

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

⑩ ES	⑪ NUMERO	⑩ A1
	⑪ 485105	
	⑫ FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

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

⑤⑥ PRIORIDADES:	CADUCADO	
⑤⑦ NUMERO		
7809364	14 de septiembre de 1.978	HOLANDA
7903300	26 de abril de 1.979	HOLANDA

④⑦ FECHA DE PUBLICIDAD	④⑧ CLASIFICACION INTERNACIONAL	④⑨ PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K5/00; A61K39/32	484.187

④④ TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN LIQUIDO INICIAL QUE CONTIENE VIRUS DE TIPO ADENO.

④① SOLICITANTE (S)
GIST-BROCADES N.V.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
P.O. Box 1 2600 MA, Delft, Holanda.

④② INVENTOR (ES)
Peter Apontowell, Johannes Anthonius Gerardus.

④③ TITULAR (ES)

④④ REPRESENTANTE
GOMEZ-ACEBO

Esta invención se refiere a una vacuna combinada dis-
puesta para administración contra infecciones en aves de co-
rral y de un modo más particular contra la enfermedad de New-
castle y la enfermedad caracterizada por una repentina reduc-
5 ción en la producción de huevos causada por virus del tipo ade-
no. La invención se refiere además a la preparación de esta
vacuna combinada y al procedimiento de preparación del compo-
nente de la vacuna contra la reducción de producción en la pro-
ducción de huevos.

10 La enfermedad de Newcastle (abreviada ND), una de
las más importantes enfermedades de la respiración en las aves
de corral, se produce por un virus y puede dar lugar a una
gran mortalidad en las aves de corral de todas las edades.

15 Se han desarrollado diversas vacunas contra la en-
fermedad de Newcastle, y se ha llegado a la conclusión de que
estas vacunas se administran preferiblemente en su forma inac-
tivada, puesto que dicha forma proporciona un alto grado de se-
guridad. Además, el empleo de una vacuna viva a veces da por
20 resultado el hecho de que el virus inoculado se distribuye de
ave a ave vacunada susceptible a infecciones o que no son inmu-
nes. Aún cuando se han desarrollado diversas vacunas de ND vi-
vas relativamente seguras y perfectamente inmubizantes, v.g.,
según aparece en la patente Británica N° 1.510.100, existe to-
25 davía una evidente necesidad de disponer de vacunas de ND inac-
tivadas.

30 Como las enfermedades de la respiración de las aves
frecuentemente son el resultado de más de una fuente de infec-
ción, se han desarrollado vacunas combinadas, por ejemplo se-
gún la patente Estadounidense N° 2.798.835 y que consiste en
una combinación de vacuna contra la bronquitis infecciosa y

una vacuna de ND, derivándose ambos componentes de virus vivos.

Además, la solicitud de patente Holandesa N° 7117873 (publicada mientras tanto para fines de oposición con el N° 157209) describe un procedimiento para la preparación de una
5 vacuna combinada contra las enfermedades de la respiración en aves de corral, que se caracteriza por la combinación de una vacuna muerta contra la coriza infecciosa, obtenida cultivando una cepa de Hemofilus gallinarium en un medio nutritivo natural e inactivando ulteriormente la bacteria con una vacuna
10 muerta procedente de un virus de bronquitis infeccioso y una vacuna muerta de ND.

Se recordará que en varias referencias, v.g., Avian Dis 7 (1963) páginas 106 a 122, Am. J. Vet. Res. 17 (1956) páginas 294 y 298, Avian Dis 11 (1967) páginas 399 a 406 y Virology 33 (1967) páginas 598 a 608, se cita que la actividad de
15 cada uno de los componentes se puede reducir o se puede perder enteramente mezclando virus vivos, causado por inhibición mutua.

Una conexión entre la presencia de virus de tipo adeno (que en adelante se indicará como ALV) y, en parte, la
20 reducción repentina en la producción de huevos y/o el aumento de producción de huevos con cáscaras blandas y/o sin cáscara, que se ha observado en aumento en los pasados años, particularmente en animales hembras y pollos de razas muy ponedoras,
25 ya se ha indicado en Avian Pathology 5 (1976) páginas 261 a 272. En la literatura se citan dichos síntomas a veces como "síndrome de la reducción de huevos". En Avian Pathology 6 (1977) páginas 405 a 413 se describe también una relación observada entre el desarrollo de anticuerpos a un virus hemagly
30

tinizante, llamado virus 127 y con respecto a los síntomas económicamente nada ventajosos descritos anteriormente. En Avian Patology 7 (1978) páginas 35 a 47 se confirma la relación supuesta entre la presencia de un virus de tipo adeno y la reducción repentina en la producción descrita anteriormente. Además, se describen varias propiedades características del tipo de virus en cuestión, v.g., la aglutinación característica de eritrocitos del pollo y la incapacidad de ser neutralizados en los tipos de virus adeno conocidos.

La memoria de la patente de Luxemburgo N^o 79.154 describe un procedimiento para la preparación de una vacuna contra el "síndrome de la reducción de huevos", comenzando a partir de un ALV caracterizado por una hemaglutinación específica y reacción antiserica. En la descripción y los ejemplos este virus se llama EDS-76 y BC-14. Esta vacuna se prepara cultivando nuevo virus en un cultivo de tejido, preferiblemente un cultivo de tejido Avian como el fibroblasto de embrión de pollo y células del riñón o hígado embrional o en huevos de pato embrionados.

Por Avian Patology 5 (1976) página 262, segundo párrafo, por Avian Pathology 6 (1977) página 406 y por la patente de Luxemburgo 79.154, página 1, línea 7 a 11 igualmente, es evidente que la reducción en la producción de huevos puede ser causada por la enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa, Avian y Cefalomielititis, virus de la viruela y combinaciones de los mismos.

Por lo tanto, desde un punto de vista práctico, las aves de corral frecuentemente se vacunan simultáneamente o un corto período unas después de otras con dos o más vacunas contra las enfermedades de los virus más generales mencionadas.

En particular las aves de corral se vacunan simultaneamente
contra la enfermedad de Newcastle y la reducción de producción
de huevos causadas por ALV igualmente. El método usual hasta
5 el momento presente para dicha administración simultánea con-
sistía en mezclar volúmenes normales de vacunas separadas dis-
puestas para uso y la administración de una dosis de vacuna
compuesta in situ, consistiendo la dosis por lo tanto en el
doble de volumen prácticamente que la comparada con las vacu-
nas administradas por separado, mientras que se diluían las
10 cantidades respectivas de virus. Además, difícilmente se pue-
de garantizar una mezcla exacta, mientras que pueden surgir
los problemas debidos a materias infecciosas.

Por lo tanto, esta invención tiene por objeto hallar
una vacuna combinada, dispuesta para uso, eficaz contra la en-
15 fermedad de Newcastle y la reducción en la producción de hue-
vos causadas por ALV, que además cumple las estrictas exigen-
cias actuales de las autoridades veterinarias en la mayoría
de los países más avanzados.

Se ha averiguado sorprendentemente que una vacuna
20 combinada dispuesta para administración se puede preparar com-
binando un líquido de virus de ND inactivado y un líquido de
ALV inactivado.

Se comprenderá que la invención se refiere también
a vacunas en combinación inactivadas, derivadas de por lo me-
25 nos un líquido de NDV y por lo menos un líquido de ALV inacti-
vado y discrecionalmente derivado de más de estos dos tipos
de virus mencionados.

Para el procedimiento según la invención, el líquido
que contiene NDV inactivado se prepara en una forma en princi-
30 pio en sí conocida, v.g., cultivando el virus deseado en hue-

vos de pollo fertilizados, recogiendo el virus cultivado en un líquido de una concentración usual para esta clase de vacuna inactivándola, suspendiendo el virus en una solución tamponada apropiada, homogenizándola, mezclándola con un líquido de virus inactivado derivado de un ALV, preparado cultivando el virus en huevos de pato fertilizados o en un cultivo celular de células de pato, recogiendo el virus producido en un líquido que tiene una concentración usual para esta clase de vacunas e inactivando el líquido de virus según métodos conocidos.

Para la preparación del líquido con contenido de NDV se pueden usar varios virus de ND poco virulentos o prácticamente avirulentos (lentógenos o velógenos) que tengan buenas propiedades de inmunización, como el virus La Sota o Hitchner (lentógenos) o el virus de Herts 33/56 (velógeno).

Como ejemplos específicos de cepas de virus aplicables se citan las cepas P/76/5, P/76/4 y P/76/3, que se obtienen del Institut für Medizinische Mikrobiology, Infection und Seuchenmedizin der Ludwin Maximilians Universität München, the VR-108, VR-107, VR-109, VR-699, VR-623, que se obtiene de American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA; la cepa Queensland V 4 que se obtiene de Centr. Vet. Labs; Weybridge, Gran Bretaña o el virus L/Z 258 P depositado en Colletion Institut Pasteur, Paris bajo I.091.

Para la preparación del líquido ALV inactivado se utiliza preferiblemente una cepa de virus 127 depositada en Colletion Institut Pasteur Paris bajo el N° I.090, aunque se pueden utilizar con éxito otros tipos de virus de antigenicidad bastante similares de ALV que producen la reducción en la producción de huevos. Esta cepa de virus I.090 se cultiva preferiblemente en huevos de pato.

La preparación del líquido de ALV inactivado se comienza preferiblemente a partir de un virus derivado de una cepa de virus 127 según se indica en las referencias de Avian Pathology citadas anteriormente, aunque se pueden aplicar otros tipos de ALV que produzcan reducción en la producción de huevos también con éxito.

Para la preparación de la vacuna combinada se inactivan de 150 a 250 cc de un líquido con contenido de NDV tamponado, homogenizado discrecionalmente y, junto con 100 a 200 cc de un líquido con contenido de ALV tamponado inactivado anteriormente y homogenizado de una forma discrecional, se añaden a 600-700 cc de una fase oleosa. Los componentes esenciales de la fase oleosa son por lo menos uno de los componentes elegidos del grupo consistente en aceites minerales parafínicos ligeros (calidad FDA), aceites de plantas y aceites minerales nafténicos, junto con uno o más emulsionantes apropiados, por ejemplo compuestos aniónicos tensioactivos derivados de óxido de alquileno y/o alcoholes hexahídricos y/o ácidos grasos naturales superiores (C10 a C20), v.g., ésteres y éster-éter.

Como ejemplos se citan el mannide monooleato (Span[®] 80, Arlacel 80[®], Arlacel A[®] y polioxietileno (20 sorbitan monooleato (v.g., Tween[®] 80).

La relación en volumen del líquido que contiene NVD tamponado y el líquido que contiene ALV tamponado puede variar de 3:4 a 5:1 y es preferiblemente de 3:2 aproximadamente.

La relación en volumen de la fase acuosa, formada por varios líquidos de virus y la fase oleosa puede variar de 1:1 a 3:7 y preferiblemente de 7:13 aproximadamente.

Se ha averiguado que la fase acuosa se debe añadir a la fase oleosa con agitación vigorosa y/o homogenización con

el fin de obtener la emulsión final líquida deseable estable y diluida.

5 La fase oleosa contiene del 2 al 20 % en peso (basado en el peso de la fase oleosa) de un emulsor, preferiblemente 2 a 15 % en peso de Arlacel A[®] o Arlacel 80[®] o Span[®] 80 y 0,2 a 4 % de Sween[®] 80. Los componentes de la fase oleosa se calientan preferiblemente por separado por lo menos a 110°C en un autoclave o se filtran como una mezcla.

10 La inactivación de ambos componentes líquidos de virus iniciales se puede realizar con inactivadores normales, v. g., por medio de β -propiolactona combinada discrecionalmente con un estabilizador, o formaldehído. Preferiblemente se añade β -propiolactona en una concentración de 0,05 a 0,25 % en peso (basado en el peso de la fase acuosa) a un líquido con contenido de virus de ND tamponado y el líquido se incubaba a aproximadamente 37°C por espacio de una a dos horas, preferiblemente 90 minutos, mientras que el líquido de ALV tamponado se inactiva por medio de formaldehído y preferiblemente a unos 20°C durante unas 20 horas en una concentración de 0,02 a 0,5 % en peso. Entonces, si fuera necesario, los líquidos de virus se homogenizan en la forma normal. Se puede añadir entonces discrecionalmente un preservativo, por ejemplo tiomersal o formalina en solución tamponada, a la fase acuosa.

25 Para obtener la vacuna combinada, dando lugar a las concentraciones favorables después de la administración, la solución inicial de NDV de una concentración de $10^{9,8}$ EID 50/cc a $10^{10,5}$ EID 50/cc y preferiblemente $\geq 10^{10}$ EID 50/cc se tiene que utilizar y también se tiene que utilizar un líquido de ALV con una actividad de por lo menos 10^2 HA unidades, y preferiblemente 10^3 HA unidades.

30

Es evidente que las propiedades favorables de las vacunas de virus combinadas propuestas pueden no ser previsibles en modo alguno por el experto puesto que, debido a reacciones indeseables, que ciertamente no pueden ser excluidas por los expertos, las actividades de uno o ambos virus en la vacuna final se pueden reducir a un nivel indeseable, causado por interacciones mutuas indeseables entre los componentes del líquido de virus o por interacción de estos componentes del líquido con uno de los productos típicos auxiliares aplicados.

Por ejemplo, los expertos en la materia ciertamente no excluirán que la β -propiolactona añadida inactivaría uno de los componentes de los virus con demasiada potencia actuando durante un largo período de tiempo, mientras que dicho período es necesario para la inactivación del otro componente.

La aplicación de la vacuna combinada según la invención es conveniente con respecto a las vacunas de la tecnología anterior preparadas mezclando vacunas compuestas in situ, en el sentido de que es necesario un menor volumen (v.g., 0,5 cc en lugar de 1 cc) es necesario para la administración produciendo por lo tanto una menor irritación local. Además, es necesario administrar una menor cantidad de productos químicos extraños al cuerpo. Además, los problemas mencionados anteriormente causados por la mezcla e introducción de materia infecciosa extraña se evitan con esta vacuna.

Las vacunas así preparadas se suelen administrar a aves con una edad de 10 a 20 semanas antes de la puesta.

La invención se refiere además a un procedimiento para preparar un líquido inicial con contenido de ALV apropiado que comprende cultivar un virus de tipo adeno en huevos de pato o en un cultivo de fibroblasto de embrión de pato, v.g., un

cultivo en frascos de rodadura de monocapa o un cultivo de células unidas a vehículos inertes sólidos.

5 Según una modalidad preferible de la invención, se forma un cultivo de fibroblasto de embrión de pato en frasco rodante de monocapa suspendiendo las células iniciales en un medio de cultivo consistente por lo menos en 70 a 90 partes de un medio de Eagle y discrecionalmente de 5 a 15 partes de suero de ternera, una solución de bicarbonato sódico del 2 al 4 % y de una a 5 partes de una solución o una suspensión de uno o más
10 antibióticos tales como penicilina G, estreptomycin y natamicina, y el líquido del cultivo se separa cuando el cultivo de células está casi terminado. El cultivo de célula se infesta con suspensión de virus, incubados a 37°C durante 0,5 a 2 horas para adherir el virus y seguido por la adición de medio de
15 mantenimiento consistente en medio de Eagle con 2 al 10 % de suero de ternera, 2-10 partes de caldo de fosfato de triptosa (30 gm/litro), 10-20 partes de fluido amniónico de bobino (BAF) y los aditivos indicados anteriormente, y cosechando el medio y las células con contenido de virus de 0,5 a 2 días después de la aparición de CPE.
20

El cultivo de células se inocula con una suspensión de ALV que tiene una actividad de $\geq 30 \times 10^6$ TCID 50/frasco de cultivo rodante. A este respecto se ha averiguado que los cultivos de suspensión en células no son idóneos para los procedimientos descritos anteriormente.
25

Para la preparación de vacuna se emplea preferiblemente una cepa de virus 127, con la depositada en Colletion Institut Pasteur, Paris, bajo el N° 1090, y esta cepa se cultiva preferiblemente en huevos de pato.

30 Es cierto que la patente de Luxemburgo N° 79.154 des

cribe en general la preparación de vacunas contra el "síndrome de la reducción de huevos", pero el método de producción preferible propuesto actualmente a escala comercial para estos líquidos de vacuna de altas concentraciones aceptables no se describe en modo alguno ni siquiera se sugiere.

A este respecto, se indica en la página 2, líneas 28 a 30 de la patente de Luxemburgo citada, describiendo claramente que el virus, v.g., se puede cultivar en fibroblastos de embrión de pollo. No obstante se ha averiguado que dicho método ciertamente no da lugar a los resultados deseables económicamente exigidos. En la página 6, líneas 29 a 35 se describe que se utiliza un cultivo de células de hígado de pollo embrional que, no obstante, no da lugar a los resultados económicamente exigidos, puesto que el cultivo a escala comercial de células de hígado embrional se considera todavía un método de producción muy difícil y por lo tanto muy costoso.

La invención se ilustra en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

a) Cultivo de virus de tipo adeno (cepa 127)

En frascos de cultivo rodantes (Bellco) se prepararon cultivos a partir de huevos de pato que incubaron por espacio de 12 a 13 días en EEF en un medio de suero de ternera al 10 % Eagle que contenía 0,22 % en peso de NaHCO_3 y 2 % en volumen de una solución antibiótica que contenía penicilina G, estreptomycinina y natamicina.

El medio se aspiró cuando los cultivos de las células estaban casi terminados. Entonces los cultivos se inocularon con una suspensión del virus 127, incubado a 37°C por espacio de una hora y relleno con medio de mantenimiento Eagle que contenía 5 % de suero de ternera, 10 % en volumen de caldo de

fosfato de triptosa (30 gm/litro) 10 % en volumen de fluido amniótico de bobino, 0,22 % en peso de NaHCO_3 y 2 % en volumen de la solución antibiótica mencionada.

5 El medio que contenía ALV y la célula se cosecharon un día después de la aparición de CPE y las células prácticamente se salían de la pared de vidrio. La suspensión de virus se congeló a -20°C y se almacenó para la producción de vacuna. Se calculó la concentración de Ha y el TCID_{50} de esta suspensión.

10 b₁) Cultivo de NDV

En huevos de SPF que se habían incubado por espacio de 11 días se inocularon con virus L/Z 258 P. El cultivo se incubó a 37°C por espacio de 72 horas y se cosechó el AAF (Fluido Alantoico Amniótico). El AAL contenía entonces aproximadamente 15 10^{10} $\text{EID}_{50}/\text{cc}$. La suspensión de virus se congeló a -20°C o menos y se almacenó para la producción de vacuna.

b₂) Huevos SPF que se habían incubado por espacio de 11 días se inocularon con virus de semilla de Herts 33/56. Después de la incubación a 37°C por espacio de 24 a 48 horas se cosechó el 20 AAF y contenía entonces aproximadamente 10^{10} $\text{EID}_{50}/\text{cc}$. La suspensión de virus se congeló a -20°C o menos y se almacenó para la producción de vacuna.

c) Tratamiento de la suspensión de virus

25 Las suspensiones de virus congeladas se descongelan y se inactivan con 0,05 a 0,25 % de β -propiolactona en un baño de agua a 37°C durante 90 minutos. Las suspensiones se almacenan hasta el día siguiente a $+40^\circ\text{C}$. La inactivación se controla observando la formación de CPE's en DEF o CEF, seguido por una prueba de hemabsorción. Además, los huevos de gallina 30 de SPF previamente incubados se inoculan con el fluido de vi

rus inactivado y se controlan ulteriormente.

Las suspensiones de virus se homogenizan con un homogenizador Ultra Turrax. Si se desea, la suspensión se diluye con PBS +0,3 % de formalina, dependiendo del EID₅₀ de la concentración de AAF y AH de la suspensión de virus de tipo adeno. El NDV-AAF y el virus de tipo adeno en suspensión se mezclan después en una relación de 6:4 y se utilizan para la preparación de la emulsión.

d) Preparación de la emulsión

Las suspensiones de virus se mezclan con la fase oleosa en una relación de 6,5 partes de aceite por 3,5 partes de líquido de virus y se emulsionan de modo que el tamaño de gota por término medio de la fase acuosa sea de aproximadamente 0,05-0,5 micras, v.g., por medio de inyección de la suspensión de virus en la fase oleosa con homogenización simultánea con un homogenizador Ultra Turrax.

En la fase oleosa se compone como sigue:

Marcol [®] 52 (aceite Esso parafínico blanco)	93,6 % en volumen
Arlacel [®] A o Arlacel 80 [®] o Span 80 (manide monooleato)	6,0 % en volumen
Tween [®] 80 (polioxietilen-20-sorbitan monooleato)	0,4 % en volumen

Los componentes de la fase oleosa se calientan por separado a 110°C en un autoclave o se filtran perfectamente como una mezcla.

Se obtiene una emulsión estable, que se prueba:

- 1) Pipetando directamente después de emulsionar gotas de emulsión sobre una superficie acuosa, por lo que las gotas no se extienden sino que permanecen intactas;
- 2) dejando reposar a 37°C por espacio de 4 semanas, por lo que no se separa una fase acuosa.

Las concentraciones finales de las emulsiones así preparadas son: 21 % NDV que contiene líquido tamponado y 14 % ALV 127 que contiene líquido tamponado.

5 La vacuna obtenida se emplea en una dosis de 0,5 cc por animal por vía intramuscular en los músculos de la pechuga o de los muslos o por vía subcutánea en el cuello. Ocho días después de la vacunación se pueden observar los anticompuestos que inhiben la hemaglutinación.

Ejemplo 2

10 Se repitió el procedimiento del ejemplo 1; no obstante se hicieron los siguientes cambios:

a) En lugar de la preparación del ALV según el punto a) del ejemplo 1, se preparó un líquido que contenía ALV inoculando huevos de pato, que previamente se habían incubado durante 9
15 días, con la cepa de virus 127. Al cabo de 7 días de incubación a 37°C se cosechó el AAF (fluido alantóico Amniótico). El AAV tenía entonces una concentración de HA de aproximadamente 1:1,024. La suspensión de virus se congeló después a -20°C y se almacenó para la producción de vacuna.

20 b) Después del tratamiento con la suspensión de NDV como se ha descrito en c) del ejemplo 1, y la inactivación de la suspensión de ALV con 0,02 a 0,5 % de formaldehído durante 20 horas a 22°C, los líquidos de NDV y ALV se mezclaron en una relación de 4:1 y se utilizaron para la preparación de la emulsión como
25 se ha descrito en d) del ejemplo 1.

Ejemplo 3

a) Se preparó un líquido que contenía ALV según la fase correspondiente del ejemplo 2.

30 b) Se preparó un líquido que contenía NDV según la fase correspondiente del ejemplo 1.

c) Se llevó a cabo el tratamiento de la suspensión de NDV del mismo modo que en el ejemplo 1 y se llevó a cabo el tratamiento de la suspensión de ALV como en el ejemplo 2.

Los NDV-AAF y ALV-AAF tratados se mezclaron después en una proporción de 5:1.

d) Las suspensiones de virus combinadas se añadieron y se mezclaron con una fase oleosa en la proporción de 6,5 partes de fase oleosa : 3,5 partes de líquido que contenía virus y se preparó una emulsión haciéndola pasar a través de un molino coloidal.

La fase oleosa aplicada tenía la composición siguiente:

Marcol [®] 52	91,4 % en volumen
Arlacel A [®] o Arlacel [®] 80 o Span [®] 80	8,0 % en volumen
Tween [®] 80	0,6 % en volumen

Ejemplo 4

Se preparó un líquido que contenía ALV y un líquido que contenía NDV de acuerdo con las fases correspondientes respectivas del ejemplo 1. Después del tratamiento de las suspensiones de virus como en c) del ejemplo 1, se mezcló el líquido que contenía NDV-AAF y el que contenía ALV en una proporción de 4:3 y se preparó una emulsión del mismo modo que en d) del ejemplo 1. No obstante, la fase oleosa y los líquidos que contenían los virus combinados se mezclaron en una proporción de 6:4, mientras que la fase oleosa empleada era la utilizada en el ejemplo 1 bajo d).

Ejemplo 5

La vacuna combinada, preparada según el ejemplo 4, se probó en el modo siguiente.

Unos pollos SPF vacunados previamente, de 8 semanas

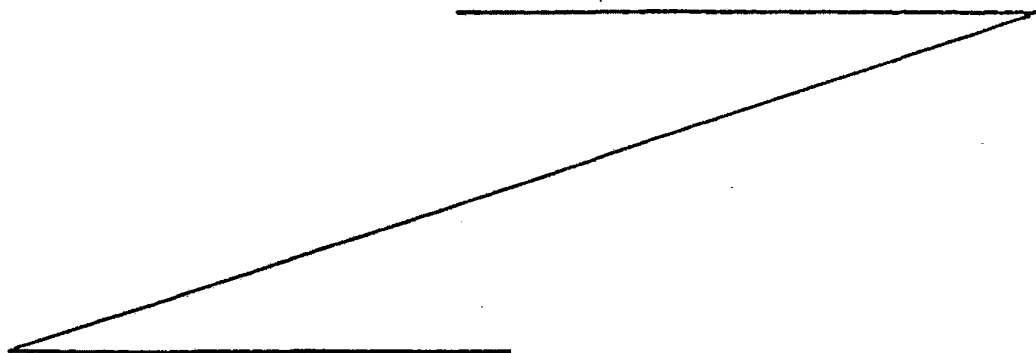
de edad, se vacunaron con la vacuna combinada. Las concentra-
ciones halladas de HAI (inhibición hemaglutinante), o sea el
número de unidades HAI en el suero procedente de los animales
vacunados no se desviaba notablemente de los niveles de anti-
5 cuerpos hallados con animales que se habían vacunado con vacu-
nas simples correspondientes de una composición comparable en
las mismas condiciones.

Las curvas de progreso así obtenidas trazando las uni-
dades HAI y los niveles de HAI hallados, expresados respectiva-
mente en forma de 2^x en una escala logarítmica contra el tiem-
10 po se ilustran en la figura adjunta.

Respecto a las unidades NDV-HAI, se hallaron valores
sensiblemente superiores con animales que se habían vacunado
previamente con vacuna NDV viva (como se suele hacer normalmen-
15 te en granjas).

En dichos animales, v.g., se detectaron aproximadamen-
te $10^{16,0}$ - $10^{17,0}$ NDV-HAI en el período de 4 a 8 semanas des-
pués de la vacunación con la vacuna NDV-ALV combinada.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento,
20 así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse
constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son sus-
ceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren
su principio fundamental.



REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la preparación de un líquido inicial que contiene virus de tipo adeno, para la preparación de una vacuna inactivada combinada dispuesta para administración, caracterizado porque un virus de tipo adeno se cultiva en 5 huevos de pato o en un cultivo celular, tal como un cultivo en frascos rodantes de monocapa o un cultivo de células unidas a vehículos inertes sólidos, de fibroblastos de embrión de pato.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el cultivo en células en monocapa se forma preparando una suspensión de células iniciales en un medio de cultivo consistente por lo menos en 70 a 90 partes de medio de Egel, al que se añaden discrecionalmente de 5 a 15 partes de suero de ternera, 2 a 4 % en peso de solución de bicarbonato sódico y una a cinco partes de una solución o una suspensión de uno o más antibióticos, por ejemplo penicilina G, estreptomycin y natamicina, el medio de cultivo se prepara cuando el cultivo celular está prácticamente terminado, se inocular con la suspensión de virus, se incuba a 37°C por espacio de 0,5 a 2 horas para unir el virus y se añade medio de mantenimiento, consistente por lo menos en un medio de Egel con 2 a 10 % de suero de ternera, 2-10 partes de caldo de fosfato de triptosa (30 gm/litro), 10-20 partes de líquido amniótico de bobino y los aditivos mencionados anteriormente, seguido por la cosecha del medio que 25 contiene virus y las células de 0,5 a 2 días después de la aparición de CPE.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza una cepa de virus 127 depuesto.

4.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el cultivo celular se inocular con una suspensión 30

de ALV que tiene una actividad de $\geq 30 \times 10^6$ TCID₅₀/frasco de cultivo rodante.

5 5.- Procedimiento para la preparación de un líquido inicial que contiene virus de tipo adeno, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en el adjunto dibujo.

Esta Memoria consta de 18 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

10

Madrid 17 OCT. 1979

GIST-BROCADES N.V.

J. M. GOMEZ ACEBO Y PUMBO
en p. Firmado: J. Suarez Diaz

