos mostrados en la Tabla I que sigue son una comparación de la concentración de la vacuna de la rabia, basada en la capacidad de infección en ratones (MLD_{50}), con la concentración de la vacuna de la rabia en cultivos de tejidos PK_2A ($TCID_{50}$) basada en los efectos citopáticos del virus PRI.

TABLA I

COMPARACION DE LA CONCENTRACION DE VACUNA DE VIRUS DE RABIA EN RATONES Y CULTIVO DE TEJIDO
Concentración/ml (\log_{10})

Paso/ó Lote	DML_{50}/ml	$DTCI_{50}/ml$
17PK ₂ A	$10^{5,7}$	$10^{6,5}$
43PK ₂ A	$10^{5,2}$	$10^{5,5}$
52PK ₂ A	$10^{6,7}$	$10^{6,8}$
78PK ₂ A	$10^{7,0}$	---
82PK ₂ A	$10^{7,5}$	---
86PK ₂ A	$10^{7,0}$	---
88PK ₂ A	$10^{7,3}$	---
88PK ₂ A PEK1	$10^{7,3}$	$10^{7,0}$
148PK ₂ A	$10^{5,7}$	$10^{6,5}$
149PK ₂ A	---	$10^{6,2}$
96PK ₂ A DK ₆	$10^{6,1}$	$10^{7,0}$
" DK ₁₇	$10^{5,9}$	$10^{7,0}$
" DK ₂₃	$10^{5,4}$	$10^{7,0}$
" DK ₃₃	---	$10^{6,0}$
" DK ₃₆	---	$10^{7,0}$
" DK ₄₀	$10^{5,1}$	$10^{6,3}$
" DK ₄₆	$10^{5,3}$	$10^{6,2}$
" DK ₄₈	$10^{4,2}$	$10^{4,3}$ (liofilizado)

TABLA I (continuación)

Paso/ó Lote	Concentración/ml (\log_{10})	
	DML_{50}/ml	$DTCI_{50}/ml$
96PK ₂ A DK ₅₆	$10^{4,9}$	$10^{6,2}$
" DK ₄₉	---	$10^{6,5}$ (húmedo)
" "	$10^{5,5}$	Lote 12 Ser.101 $10^{5,9}$ (seco)
" "	---	$10^{6,0}$ (húmedo)
" "	$10^{5,0}$	Lote 13 Ser.102 $10^{5,9}$ (seco)
" "	---	$10^{6,3}$ (húmedo)
" "	$10^{5,5}$	Lote 14 Ser.103 $10^{5,1}$ (seco)

Como se muestra en la Tabla I, el uso del sistema de células PK₂A proporciona un método claro de determinar cuando se ha alcanzado una potencia suficiente, por observación del efecto citopático sobre la capa de células del cultivo de tejido, y sin necesidad de una valoración en ratones.

ENSAYOS DE NEUTRALIZACION DE SUERO.

Se inocularon diluciones de suero Burro NCDC, con una concentración de neutralización de suero de 1-8000 frente a 32 DML_{50} de la cepa CVS de virus de la rabia, con volúmenes iguales de virus PRI de la rabia que contenían aproximadamente 100 a 500 $DTCI_{50}/0,25$ ml.

Como se muestra en los datos de la Tabla II siguiente, la neutralización del efecto citopático por

1 antisuero de rabia inmune específico NCDC y neutralización de la letalidad en ratones, identifican la cepa de virus PRI como de la rabia.

TABLA II

5 NEUTRALIZACION DE VACUNA DE VIRUS PRI DE RABIA POR ANTISUERO ESPECIFICO DE RABIA.

<u>Virus</u>	<u>Concentración/ml (Lote₁₀)</u>
PK ₂ A DK ₄₉	$10^{6,5}$ de DT _{CI} ₅₀
" (neutralizado)	Menos de 10^1 de DT _{CI} ₅₀
10 PK ₂ A DK ₄₉	$10^{6,0}$ DML ₅₀
"	Menos de 10^1 de DML ₅₀

PK₂A DK₄₉ - Lote 8, recolección 9

15 Antisuero específico: suero burro NCDC con una concentración de neutralización de suero de 1-8000 frente a 32 DML₅₀ de virus CVS.

PREPARACION DE VACUNA.

20 Porciones iguales de virus PRI de rabia, con una concentración de aproximadamente 10^4 DT_{CI}₅₀/ml, se mezclaron con estabilizante para dar una concentración final de 80% de virus y 20% de estabilizante. Después se llenaron hasta 1,2 cc. frascos ámbar de vacuna de dos cc. y se liofilizaron.

ESTUDIOS DE EFICACIA EN PERROS.

25 Se vacunaron perros susceptibles con vacunas preparadas a partir de cepa de virus de rabia PRI, y se estimularon por inyección intracerebral con un virus fijo de rabia (CVS). Estos perros se estimularon por inyección intracerebral con un virus fijo (CVS).

30 El virus fijo se preparó por inoculación intra-

1 cerebral de CVS-31 en un cachorrillo. Siete días des-
pués de la inoculación y una vez observados los sínto-
mas de la rabia, el perro se sacrificó. Se extrajo en-
tonces el cerebro, se trituroó en forma de una suspen-
5 sión al 20% en disolución salina estéril, se distribuyó
en cantidades de 2,0 ml, y se guardó a -60°C.

10 Como se muestra en la Tabla III siguiente, la
valoración de las vacunas PRI en perros indicó que es-
tas vacunas aportaban una protección consistente frente
a esta severa inoculación. Además, como muestra la ta-
bla, había una buena correlación entre la respuesta de
los anticuerpos y la protección.

TABLA III

RESUMEN - EFICACIA DE LA VACUNA DE VIRUS DE RABIA EN PERROS
 FRENTE A INOCULACION INTRACEREBRAL CON VIRUS FIJO (CVS)

Paso	Nº. de perros	Dilución de la vacuna	Concentración/ml(log ₁₀)			Respuesta de anticuerpos a la vacuna			Nº de supervivientes/ Nº de inoculados	Hoja núm.
			DTCI	DKL	Pre	Post				
PK A52	6	0	5,5	6,7	< 4	1-420	6/6	13		
" 2		10	10	10	< 4	1-160 *	9/9			
" 86	9	0	—	7,3	< 4	> 1-256	5/5			
" 88	5	0	6,3	7,3	< 4	> 1-256	3/3			
PK A56DK	3	0	10	6,2	< 4	1-330	6/6			
" 2		10	10	10	< 4		29/29			
" 96DK	6	0	5,3	5,2	< 4					
" 40		10	10	10	< 4					
PK A52	29	-1	No se hizo							
" 2		10								

TABLA III (continuación)

Paso	Nº. de perros	Dilución de la vacuna	Concentración/ml(log ⁻¹)			Respuesta de anticuerpos a la vacuna		Nº de supervivientes/ Nº de inoculados
			DTCI	DWL	Pre	Post		
			50	50				
PK A86	6	10 ⁻¹	5,2	6,3	< 4	1-69 *	6/6	
PK A88	3	"	10	6,3	< 4	1-107	3/3	
PK A96DK	6	"	5,0	5,2	< 4	1-130	6/6	
"	6	"	4,3	4,2	< 4	1-256	6/6	
"	40	"	10	10	< 4		21/21	
PK A52	6	10 ⁻²	3,5	4,7	< 4	1-192	6/6	
"	6	"	10	5,3	< 4	1-34 *	6/6	
"	4	"	4,3	5,3	< 4	> 1-48	4/4	
PK A96DK	6	"	10	4,2	< 4	1-67	6/6	
"	6	"	3,3	3,2	< 4	1-150	6/6	
"	40	"	10	10	< 4		28/28	
	28							

TABLA III (continuación)

Paso	Nº de perros	Dilución de la vacuna	Concentración/ml(log ₁₀)			Respuesta de anticuerpos a la vacuna			Nº de supervivientes/ Nº de inoculados	
			DTCI	DMU	Pre	Post				
			50	50						
PK A52	6	10 ⁻³	2,5 10	3,7 10	< 4	1-50	6/6			
" 86	6	"	—	4,3 10	< 4	< 1-32(3) *	0/3			
" 88	4	"	3,3 10	4,4 10	< 4	1-32(3)	3/3			
PK A96DK	6	"	3,0 10	3,2 10	< 4	1-30	2/6			
" 2	6	"	2,3 10	2,2 10	< 4	> 1-32(2)	2/2			
" 96DK	40	"	—	—	—	—	3/6			
	28						19/28			
PK A52	4	10 ⁻⁴	1,5 10	2,7 10	< 4	< 1-20	1/4			
" 86	5	"	—	3,3 10	< 4	< 1-16 *	5/5			
" 88	3	"	2,3 10	3,3 10	< 4	1-18	1/3			
" 96DK	3	"	2,0 10	2,2 10	< 4	< 1-16	0/3			
	6									

TABLA III (continuación)

Paso	Nº. de perros	Dilución de la vacuna	Concentración/ml (log)			Respuesta de anticuerpos a la vacuna			Nº de supervivientes/ Nº de inoculados
			DTCI	DML	Pre	Post			
PK A96DK	40	no se hizo	50	50				7/15	
PK A52	15	no se hizo							
" 86	4	no se hizo	10	10	2,3	10	< 4	0/4	
" 88	4	"	10	10	1,3	2,3	< 4	0/4	
" 96DK	6	no se hizo							
" 96DK	40	no se hizo						0/8	

(*) Medida de anticuerpos por neutralización de suero en ratones.

1 Otro grupo de perros susceptibles se vacunó
con diluciones de una vacuna PRI liofilizada (paso
PK₂A96, DK₄₈).

5 27 días después de la vacunación, los perros
vacunados y los testigos se inocularon con un virus
"street" CNCP 1545 que tenía una concentración de $10^{5,0}$
DML₅₀/0,03 ml por inoculación en ambos músculos masete-
ros.

10 Como se ve en la tabla IV siguiente, esta va-
cuna dio buena protección contra esta inoculación.

TABLA IV

RESUMEN - EFICACIA DE LA VACUNA DE VIRUS DE RABIA EN PERROS TRAS INCOULACION
EN MUSCULO MASTERO CON VIRUS FIJO (CVS)

Paso	Nº. de perros	Dilución	Concentración/ml (log ₁₀)		Respuesta de anticuerpos		Supervivientes/ Inoculados totales
			DTCI	DML	Pre	Post	
PK A96DK	4	0	5,5	5,3	< 4	> 1-256	4/4
"	46	10	10	10	< 4	1-160	4/4
"	4	10	10	10	< 4	1-96	4/4
"	4	10	10	10	< 4	1-56	4/4
"	4	10	10	10	< 4	< 4	2/2
PK A96DK	2	0	5,5	4,9	< 4	< 1-256	4/4
"	56	10	10	10	< 4	1-160	4/4
"	4	10	10	10	< 4	1-96	4/4
"	4	10	10	10	< 4	1-45	4/4
"	4	10	10	10	< 4	---	1/8
Testigos (Inoculados con 10 ^{7,2} DML ₅₀)	8	---	---	---	4	---	---

1 Ganado

Se hizo ensayo para determinar la eficacia de una vacuna PRI secada por congelación en ganado, 6 meses después de la vacunación, por inoculación intramuscular con un virus "Street", NLDC ~~1~~ 1545 que había experimentado un paso a través de glándula salival de perro.

5 Como se muestra en los datos de la Tabla V siguiente, la vacuna PRI empleada dio protección con una dosis de alrededor de 100 DTIC₅₀.

10

TABLA V

EFICACIA DE LA VACUNA DE VIRUS DE RABIA EN GANADO

FRENTE A INOCULACION CON VIRUS "STREET" *

Ternero No.	Dilución de la vacuna	Concentración/ml (Log)		Anticuerpo		Supervivientes Nº inoculados
		DTCI	50	Pre	Post *	
243	⁰ 10 (húmedo) 2ml	5,5		< 1-2	> 1-512	Superv.
244	"	"		< 1-2	1-64	"
245	"	"		< 1-2	> 1-512	"
246	⁰ 10 (liofilizado) 2ml	4,8		< 1-2	> 1-128	Superv.
247	"	"		< 1-2	> 1-128	"
250	"	"		< 1-2	> 1-128	"
248	⁻¹ 10 (liofilizado) 2ml	3,8		< 1-2	ND	No inoculado ***
251	"	"		< 1-2	1-64	Superv.
252	"	"		< 1-2	1-64	"

TABLA V (continuación)

Ternero No.	Dilución de la vacuna	Concentración/ml(Log ₁₀) DTCI	Anticuerpo		Supervivientes Nº inoculados
			Pre	Post *	
253	10 ⁻² (liofilizado) 2ml	2,8	< 1-2	1-16	Superv.
254	"	"	< 1-2	> 1-128	"
255	"	"	< 1-2	1-16	"
256	10 ⁻³ (liofilizado) 2ml	1,8	< 1-2	1-8	Superv.
257	"	"	< 1-2	1-2	"
258	"	"	< 1-2	1-16	"
259	10 ⁻⁴ (liofilizado) 2ml	0,8	< 1-2	1-8	Superv.
260	"	"	< 1-2	1-2	Muerto por rabia
261	"	"	< 1-2	< 1-2	No inoculado ***
219	Testigo	—	< 1-2	< 1-2	Muerto por rabia
220	"	—	< 1-2	< 1-2	Superv.
228	"	—	< 1-2	< 1-2	Muerto por rabia

(*) Inoculado 6 meses después de la vacunación

(**) Inoculado con 10^{6,06} DMI₅₀

(***) Destruído - Se rompió la pata antes de la inoculación.
Vac. - PK₂A149

1 Gatos

La eficacia de la vacuna PRI de la rabia en gatos se muestra por los resultados serológicos dados en la Tabla VI siguiente.

TABLA VI

EFICACIA SEROLOGICA DE LA VACUNA PRI
DE VIRUS DE RABIA EN GATOS

Gato #	Dilución del virus	Concentración en ratón por 0,03 ml	DL ₅₀ en ratón por 1,0 ml	Concentración de TC por 0,1 ml	DTCL ₅₀ por 1,0 ml	Anticuerpo		Log. Converter.
						Pre	Post	
746	10 ⁰	3,91	268,500	6,0	10.000.000	<4	64	24 ⁺
747	"	"	"	"	"	"	64	+
752	"	"	"	"	"	"	128	+
751	"	"	"	"	"	"	>128	+
754	10 ¹		26.850		1.000.000	<4	32	+
757	"		"		"	"	64	+
743	"		"		"	"	32	+
741	"		"		"	"	64	+
727	10 ²		2.685		100.000	<4	32	06086 ⁺

TABLA VI (continuación)

Gato #	Dilución del virus	Concentración en ratón por 0,03 ml	DL ⁵⁰ en ratón por 1,0 ml	Concentración de TC por 0,1 ml	DTCL por 1,0 ml	Anticuerpo			Conver.
						Pre	Post Vac.*	Post *k	
748	10 ²		2,685		100.000	4	16		+
725	"		"		"	"	16		+
744	"		"		"	"	16		+
745	10 ³		268,0		10.000	< 4	8		+
739	"		"		"	"	8		+
818	"		"		"	"	16		+
883	"		"		"	"	4		+
884	10 ⁴		26,8		1.000	< 4	8		+
885	"		"		"	"	8		+
886	"		"		"	"	16		+
887	"		"		"	"	4		+
889	10 ⁵		2,68		100	< 4	4		+
890	"		"		"	"	4		+

Hoja n.º 25

06086

TABLA VI (continuación)

Gato #	Dilución del virus	Concentración en ratón por 0,03 ml	DL ⁵⁰ en ratón por 1,0 ml	Concentración de FC por 0,1 ml	DFCL por 1,0 ml	Anticuerpo			Conver.
						Pre	Post Vac.*	Post**	
891	10 ⁵		2,68		100	4	8	+	
892	"		"		"	"	4	+	
801	10 ⁶		0,268		10	< 4	< 2	-	
802	"		"		"	"	< 2	-	
803	"		"		"	"	< 2	-	
804	"		"		"	"	< 2	-	
807	10 ⁷		0,0268		1	< 4	< 2	-	
808	"		"		"	"	< 2	-	
809	"		"		"	"	< 2	-	
810	"		"		"	"	< 2	-	
812	Cont.					< 4	< 2	-	
813	"					"	< 2	-	

Gato #	Dilución del virus	Concentración en ratón por 0,03 ml	DL ⁵⁰ en ratón por 1,0 ml	Concentración de TC por 0,1 ml	DTCL por 1,0 ml	Anticuerpo		Post ** inoculac.	Conver.
						Pre	Post		
814	Cont.					4	< 2		-
815	"					"	< 2		-

Hoja núm. 27

Vac. = ERA + 96 pasos en PK A + 23 pasos en DK₂

* 36 días después de la vacunación.

** No se hizo inoculación.

1 SEGURIDAD.

Para valorar la seguridad de la vacuna PRI, se vacunaron perros y gatos y se observaron los síntomas de rabia y otros efectos desfavorables. Durante un período de
5 dos años se vacunaron 914 perros y más de 100 gatos. Un control cuidadoso reveló que no hubo ninguna reacción ni enfermedad posterior.

De modo similar, los ensayos en cerdos y otros animales domésticos mostraron que las vacunas PRI de virus
10 de rabia de la invención eran vacunas seguras y efectivas para la prevención de la rabia en animales.

15 REIVINDICACIONES

20 Los puntos de invención propia y nueve 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:

25 1ª.- Un método de preparación de un nuevo virus vivo de la rabia, que muestra un efecto citopático de importancia reproducible en células PK₂A que se correlaciona directamente con la concentración de virus, adecuado para
30 inmunizar animales contra la rabia, método que comprende pasar el virus de rabia de la cepa ERA por cultivos de tejido

1 de células PK₂A durante al menos 60 veces, y hacer pasar des-
pués dicha cepa a través de células primarias renales cani-
nas.

5 2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, pa-
ra la preparación de un nuevo virus vivo de rabia que mues-
tra un efecto citopático de importancia reproducible en cé-
lulas PK₂A que se correlaciona con la concentración del vi-
rus, método que comprende inocular células de la serie celu-
lar PK₂A con virus de rabia vivo de la cepa ERA, incubar di-
10 cho virus y células en un medio nutriente de cultivo de teji-
do durante un tiempo suficiente para el desarrollo y la mul-
tiplicación de dicho virus, recolectar dicho virus, y repe-
tir dicha incubación y recolección de dicho virus en al me-
nos 60 cultivos consecutivos de células PK₂A a intervalos de
15 aproximadamente 4 a 7 días.

20 3ª.- Método según la reivindicación 1ª, para
la preparación de un nuevo virus de rabia que muestra un efec-
to citopático de importancia reproducible en células PK₂A que
se correlaciona con la concentración del virus, y que es ade-
cuado para inmunizar animales frente a la rabia, método que
comprende inocular células de la serie celular PK₂A con vi-
rus de rabia vivo de la cepa ERA, incubar dicho virus y di-
chas células en un medio de cultivo de tejido a una tempera-
tura de aproximadamente 32-39°C durante un tiempo suficiente
25 para el desarrollo y la multiplicación de dicho virus, reco-
lectar el virus, repetir dicha incubación y recolección de
dicho virus en al menos 60 cultivos consecutivos a interva-
los de aproximadamente 4 a 7 días, inocular células renales
de perro con dicho virus, incubar dichos virus y células en
30 un medio de cultivo de tejido a una temperatura de aproxima-

1 damente 32 a 39°C durante un tiempo suficiente para el desa-
rrollo y la multiplicación de dicho virus, recolectar dicho
virus de dichas células renales de perro, y repetir la incu-
bación y la recolección citadas de dicho virus en al menos 5
5 cultivos consecutivos de dichas células renales de perro.

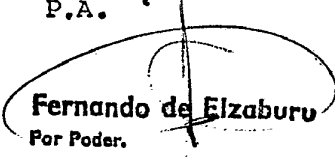
4º.- Un método de preparación de una nuevo vi-
rus vivo de la rabia.

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

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

MADRID, 04.FEB.1977

15 P.A.


Fernando de Elizaburu
Por Poder.

20

25

30
CGD.