

20 JUL. 1978

ES
11
21
22

NUMERO	466.359	10 A1
FECHA DE PRESENTACION	26-1-78.	



PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
3258/77	26 de enero de 1.977	INGLATERRA

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

54 TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR VACUNAS VIVAS E INACTIVADAS DEL VIRUS DE LA RABIA.

71 SOLICITANTE (S)
GIST-BROCADES N.V.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
1, Wateringseweg, Delft, Holanda

72 INVENTOR (ES)
Gosse Bijlenga.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO.

La presente invención se refiere a un procedimiento para aislar una nueva cepa de virus de la rabia; a un procedimiento para preparar nuevas vacunas de cultivos de células vivas o inactivadas, a partir de la nueva cepa; y a un procedimiento para inmunización de animales de sangre caliente utilizando tales vacunas.

Más particularmente, la presente invención se refiere a un proceso para aislar una nueva cepa del virus, identificada en lo sucesivo como cepa 675, por una selección en placa específica para el efecto citopático in vitro, seguido por tres purificaciones clonales. Además, la presente invención se refiere particularmente a la producción de nuevas vacunas de cultivos de células vivas o inactivadas, y a su administración antes y después de la exposición, por diversas vías, tanto a los animales domésticos y salvajes como al hombre. El tipo vivo de esta vacuna es muy apropiado para administración oral. La administración oral es muy conveniente para la inmunización (que en lo sucesivo denominaremos "vacunación oral"), por ejemplo, de corros. Las vías de administración tanto oral como otras no parenterales, tales como la administración intestinal o intranasal por pulverización, a otros animales salvajes epidemiológicamente importantes, a los animales domésticos y a los seres humanos, forman también una característica de la presente invención.

Es conocida la lucha contra las infecciones virales de la rabia en los animales de sangre caliente por la administración parenteral preventiva de vacunas (por ejemplo, las vacunas Flury LEP (Paso reducido por huevos) o HEP (Paso elevado por huevos), que se obtuvieron como se describe a continuación.

El 29 de enero de 1939 murió, en el Estado de Geor-

gia, EE.UU., una niña llamada Flury, diagnosticándose la rabia como causa de su muerte, después de infección por un perro rabioso. El virus de la rabia fué aislado del cerebro, las glándulas lacrimales y las glándulas salivares de la niña por medio de inoculación intracerebral en ratón blanco, según se describe en Leach C.N. y Johnson H.N., Amer. J. Trop. Med. 1940, 20: 335.

El material del cerebro de los ratones se inoculó intracerebralmente en pollos de un día y posteriormente se efectuaron 136 pasos intracerebrales en pollos, según Koprowski H. y Cox H.R., J. Immunol, 1948, 60: 533. Después de dos pasos intracerebrales adicionales en pollitos, el virus de la rabia se adaptó a los embriones de pollo por medio de una inoculación del saco vitelino (yema). Después de 60 pasos por el saco vitelino, el virus aparecía prácticamente apatogénico para una serie de mamíferos y se encuentra disponible, a nivel de estos pasos seriados como vacuna de la rabia para los perros con el nombre de vacuna Flury LEP. Después de otros pasos más por embriones de pollo (hasta unos 170-174 pasos), se comprobó que el virus había perdido mucha más patogenicidad, hasta el punto de que ratones de laboratorio de dos semanas de edad no morían después de administración intracerebral, aunque los ratones lactantes seguían muriendo. Esta vacuna se encuentra disponible con el nombre de vacuna Flury HEP (vacuna Flury de paso elevado por huevos).

Aunque estas vacunas LEP y HEP han sido eficaces en la prevención de la infección de la rabia cuando se utilizan como vacunas previas a la exposición, sigue existiendo la necesidad de otras vacunas de la rabia, como ha quedado demostrado por nuevas y recientes medidas de control efectuadas a escala

nacional e internacional. Por ejemplo, el control de la rabia selvática en los países desarrollados, en los que esta enfermedad ha sido endémica durante mucho tiempo, o en los que ha sido introducida más recientemente, es una de las situaciones existentes, difíciles y ecológicamente complicadas, para las que no se dispone de ningún método eficaz y económico de control.

El tratamiento de seres humanos con vacunas posteriores a la exposición ha creado asimismo numerosos problemas en países infectados con el virus de la rabia, de todo el mundo. Por estas razones, la investigación sobre la rabia se ha dirigido a los problemas de la vacunación anterior y posterior a la exposición y a la inmunización por una vía no parenteral, preferentemente oral.

Como resultado de la investigación y experimentación, se ha desarrollado una nueva cepa de vacuna, que puede administrarse por diferentes vías, es decir, que se puede administrar parenteral y no parenteralmente, y que parece proporcionar una protección completa cuando se administra tanto antes como después de la infección con el virus de la rabia.

La posibilidad de una eficaz administración oral, con la finalidad de conseguir la "vacunación oral" de los animales salvajes, que son los más importantes transmisores y/o fuentes de la rabia, se comprenderá que es una de las principales ventajas de la presente invención.

La cepa 675 de vacuna viva es la cepa más apatogénica de las cepas de vacuna de la rabia que se conocen hasta el momento. Ofrece la posibilidad de protección después de exposición a la infección por los virus del exterior o del ambiente, incluso con el uso de una sola dosis adecuada de vacuna.

La vacuna inactivada preparada con esta cepa 675 protege igualmente después de la exposición, pero en menor grado. La vacuna viva posee un elevado grado de antigenicidad, que alcanza prácticamente en los mismos valores el tipo inactivado de vacuna. Las vacunas vivas e inactivadas son vacunas del tipo de cultivo de células, prácticamente libres de proteínas extrañas, lo que disminuye sustancialmente, si no totalmente, el grado de reacciones colateral indeseables.

La nueva cepa del virus se aisló del siguiente modo:

El virus de la vacuna Flury HEP se propagó en fibroblastos primarios o secundarios de embriones de pollo SPF, y fué también identificado como el virus de la rabia con ayuda de inmunofluorescencia específica de los fibroblastos infectados, por una prueba de protección del ratón a través de vacunación intraperitoneal, seguida por la administración de un virus normalizado provocador de la rabia (CVS) y por pruebas de seroneutralización in vitro con suero positivo conocido (Suero internacional de Referencia de la Rabia).

Podrá apreciarse que para la propagación de la vacuna Flury HEP de partida, puede aplicarse otras líneas celulares susceptibles a la rabia y cepas de células diploideas, en lugar de los fibroblastos de embriones de pollo SPF.

Con el uso del procedimiento de prueba en placa en los fibroblastos de embrión de pollo (SPF), según Yoshina, K et al., Arch. ges. Virusforsch., 1966, 18: 370 y el procedimiento de suspensión de células en placas, según Bijlenga, G y Joubert, L., Bull. Soc. Sci. Vét. et Méd. Comparée, Lyon, 1974, 76: 429, se pudo aislar una placa, que difería claramente de la población de virus de partida en su efecto citopático en las células infectadas. Esta placa se reprodujo agámicamente tres ve

ces a fin de obtener una población pura y homogénea de virus.

A la placa aislada originalmente se le asignó el número 675 y a la cepa, después de purificación, como cepa nº675 de la vacuna de la rabia. Una muestra de esta cepa se depositó el 13 de enero de 1977 en la Colección Nacional Checoslovaca de Cultivos Tipo del Instituto de Higiene y Epidemiología de Praga, encontrándose allí registrada con el número CNCTC AO 4/77.

La cepa se puede distinguir del virus Flury HEP original en las siguientes características:

a) Un efecto citopático muy pronunciado en los cultivos de células in vitro, un efecto que no es provocado por el virus Flury HEP;

b) Un ciclo primario del virus más corto, que varía entre las 9 y las 11 horas, provocando una aparición más rápida de las placas;

c) Placas muy claras, que son como media algo más anchas (1 mm más anchas) en su diámetro, que las placas del virus HEP;

d) Una mejor capacidad de fijación a la superficie de las células in vitro, cuya característica es esencial para una vacuna oral adecuada;

e) Una producción más rápida de interferón in vivo después de la vacunación, debido a las propiedades anteriormente mencionadas. Esta propiedad es importante para la vacunación después de la exposición;

f) En los cultivos de células se obtienen títulos más elevados;

g) Por purificación clonal se obtienen poblaciones de virus homogéneas, dando lugar a un menor riesgo de posible

reversión de la cepa del virus a su virulencia original, cuya reversión puede excluirse prácticamente.

h) Es la cepa de la rabia más apatogénica de las conocidas hasta el momento.

5 Se comprenderá que las características indicadas en los puntos a) - h) muestran una clara distinción del virus Flury HEP original.

10 Se comprenderá que la presente invención incluye dentro de su ámbito unas cepas mutantes artificiales derivadas de la cepa nº 675 del virus y que tiene las propiedades de la cepa nº 675 que se han descrito anteriormente.

15 En cuanto a las características arriba mencionadas, particularmente la del punto g), se facilita la preparación de lotes de vacuna con calidad constante, es decir, que se pueden preparar vacunas de una mayor consistencia en sus características a partir de la cepa nº 675 del virus según la presente invención.

Las vacunas que forman otra característica de la presente invención muestran las siguientes ventajas:

20 (1) Como ocurre en la vacuna Flury HEP original, la vacuna de virus vivo según la presente invención no se multiplica después de la administración, no pudiéndose detectar ningún virus residual;

25 (2) Las vacunas provocan una producción muy rápida de interferón y otras propiedades adicionales y desconocidas de interferencia, por ejemplo, inmunidad celular mediada. Una sola administración de la vacuna después de infección experimental con un virus que se presenta naturalmente puede proporcionar completa protección. Dada la rapidísima producción de interferón y la inmunidad celular mediada, la aplicación de las

30

vacunas de la presente invención para la protección de animales recién expuestos, durante los brotes de rabia, es algo factible. Particularmente ha mejorado considerablemente la posibilidad de tratamiento con vacuna después de la exposición de seres humanos, ya que se ha demostrado que las vacunas son muy eficaces en animales después de exposición a la infección, y puede incluso conseguir la curación de animales que se encuentran en un estado muy avanzado de infección.

(3) La administración no parenteral, por ejemplo, por vía oral, de la vacuna de virus vivo, facilita su uso en campañas organizadas de vacunación.

La vacuna de virus vivo preparada con la cepa 675, tiene las posibles ventajas siguientes para la vacunación previa a la exposición:

A) En animales:

1. Inmunización de zorros y otros animales salvajes epidemiológicamente importantes, con ayuda de cebos que contengan la vacuna de la rabia.

2. Vacunación oral de animales domésticos, por ejemplo, los perros callejeros, en los países en los que está prohibido sacrificarlos por razones religiosas y/o legislativas.

3. Administración en gran escala de la vacuna de virus vivos por medio de cebos, de manera que se puedan simplificar notablemente las campañas de vacunación. Por ejemplo, distribución de bolas de carne opcionalmente congelada conteniendo la vacuna del virus por medio de una avioneta.

4. Una eficaz protección de los animales domésticos después de la exposición, para uso en países en los que están autorizados dichos procedimientos de vacunación y en países en los que los animales pueden ser encerrados después de la exposición.

ción a condición de que hayan sido ya inmunizados.

B) En humanos:

5 1. El temor a la vacunación oral es mínimo. El temor a la inyección es un factor muy importante en algunos países y provoca una reducción en el número de pacientes que vuelven para el número necesario de inyecciones.

10 2. La administración por vía oral no provoca reacciones o irritaciones locales, que representan un auténtico inconveniente de las vacunas de la técnica anterior, actualmente disponibles a escala comercial.

3. Se hace posible la administración fácil en gran escala y por personal no entrenado médicamente (como ocurre con la vacunación oral contra la poliomielitis).

15 A este respecto, se comprenderá la importancia del hecho de que se haya comprobado la eficacia de una sola administración de la vacuna.

20 Las nuevas vacunas se preparan por los procedimientos habituales, es decir, cultivos de células in vitro, por aplicación de los controles habituales y prescritos para la eliminación de las contaminaciones bacterianas y/o virales, de acuerdo con los principios universalmente reconocidos y los requisitos de las normas internacionales.

25 Las nuevas vacunas de la presente invención se preparan preferentemente haciendo crecer los virus de la rabia en monocapas de fibroblastos primarios o secundarios de embriones de pollo, obtenidos de embriones de pollo de 10 días SPF. No obstante, también se pueden utilizar otros sistemas celulares que sean suficientemente susceptibles a la infección de la rabia (como las demás células de origen avícola ó células de mamíferos, como por ejemplo, el riñón de cría de hamster BHK 21 (21

30

pasos) para cultivo en monocapa p el BHK-21 13 S (13 pasos de cultivo en suspensión) para cultivos suspendidos, pero en este caso únicamente para vacunas de uso en animales). El sistema de cultivo de células en suspensión tiene la gran ventaja de permitir la producción de las vacunas del virus en fermentadores de gran capacidad, lo que facilita la producción.

Las vacunas se pueden preparar asimismo en células cultivadas en micro-vehículos (sistema de cultivo de células en cordones). Por ejemplo, se pueden usar unos cordones de polidextrano, tratados con aniones macromoleculares antes y/o durante el crecimiento de las células, siempre que tengan en su superficie una densidad de carga positiva adecuada para el crecimiento de las células. De este modo, a una suspensión agitada de células y cordones en un medio líquido se le inocularía el virus deseado y, después de propagación del virus, los cordones se hundirían al fondo del reactor, separándose de la suspensión de virus.

En un procedimiento específico para la preparación de las vacunas, los fibroblastos de embrión de pollo se infectan con la cepa nº 675 del virus de siembra de la rabia, con una multiplicidad de infección de 0,02 por 1 pfu/célula, prefiriéndose un período de infección de al menos una hora. Después de retirados los virus que no se hayan fijado, se añade un medio de mantenimiento, formado preferentemente por Eagle Basal Medio (BME) en solución salina de Earle, a la que se añaden cantidades apropiadas de antibióticos y por ejemplo, 100 UI de penicilina y 100 microgramos de estreptomycinina y de un 0,2 a un 0,5% de albúmina. Hay que llevar cuidado de asegurarse de que el pH del medio de conservación se mantenga en 8,0-8,2. Las células infectadas con el virus se incuban a 32-39°C durante 3-10 días, y acto seguido se congela el medio a -70°C o menos a fin

de disgregar las células y liberar el virus (aumentando el título). Las células y los residuos de las células se retiran por filtración o centrifugación en condiciones estériles. El filtrado o líquido sobrenadante se almacena a -70°C , y se toman muestras para titulación por el procedimiento de colocación en placas in vitro a que anteriormente se ha hecho referencia. Se comprenderá que se pueden utilizar otros procedimientos para disgregar las células después de la incubación, por ejemplo, sometiendo la suspensión celular a vibración ultrasónica.

Según otra variante específica del procedimiento de preparación, unas células BHK-21 13S se hacen crecer en suspensión, por ejemplo en un matraz con agitador con barra para colgar, utilizando medio BHK-21 para cultivo rotativo al que se añaden pequeñas cantidades de suero de ternera inactivado, 7-15% caldo de fosfato de triptosa 7-15% y antibióticos (por ejemplo, 100 UI de penicilina y 100 microgramos de estreptomycin). Las células se dejan crecer hasta que se alcanza un nivel de aproximadamente 2×10^6 células/ml, mientras que las células se agitan suficientemente con el fin de mantenerles en suspensión y evitar que se arracimen entre sí.

Después de hacer girar las células por medio de una centrífuga, se lleva a cabo la infección con la cepa 675 de virus de siembra de la rabia en una multiplicidad de infección entre 0,01 y 1 pfu/célula, durante 30 - 60 minutos bajo constante agitación.

Después de la infección, las células se suspenden de nuevo en el frasco rotativo y se añade el medio de mantenimiento consistente en medio de cultivo BHK-21 al que se añaden pequeñas cantidades de la fracción V de alúmina de suero bovino, por ejemplo 0,1-0,4% en peso, y antibióticos (por ejemplo, kanamicina o neomicina), en una cantidad de, por ejemplo 50-300 microgramos, al

mismo tiempo que se ajusta el pH entre 7,5 y 8,0. Durante la infección, la temperatura se mantiene a 30-35°C, con preferencia a 33°C, y todos los días se retira para examen una pequeña muestra del matraz giratorio por medio de la técnica de la inmunofluorescencia. Entre 2-3 días después de la infección, de un 80 a un 100 % de las células de estas muestras mostrarán una inmunofluorescencia específica para los cuerpos de inclusión de la rabia en su citoplasma, correspondiendo a un título de 10^8 a 10^9 pfu/ml en la recolección al día 4-6 después de la infección. En la recolección, el líquido se retira del matraz y se conserva congelado a -70°C.

Después de retiradas las células y los residuos celulares se titula una pequeña muestra por el procedimiento de titulación en placa. Si se ha alcanzado un título aceptable (entre $10^{7,5}$ y $10^{8,5}$ pfu/ml o superior), las células y los residuos celulares se retiran de lo recogido por centrifugación o filtración en condiciones estériles.

Después de añadir un estabilizador apropiado, el fluido está ya dispuesto, por ejemplo, para su distribución en viales para liofilización del producto final.

Se comprenderá que dentro del ámbito de la presente invención se incluyen igualmente las vacunas de la rabia de virus muertos (inactivados), preferentemente para uso humano.

Estas vacunas de la rabia inactivadas pueden prepararse inactivando los virus en los fluidos de cultivo preparados por procedimientos conocidos o modificaciones de los mismos, por ejemplo, por adición de beta-propiolactona, formalina o acetiletileneimina, o por radiación ultravioleta.

Se comprenderá que las vacunas de la rabia, derivadas de la cepa de virus de la presente invención, pueden contener

uno o más estabilizadores, preservativos, sales tampón y aditivos adecuados. Por el término administración intestinal, como se emplea en la memoria y reivindicaciones, se quiere dar a entender la administración de las vacunas en una forma en la cual liberación el virus de esta invención al intestino.

5

La presente invención se ilustra por los ejemplos siguientes:

EJEMPLO 1

Las monocapas de fibroblastos primarios o secundarios de embrión de pollo SPF, crecidos en frascos fijos o giratorios, se infectan con la cepa 675 de virus de siembra de la rabia, con una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,02 a 1 pfu/célula. También se pueden utilizar cantidades menores del virus, pero en ese caso se prolonga el periodo de incubación. Para que el virus de siembra se fije a las células se necesita un periodo mínimo de infección de una hora. Acto seguido se retira el virus restante que no se ha fijado y se añade el medio de mantenimiento, consistente en Eagle medio Basal (BME) en solución salina de Earle, a la que se añaden cantidades apropiadas de antibióticos y un 0,2 % de albúmina de las especies correspondientes en las que vaya a utilizarse la vacuna, cuidando de que la mezcla final del medio de conservación tenga un pH de 8,2.

10

15

20

25

30

La incubación a 33-35°C durante un periodo de 4 a 8 días de las células infectadas con el virus da como resultado un pronunciado CPE (efecto citipático), y a continuación se congela el medio a -70°C. Acto seguido se retiran las células y los residuos celulares, después de descongelar el producto por centrifugación a 1.000 rpm. o por filtración a través de un filtro de membrana (5 micras de tamaño de poro) en condiciones estériles. El fluido, tanto sobrenadante como filtrado, se almacena a -70°C y se toman muestras para fines de titulación por el método de colocación en placas in vitro anteriormente

mencionado (Bijlengs y Joubert).

5 Los títulos aceptados para lotes de vacunas que se vayan a utilizar para vacunación efectiva después de exposición son de 10^8 pfu/ml. Para vacunación antes de la exposición se pueden aceptar títulos mínimos de hasta 10^7 pfu/ml.

10 La producción de lotes de vacuna tal como se acaba de describir se controla por las pruebas habituales de potencia (prueba NIH y de Habel), y para los lotes que se vayan a utilizar para tratamiento después de la exposición, se incluye un nuevo método de prueba de potencia, según Bijlenga, G., Simposio sobre adelantos en la Investigación sobre la Rabia, Georgia EE.UU., 7-9 de septiembre de 1976, página 14.

15 En esta nueva prueba de potencia, virus locales tomados en la calle se administran intramuscularmente (i.m.) a ratones de 4 semanas de edad, seguido por una sola inoculación intraperitoneal de 0,5 ml de vacuna en un plazo de 24 horas. Todos los ratones vacunados deben sobrevivir, mientras que habrán muerto aproximadamente un 50 % de los ratones de control antes del final de la 3ª semana del periodo de ensayo.

20 De acuerdo con los requisitos mínimos establecidos internacionalmente, se siguen también los habituales controles de las pruebas de esterilidad para posible contaminación bacteriana o viral de los lotes de vacuna, junto con los procedimientos para el control de las células primarias o secundarias y las líneas de células empleadas para la producción de las vacunas.

EJEMPLO II

30 Unas células BHK-21 13S se hacen crecer en suspensión en un matraz rotativo de Ballico con una barra para colgar, utilizando medio NHK-21 para cultivo rotativo al que se añaden un

10 % de caldo de fosfato de triptosa y un 10 % de suero de ternera inactivado, en presencia de antibióticos (100 UI de penicilina y 100 microgramos de estreptomycin). Las células se hacen crecer hasta que se alcanza un nivel de 2×10^6 células/ml, mientras que las células se agitan suficientemente para mantenerlas en suspensión y evitar que se arracimen entre sí.

Después de hacer girar las células a 800 r.p.m. por medio de una centrífuga, se procede a infección con cepa 675 de virus de siembra de la rabia en una multiplicidad de infección entre 0,01 y 1 pfu/célula durante 45 minutos bajo agitación constante.

Después de infección, las células se suspenden de nuevo en el matraz agitador y se añade el medio de conservación, consistente en medio de cultivo agitador BHK-21 al que se ha añadido un 0,2 % de la fracción V de albúmina de suero bovino, junto con cantidades apropiadas de antibióticos aceptables (por ejemplo, kanamicina o neomicina), al mismo tiempo que se ajusta el pH a 7,8. Durante la infección, la temperatura se mantiene a 33°C y todos los días se retira para examen por la técnica de la inmunofluorescencia una pequeña muestra del matraz agitador. Entre dos a tres días después de la infección, de un 80 a un 100 % de las células de estas muestras deberían mostrar una inmunofluorescencia específica para los cuerpos de inclusión de la rabia en sus citoplasmas, lo que a su vez garantiza un título adecuado de 10^8 a 10^9 pfu/ml al recogerse a los 4-6 días después de la infección. En la recogida, el líquido se retira del matraz y se mantiene congelado a -70°C . Una pequeña muestra de lo recogido se mantiene separadamente para titulación después de retirar las células y los residuos celulares por el procedimiento de titulación en placa. Si el título es aceptable (entre $10^{7,5}$ y $10^{8,5}$ pfu/ml o más), las cé

	Nº de identificación del zorro	Edad en el momento de la vacunación (11.8.75)	Título del suero en UI [*]			Ataque ^{**}
			(11.9.75)	(7.10.75)	(21.11.75)	(23.12.75)
Animales	84	5 meses	4,0	7,0	8,2	Protegido
vacunados	86	6 meses	1,3	1,6	1,4	"
oralmente	88	6 meses	2,0	2,4	3,2	"
controles	83	6 meses				murió a los 15 días
(animales vacunados)	85	6 meses				murió a los 17 días
	92	6 meses				murió a los 18 días

* Una U.I. (Unidad Internacional) = una dilución en suero de 1/300, cuya dilución proporciona una lectura de punto final de reducción en placa del 50 %.

5 ** Para probar el valor protector de la vacuna se utilizó una dosis muy elevada del virus de ataque (de las glándulas salivares de zorra infectada naturalmente), a saber 1.391.610 MLD₅₀.

10 Este experimento muestra la eficacia de la vacunación oral de jóvenes zorros. Las respuestas inmunitarias de los zorros demostraron una adecuada seroconversión y buenos títulos. Más de cinco meses después de la vacunación, los tres zorros continúan totalmente protegidos y los tres zorros de control murieron después de períodos muy cortos de incubación, lo que se debe a la elevadísima dosis del virus de ataque inoculado intra

15 muscularmente en la pata trasera derecha. Una dosis habitual

pea a un nivel de 0,2 U.I./ml.

C.- Protección de ratones de laboratorio después de infección con virus vivo de animal salvaje (de zorro).

5	Tipo de vacuna	Intervalo entre la infección y la vacunación									
		1 hora	1 día	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días	8 días	9 10 días
	Vacuna viva 675 [¶]										
10	No diluida	0/10 ^{¶¶}	1/10	1/10	1/10	2/10	0/10	0/10	4/10	5/10	3/10
	10 ⁻¹	1/10									
	10 ⁻²	4/10									
	10 ⁻³	6/10									
	10 ⁻⁴	8/10									
15	Controles	6/10	8/10	7/10	7/10	7/10	7/10	6/10	6/10	6/10	8/10
	Vacuna inactivada 675 [¶]										
20	No diluida	0/10	1/10	5/10							
	10 ⁻¹	1/10									
	10 ⁻²	6/10									
	10 ⁻³	8/10									
25	10 ⁻⁴	6/10									

¶ Título de la vacuna 10^{8,2} pfu/ml (para vacuna inactivada el título se determinó antes de la inactivación).

30 ¶¶ Número de fallecimientos/número de ratones inoculados.

~~xxx~~ Dos vacunaciones (Los días 9 y 11).

5 Todos los ratones indicados en esta tabla recibieron intramuscularmente una inoculación de virus de la rabia de la glándula salivar del zorro (solución 0,1 ml) que mató el 60-80 % de los controles, con un período de incubación de 9 a 11 días.

10 La cepa 675 de vacuna viva e inactivada se administraron en una sola dosis (0,5 ml) intraperitonealmente a diversos períodos después de la infección inicial tal como se indica en la Tabla.

15 La vacuna viva no diluida protegía todavía 6 días después de la infección, lo que nunca se había observado en ninguna otra vacuna comercial disponible. Esta protección demuestra que incluso después de que el virus de la rabia ha alcanzado el sistema nervioso central, pueden curarse los ratones.

20 Con dos vacunaciones a intervalo de un día y comenzando nueve días después de la infección, algunos de los ratones quedaron todavía protegidos.

Esta vacuna viva podría diluirse también hasta diez veces y proporcionar protección, pero no más de 24 horas después de la infección.

25 La vacuna inactivada protegía sólo cuando se aplicaba dentro de las 24 horas siguientes a la infección, y también podía diluirse, pero no más de diez veces.

30 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.

REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento para preparar vacunas vivas e inactivadas del virus de la rabia, para administración parenteral y no parenteral, por ejemplo, oral ó intestinal, caracterizado porque las vacunas se derivan de la cepa de nueva especie nº675 del virus de la rabia, depositada con el número CNCTC AO 4/77 por los procedimientos habituales, a saber, cultivos de células in vitro, por aplicación de los controles habituales y prescritos para eliminar las contaminaciones bacterianas y/o virales.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el virus resultante se incorpora opcionalmente en un medio para administración oral, intestinal o parenteral.

15 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las vacunas se preparan haciendo crecer el virus de la rabia en sistemas celulares suficientemente susceptibles a infección de la rabia de células de origen avícola ó células de mamíferos, congelar la suspensión de células a -70°C o menos y/o someter la suspensión de células a vibración ultrasónica a fin de disgregar las células y liberar el virus, seguido por retirada de las células y los residuos celulares por filtración o centrifugación en condiciones estériles, seguido optativamente por inactivación del virus en los fluidos de cultivo.

25 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque unos fibroblastos de embrión de pollo se infectan con la cepa nº 675 del virus de siembra de la rabia, teniendo una multiplicidad de infección de 0,02 a 1 pfu/célula, siendo el período de infección de al menos una hora, y añadiéndose un medio de conservación a un pH de 8,0 a 8,2, después de retirada de los virus que no se han fijado, seguido por incubación de las células infectadas por virus a $32-39^{\circ}\text{C}$ durante 3-10 días,

30
R9

procediéndose a congelar el medio y las células a -70°C o menos y a la posterior filtración y centrifugación en condiciones estériles, seguido optativamente por inactivación del virus en los fluidos de cultivo.

5 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque como medio de conservación se utiliza medio Basal de Eagle (BME) en solución salina de Earle, a la que se añaden cantidades apropiadas de antibióticos y de un 0,2 a un 0,5% de albúmina.

10 6.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque unas células de riñón de cría de Hanster 21 (21 pasos) 13 S (13 pasos de cultivo de suspensión), crecidas en suspensión en un matraz rotativo, en un medio BHK-21 para cultivo rotativo, al que se han añadido pequeñas cantidades de caldo de fosfato de triptosa, suero inactivado de ternera y antibióti-
15 cos, hasta un nivel de aproximadamente 2×10^6 células/ml, se infectan con la cepa 675 del virus de siembra de la rabia, en una multiplicidad de infección entre 0,01 y 1, pfu/célula bajo agitación, seguido por incubación del virus en suspensión en me-
20 dio de conservación a un pH entre 7,5 y 8,0 y a una temperatura de 32 a 35°C durante 4-6 días después de la infección, congelando el medio de células a -70°C o menos, y filtrando o centrifugando después en condiciones estériles, seguido optativamente por inactivación del virus en los fluidos de cultivo.

25 7.- Procedimiento para preparar vacunas vivas e inactivadas del virus de la rabia, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 23 hojas escritas a máquina
por una sola cara.

Madrid,

17 MAYO 1978

GIST-BROCADES N.V.

J. M. GONZALEZ ALBA Y COMPA
p. p. Firmado: J. Susa

APR 7