

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

10 ES	11 NUMERO	10 A1
	466.758	
	21 FECHA DE PRESENTACION	
	7-FEBRERO-1978	

**PATENTE DE INVENCION**

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
766.995	9-2-1977	Estados Unidos
825.520	17-8-1977	Estados Unidos

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

54 TITULO DE LA INVENCION

" UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO ATENUADO "

71 SOLICITANTE (S)

MERCK & CO., INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

126 East Lincoln Avenue - Rahway, New Jersey - ESTADOS UNIDOS

72 INVENTOR (ES)

Eugene B. Buynak y Maurice R. Hilleman,

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

CM.-

POOR QUALITY

RESUMEN DE LA INVENCION

1  
5  
5 Mediante paso seriado de un virus sincitial respiratorio virulento en fibroblastos diploides de pulmón humano, se produce un virus sincitial respiratorio vivo, no patogénico sino antigénico. Este virus es útil en la preparación de una vacuna de virus vivo.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

10  
15  
20  
25  
30 En general, la invención se refiere a la adaptación y propagación de virus sincitial respiratorio en fibroblastos diploides de pulmón humano. Más especialmente, esta invención se refiere a la puesta a punto de una vacuna viva de virus sincitial respiratorio atenuado después del paso seriado por fibroblastos diploides de pulmón humano. Los fibroblastos WI-38, obtenidos originalmente de un pulmón humano individual, han sido extensamente caracterizados biológica, bioquímica, virológica y genéticamente. De forma análoga, los fibroblastos MRC-5, también obtenidos de un pulmón humano individual pero de un diferente individuo, también están normalizados. Los fibroblastos WI-38 están descritos en Exper. Cell Res. 25, 585 (1961) y están depositados en la American Type Culture Collection (ATCC CCL-75). Los fibroblastos MRC-5 están descritos en Nature 227, 168 (11-7-1970) y están depositados en la American Type Culture Collection (ATCC CCL 171). La propagación de fibroblastos diploides de pulmón humano puede realizarse por cualquiera de los métodos habituales descritos en la bibliografía. Por ej. se preparan fibroblastos diploides de pulmón humano en frascos de vidrio empleando BME (GIB-diploide) suplementado con 10 % de suero de ternera sin

1 calentar como medio de crecimiento. Después de la incubación  
a 36°C durante 48-72 horas, los cultivos pueden ser utili-  
zados para el paso seriado o la preparación de vacunas.

5 El procedimiento de esta invención implica las si-  
guientes etapas: A) aislamiento del virus virulento de una  
cualquiera de diversas células en cultivo y su adaptación a  
los fibroblastos diploides de pulmón humano; B) desarrollo  
del virus vivo atenuado mediante una multiplicidad de pasos  
10 seriados en fibroblastos diploides de pulmón humano y C)  
preparación de la vacuna a partir de este virus vivo atenua-  
do. Estas etapas serán explicadas independientemente.

A. Aislamiento y adaptación del virus virulento.

15 El aislamiento y adaptación del virus sincitial res-  
piratorio puede realizarse en fibroblastos diploides de pul-  
món humano utilizando virus previamente propagados de forma  
conocida en otro tipo de cultivo celular, como por ejemplo  
riñón de mono. El aislamiento en el cultivo celular, por  
ejemplo riñón de mono, puede realizarse a partir de un mate-  
20 rial clínico (v.g. un frotis de garganta). El aislamiento  
puede realizarse mediante uno o más pasos seriados en dicho  
cultivo celular. Después de aislado, el virus se somete a  
unos 3 a 30 pasos seriados, preferiblemente a unos 4 a 15  
pasos seriados, en fibroblastos deploides de pulmón humano.  
25 Estos pasos sirven para adaptar y atenuar el virus. La incu-  
bación de cultivos infectados en fibroblastos diploides de  
pulmón humano puede realizarse a cualquier temperatura entre  
unos 30°C y unos 38°C, preferiblemente alrededor de 30 a 34°C  
(óptimamente alrededor de 32°C) o de unos 35 a 38°C (óptima-  
30 mente alrededor de 36°C).

1           B. Desarrollo de la vacuna sincitial respiratoria viva  
              atenuada.

5           El virus que ha sido aislado y adaptado como se  
              ha descrito en A se introduce en frascos de vidrio que con-  
              tienen fibroblastos diploides de pulmón humano. El medio  
10           de cultivo puede ser cualquiera que mantenga el crecimiento  
              celular y éste puede ser, por ejemplo, el conocido medio ba-  
              sal de Eagle (MBE) o el medio esencial mínimo de Eagle (MEM)  
              en solución salina equilibrada de Eagle (SSE) suplementada  
15           con suero de ternera previamente tamizado. Después de la  
              adición del virus, los cultivos celulares infectados se in-  
              cuban en pasos sucesivos a unos 30 a 38°C, un número de ve-  
              ces eficaz para atenuar el virus pero conservando su antige-  
              nicidad e inmunogenicidad. En general, se requieren alrededor  
20           de 3 a 30 pasos sucesivos a unos 30-38°C y preferiblemente  
              a unos 30-34°C (óptimamente alrededor de 32°C) o a unos 35-  
              38°C (óptimamente alrededor de 36°C). Preferiblemente el vi-  
              rus se incuba durante 4 a 15 pasos sucesivos aproximadamente.  
              Durante estos pasos, el virus es replicado en grán cantidad  
              y se vuelve atenuado.

25           Los pasos seriados anteriores se realizan utili-  
              zando inoculum sin diluir o diluido y se recogen múltiples  
              cosechas a diversos intervalos. Las valoraciones se reali-  
              zan en cultivos celulares HEP-2, ya sea en tubos o en placas  
              de microvaloración Falcon.

30           Después el virus cosechado se almacena congelado o  
              a temperatura baja para preservar su potencia. Antes de la  
              congelación, se agrega un estabilizante adecuado o una com-  
              binación de estabilizantes adecuados como, por ejemplo, sor-  
              bitol o gelatina, en cantidades apropiadas determinadas me-

1     diante ensayos de estabilidad sobre el producto viral conge-  
lado y liofilizado.

C. Preparación de la vacuna a partir del virus atenuado.

5             Se ha hallado que el virus sincitial respiratorio  
recogido después de repetidos pasos seriados, típicamente al  
rededor de 3 a 30 pasos, no es patógeno, para los monos y  
roedores, produce pocas o ninguna reacción clínica en los  
receptores humanos y produce un nivel satisfactorio de anti-  
cuerpos neutralizantes. Después de la valoración para esta-  
10     blecer su potencia, la mezcla de virus se subdivide e in-  
troduce en viales apropiados para uso. El producto puede ser  
almacenado en estado congelado o preferiblemente secado en  
estado congelado y mantenido exento de humedad.

15             Los siguientes ejemplos ilustran esta invención pe-  
ro sin limitarla a los mismos.

EJEMPLO 1

20             Se aísla un virus sincitial respiratorio de una  
muestra de frotis de garganta. Esta inóculum inicial se so-  
mete a dos pasos en un cultivo de células de riñón de mono  
y a cuatro pasos en fibroblastos diploides de pulmón humano  
WI-38. Los fibroblastos diploides de pulmón humano WI-38 se  
preparan en frascos de vidrio utilizando MBE suplementado  
con 10 % de suero de ternera fetal sin calentar como medio  
de crecimiento. Dos días después de la plantación, se decanta  
25     el medio de crecimiento y los cultivos se inoculan con 5,0  
ml por frasco de virus de siembra del cuarto paso sin di-  
luir (si se desea, puede utilizarse virus de siembra diluí-  
do). Después de un periodo de adsorción de 1 hora a 30-34°C,  
se agregan a cada frasco 100 ml de MEM conteniendo 2 % de  
30     suero de ternera fetal sin calentar y se incuba de nuevo a

1 30-34°C. Tres o cuatro días después de la siembra, los cul-  
tivos del frasco se lavan cuatro veces con SSE de Hank, a  
razón de 100 ml por lavado. Después del proceso de lavado,  
5 se agregan a cada frasco 100 ml de MEM conteniendo un esta-  
bilizante viral adecuado, v.g. albúmina humana, y los cul-  
tivos se incuban a 30-34°C. Se incorpora neomicina a una con-  
centración de 50 mcg/ml al medio de crecimiento y manteni-  
miento. Se recogen múltiples cosechas a intervalos de 2-4  
10 días y los cultivos de los frascos se alimentan de nuevo  
con medio de mantenimiento limpio que contiene un estabili-  
zante. Antes de congelar y almacenar a -70°C (frigorífico  
eléctrico), se agrega un estabilizante viral constituido por  
una mezcla de partes iguales de sorbitol y gelatina. Se se-  
leccionan una o más cosechas apropiadas después de completa-  
15 das las valoraciones de infectividad. El material selec-  
cionado se saca del congelador y se descongela. Se toma una  
muestra para control y ensayo de seguridad. Se clarifica el  
líquido residual y se toma una muestra para el ensayo de  
seguridad en monos. Los líquidos se distribuyen en viales  
20 individuales y se liofilizan. Después del ciclo de liofili-  
zación, los viales se tapan, se cierran herméticamente y se  
conservan para su reconstitución como vacuna por adición de  
agua estéril (agua para inyección de la Farmacopea de Esta-  
dos Unidos).

25 La potencia del producto se basa en la valoración  
de la infectividad en un cultivo de células HEP-2.

EJEMPLO 2

30 Se repite el procedimiento del Ejemplo 1 a excepción  
de que se emplean nueve pasos seriados en fibroblastos di-  
ploidés humanos WI-38 en lugar de cuatro.

EJEMPLO 3

Se repite el procedimiento del Ejemplo 1 a excepción de que la temperatura de incubación del virus sincitial respiratorio es de 35 a 38°C en lugar de 30-34°C.

EJEMPLO 4

A ocho niños sin infección previa de virus sincitial respiratorio se administra una dosis de la vacuna de virus sincitial respiratorio atenuado del Ejemplo 1 por vía parenteral. Prácticamente la totalidad de ellos desarrollan un nivel significativo de anticuerpos neutralizantes dentro de las seis semanas que siguen a la vacunación. No se observó ninguna reacción clínica avanzada.

EJEMPLO 5

A once niños sin infección previa por virus sincitial respiratorio se administró una dosis de la vacuna de virus sincitial respiratorio atenuado del Ejemplo 2 por vía parenteral. Prácticamente todos ellos desarrollaron un nivel significativo de anticuerpos neutralizantes dentro de las seis semanas siguientes a la vacunación. No se observó ninguna reacción clínica avanzada.

EJEMPLO 6

Unas muestras de virus preparadas como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2 se congelan y almacenan a -70°C durante más de 18 meses. Al descongelarlas, se halla que la potencia de las muestras ha permanecido prácticamente inalterada.

EJEMPLO 7

Unas muestras de virus preparadas como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2 se liofilizan y almacenan a -20°C du-

1 rante más de 18 meses. Después de reconstituir, se observa  
que la potencia de las muestras ha permanecido esencialmente  
inalterada.

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

REIVINDICACIONES

10 1. Un procedimiento de preparación de un virus sinci-  
tial respiratorio atenuado que comprende el paso seriado de  
un virus sincitial respiratorio en fibroblastos diploides de  
pulmón humano a una temperatura de incubación de unos 30 a  
unos 38°C, durante un número de pasos eficaz para atenuar  
el virus pero manteniendo su antigenicidad e inmunogenici-  
dad y recoger el virus resultante.

15 2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde  
se emplean aproximadamente de 3 a 30 pasos seriados.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde  
se emplean aproximadamente de 4 a 15 pasos seriados.

20 4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde  
los fibroblastos diploides de pulmón humano son fibroblas-  
tos WI-38.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde  
la incubación se lleva a cabo a unos 30-34°C.

25 6. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde  
la incubación se lleva a cabo a unos 35-38°C.

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

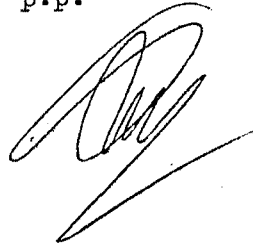
UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN VIRUS SINCITIAL RES-  
PIRATORIO ATENUADO.

30

1            Todo conforme queda descrito y reivindicado en la  
presente Memoria Descriptiva que consta de nueve páginas  
mecanografiadas.

Madrid, 7 de Febrero de 1978.

5            BERNARDO UNGRIA  
P.P.



10

15

20

25

30