

P.- 34.410

Case A297



336810

**Memoria descriptiva**

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED,

entidad / de nacionalidad británica,

con domicilio en 183-193, Euston Road, Londres, Inglaterra,

por: "UN METODO PARA PRODUCIR UNA CEPA DE CELULAS".

27.4.67



La presente invención se refiere a cepas de células, particularmente a un nuevo tipo que se deriva de células de embriones de felinos; al crecimiento de virus en ellas; y a vacunas que contienen tales virus.

5 Es conocido el cultivo de virus de enteritis infecciosa felina (panleucopenia), en un cultivo de tejido primario preparado por tripsinación de células de riñón de gato infectado. Sin embargo, este método ha tenido la des-  
10 ventaja de que no se podía excluir la posibilidad de contaminación con otros virus no fácilmente detectables, al tiempo que la cantidad disponible de tal cultivo de tejido es limitada en ciertas épocas del año, y representa una población heterogénea de células que estorba a la producción del virus para fines de experimentación o preparación  
15 de vacunas. Además, la modificación y atenuación de los virus de enteritis infecciosa felina en los cultivos primarios de riñón de gatito es impracticable, debido al peligro de contaminación con virus de enteritis infecciosa felina virulenta, que a veces puede estar presente en los cultivos  
20 usados de tejido primario de gatito.

Se ha reconocido, en general, que la falta de células o cepas de células huéspedes adecuadas, exentas de contaminación, capaces de soportar virus patógenos de interés, ha estorbado mucho a los esfuerzos de investigación y  
25 desarrollo para proporcionar virus adecuados para su uso en vacunas para combatir las enfermedades de animales y seres humanos.

Se ha hallado ahora que una nueva cepa de células, que comprende células derivadas del pulmón de embriones de felinos, es capaz de soportar virus patógenos, par-  
30



5 particularmente virus de enteritis infecciosa felina, virus  
de rinotraqueitis felina y picornavirus felinos. También  
se ha hallado que las cepas de células derivadas de riñón  
o corazón de embriones de felinos, o mezclas de ellos, o  
de la piel, músculos, amnios (placenta), lengua, hígado  
o intestinos del embrión, o todo el embrión o cadáver de  
embrión, son análogamente adecuados para soportar virus  
patógenos. Además, se ha hecho posible atenuar, por ejem-  
plo, el virus de enteritis infecciosa felina, introduciendo  
10 do el virus en cultivos de tales cepas de células embrión-  
nicas felinas.

Según la presente invención, en un primer aspecto,  
se proporciona una cepa de células, que comprende cé-  
lulas que se derivan de embriones de felinos y que son ca-  
15 paces de soportar virus patógenos. En un segundo aspecto  
se proporciona un método para producir una cepa de células  
según se ha definido antes, donde el tejido apropiado de  
embrión de felino es disgregado, y luego se forma con él  
un cultivo o subcultivo, por pasos en serie por un medio  
20 nutritivo.

En un tercer aspecto, se proporciona un método  
para cultivar un virus, donde un cultivo de la cepa de cé-  
lulas según se ha definido antes es infectado con un virus  
al que es susceptible la cepa, y luego se cultiva la cepa  
25 en un medio nutritivo. En un cuarto aspecto se proporciona  
un material antigénico que se obtiene de un virus cultivado  
en aquella cepa de células, y una vacuna que presenta al  
material antigénico en forma y dosis administrables.

En un aspecto particular se proporciona una cepa  
30 atenuada del virus de la enteritis infecciosa felina, por

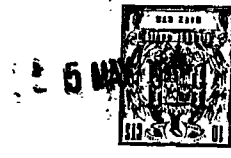
336810



5 un método que comprende introducir una cepa virulenta del virus en cultivos de cepas de células embriónicas felinas, como se ha definido antes, hasta que el virus pierde su capacidad de infectar, pero conserva aún su capacidad inmunizadora. Las cepas así obtenidas se pueden presentar en forma de vacuna, para inmunizar a los gatos frente a la enteritis infecciosa felina.

10 Es bien sabido que las cepas de células son sistemas de células que se derivan de células separadas de organismos vivientes, y que son capaces de ser cultivadas in vitro, en un medio nutritivo, quedando en forma sustancialmente diploide, sin que cambie la composición de cromosomas. Para los fines de la presente invención se puede usar cualquier medio conocido en la técnica que proporcione las condiciones físicas y químicas y la composición nutritiva necesarias para cultivar o subcultivar, es decir, 15 mantener, el crecimiento individual y multiplicación de estas células. Sin embargo se ha preferido usar el medio basal de Eagle con algo de suero bovino, y particularmente dicho medio con caldo de fosfato de triptosa y con dos 20 veces la cantidad usual de aminoácidos y vitaminas. El pH del medio se mantiene entre 6,8 y 7,8, por ejemplo usando un agente tampón.

25 Las cepas de células según la presente invención proporcionan células huéspedes para virus en cultivo. Estas células están exentas de contaminación viral, y representan un grado de susceptibilidad viral sustancialmente constante. Se pueden tener disponibles en prácticamente cualquier cantidad, independientemente de las fluctuaciones estacionales que se experimentan con los culti- 30



vos de tejido primario directamente obtenido de gatitos juvenes.

5 El embrión de gato usado para los fines de la presente invención puede tener preferiblemente un tamaño de 1 a 4,5 cm. El embrión, o una parte, se separa bajo condiciones asépticas, y se disgrega mecánicamente o con una preparación de enzimas adecuada, en una solución salina tamponizada. La suspensión de células resultante se transfiere luego a los recipientes que contienen el medio nutritivo, y se cultiva en un intervalo de temperatura de 32 a 39°C, preferiblemente de 35 a 37,5°C. Para facilitar el subcultivo, es habitual tratar las hojas confluentes de las células de la cepa con tripsina y un agente inocuo de formación de quelato, antes de cada transferencia a un medio nuevo.

15 El tejido de pulmón se puede separar convenientemente de un embrión de gato aproximadamente a las 5 a 7 semanas de gestación, bajo condiciones estériles, y disgregar mecánicamente, o con una preparación de enzimas adecuada, en una solución salina tamponada. La suspensión de células resultante se transfiere luego a los recipientes que contienen el medio nutritivo, y se cultiva en un intervalo de temperaturas de 32 a 39°C, preferiblemente de 35 a 37,5°C. Para facilitar el subcultivo, es habitual tratar las hojas confluentes de las células de la cepa con tripsina y un agente inocuo de formación de quelato, antes de cada transferencia a un medio nuevo.

20 Se ha observado que las células de la cepa se multiplican a una velocidad que representa la duplicación de su número cada de 2 a 3 días. La cepa de células según

336810

27.4.67



la presente invención es capaz de soportar un cierto número de virus al que es susceptible, en este respecto. Son ejemplos de tales virus el virus de enteritis infecciosa felina, virus de rinotraqueitis felina, piconavirus felino, y virus de herpes bovina. Entre los picornavirus se incluyen aquellos virus felinos que tienen propiedades parecidas a las de los enterovirus, rinovirus, y también otros virus de propiedades intermedias entre las de los enterovirus y rinovirus.

Para infectar la cepa de células con el virus, la cepa se puede mezclar con una suspensión salina del virus, la cepa por ejemplo obtenida del producto de exudación de un animal infectado, o de otras fuentes. En el caso del virus de enteritis infecciosa felina, se ha preferido usar el bazo o intestino delgado de gatos, infectado de enteritis infecciosa felina, e inocularlo en cultivos de la cepa de células embrionicas felinas.

El virus produce usualmente en la cepa cambios reconocibles, o degeneración celular. Cuando el virus está presente en cantidad suficiente, se ensaya la potencia de inmunización y la toxicidad del cultivo. Si es necesario, el virus es atenuado, o atenuado más, por pasos en serie de las cepas de células proporcionadas por la presente invención, o es desactivado usando agentes químicos o físicos adecuados. El material antígeno así obtenido se usa para producir anticuerpos, para inmunización pasiva, o se usa como vacuna administrándolo a animales susceptibles de sangre caliente.

Los siguientes ejemplos ilustran a la invención.

3368 10



### Ejemplo I

Se separó tejido de pul-móm de dos embriones de gato, aproximadamente a las 6 semanas de gestación. El tejido se disgregó con una solución al 0,25% de tripsina (Nutritional Biochemicals Co. 1/300) en una solución salina tamponada con fosfato, descrita por Dulbecco y otros, J. exp. Med., 1954, 99, 167. La suspensión resultante se plantó, en cantidad de  $5 \times 10^6$  células, en una botella médica plana de 112 ml, que contenía medio basal de Eagle (80 partes en volumen) (veáse H. Eagle, Science, 1955, 122, 504) modificado para que contuviera dos veces la cantidad usual de aminoácidos y vitaminas, caldo de fosfato triptosa (10 partes en volumen) y suero bovino (10 partes en volumen) y suero bovino (10 partes en volumen), como solución estéril.

Los cultivos en monocapa así formados fueron subcultivados haciendo pasar en serie el contenido de un fosfato a frasco a 2 o 3 frascos, por término medio dos veces por semana. Para este fin, las células se volvieron a suspender con una solución de acetato sódico al 0,05% en una solución de tripsina al 0,1%, en el tipo anterior de solución salina tamponada con fosfato.

Se observó que las células eran fibroblastos típicos, y seguían siendo sustancialmente diploides hasta el 40º paso. No hubo transformación morfológica hasta el 100º paso, aunque cada vez fueron más comunes las anomalías cromosómicas.

Unas partidas de células de hasta el nivel de 20 pasos de mantuvieron a  $-190^{\circ}\text{C}$  en un medio de cultivo añadiendo sulfóxido de dimetilo al 20%.

27.3.67

336810



En otro experimento similar se usó un medio que contenía medio basal de Eagle (90 partes en volumen) y suero bovino (10 partes en volumen), pero las células no crecieron tan rápidamente.

5

### Ejemplo 2

Unos embriones (tamaño de aproximadamente 2.5 cm) se separaron de gatas preñadas, y fueron cortados en fragmentos finos. El tejido se disgregó con una solución al 0,25% de tripsina (Nutritional Biochemicals Co. 1/300) en una solución salina tamponada con fosfato. La suspensión resultante se sembró en cantidad de  $5 \times 10^6$  células, en una botella medica plana de 112 ml, que contenia medio basal de Eagle (80 partes en volumen) modificado para que tuviera dos veces la cantidad usual de aminoácidos y vitaminas, caldo de fosfato de triptosa (10 partes en volumen y suero bovino (10 partes en volumen), como solución estéril.

10

15

20

Los cultivos en monocapa así formados fueron subcultivados haciendo pasar en serie el contenido de un frasco a 2 o 3 frascos, por término medio dos veces por semana después una vez por semana. Para este fin, las células se volvieron a suspender con una solución de acetato sódico al 0,005%, en una solución al 0,1% de tripsina, en el tipo anterior de solución salina tamponada con fosfato.

25

Se observó que las células eran fibroblastos típicos, y siguieron siendo sustancialmente diploides hasta el 48º paso.

30

Unas partidas de células de hasta el nivel de 20 pasos se mantuvieron a  $-190^{\circ}\text{C}$  en un medio de cultivo, añadiendo sulfóxido de dimetilo al 20%.

336810

5 MAY 1967



Se efectuaron experimentos similares con embriones de gato de tamaños que variaban entre aproximadamente 1 cm y 4,5 cm, con cadáveres de embrión, y con las siguientes partes del embrión de gato: riñón, corazón, mezcla de corazón y pulmón, piel, músculo, intestino, amnios (placenta), lengua e hígado. Con todos estos tejidos se obtuvieron cepas de células satisfactorias.

### Ejemplo 3

Se obtuvieron hojas confluentes de la cepa de células y se trataron con acetato sódico, como se ha descrito en los ejemplos 1 o 2, y las células fueron introducidas en tubos de ensayo (150 x 50 mm) que contenían cubreobjetos (nº 1, 22 x 10). Se añadieron a cada tubo de ensayo aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células en 2 ml de medio, y los tubos fueron incubados a 37°C, estando inclinados en un ángulo de aproximadamente 10°.

Se formó sobre los cubreobjetos una hoja confluyente de células, de 24 a 48 horas después de plantar. El medio contenía medio basal de Eagle modificado según se ha definido en el Ejemplo 1, suero bovino (10%), caldo de fosfato de triptosa (10%), y una solución de carbonato ácido sódico al 4,4% (2,5%).

Se añadió a las células presentes en los medios anteriores una dilución apropiada (0,25 ml) del virus de enteritis infecciosa felina. Los tubos de ensayo fueron incubados formando un ángulo de aproximadamente 10°, a una temperatura de 37°C.

El virus produjo cambios reconocibles en el núcleo, cuando las células fueron teñidas con hematoxilina

336810



y eosina. Aproximadamente 18 horas después de la infección los núcleos infectados (aproximadamente de 1 a 2% del total de los núcleos) absorbieron más hematoxilina que los núcleos no infectados. Esto fué seguido, en las 6 horas siguientes, por aumento de los nucleolos, oscurecimiento homogéneo de los otros contenidos nucleares, y desarrollo de una zona transparente alrededor del nucleolo o nucleolos, si había más de uno presente, y otra zona transparente inmediatamente dentro de la membrana nuclear. Durante las 24 horas siguientes, resultó que las células infectadas se encogían y tenían hasta un color casi negro, antes de desprenderse finalmente del cubreobjetos. Aproximadamente de 5 a 10% de todos los núcleos mostraron los anteriores cambios durante los dos primeros días después de la infección.

Se efectuaron experimentos similares con todas las otras cepas de células obtenidas según el último párrafo del Ejemplo 1. El virus fué cultivado satisfactoriamente en todas estas nuevas cepas.

#### Ejemplo 4

Se prepararon hojas confluentes de células, obtenidas de embriones enteros, en tubos de ensayo, como se describe en el Ejemplo 2. Una muestra de un producto exudado nasal u ocular de un gato que padecía de rinotraqueitis felina fué mezclada con la solución salina tamponada con fosfato (2,0 ml), mencionada en el Ejemplo 1, que también contenía 200 unidades de penicilina y 100 mg de estreptomina, por mililitro.

El medio nutritivo se separó de la monocapa de



de cepa de células, en cinco tubos independientes, se  
reemplazó por la mezcla de producto de exudación y tampón,  
y se incubó a 37°V durante 2 horas. Luego fue separada  
la mezcla de producto de exudación y tampón, y las células  
5 se lavaron con solución tampón estéril nueva. Los tubos  
infectados que contenían el medio nutritivo nuevo (1,5 ml  
por tubo) se incubaron luego a 37°C en un medio nutritivo  
nuevo (1,5 ml).

Luego siguió el examen microscópico diario de  
10 los cultivos de control, preparados con solución salina  
estéril en vez de la mezcla de producto de exudación y  
tampón.

Durante los pocos días siguientes, el aspecto  
microscópico de las células de los tubos de control conti-  
nuó normal. En los tubos infectados aparecieron áreas de  
15 células anormales dentro de las 48 horas. Estas áreas esta-  
ban distribuidas de forma discreta por toda la hoja de cé-  
lulas, y consistían en células redondeadas que mostraban  
una refractividad aumentada. Las áreas de células afecta-  
das estaban claramente demarcadas de las células de aspek-  
to normal que las rodeaban, en las etapas primeras. A medi-  
da que progresaba la infección las áreas de células anorma-  
les se hicieron más grandes y más numerosas, hasta que toda  
la hoja de células estuvo implicada, a los 4 a 6 días. En  
20 las últimas etapas de la infección, algunas células se  
desprendieron del vidrio, dejando espacios vacíos en la ho-  
ja de células. A simple vista, la hoja de células tomó un  
aspecto "nebuloso". Diversos ensayos aplicados al fluido  
y/o células de tubos infectados demostraron que el agente  
25 responsable de estos cambios celulares fue un virus, y aún  
30

28.4.67



otros ensayos establecieron la identidad del virus, como virus de rinotraqueitis felina. Otros ensayos demostraron que los cultivos infectados estaban exentos de otros microorganismos. El virus podía ser transmitido en serie a cultivos nuevos en tubo, de la misma cepa de células, en los que tuvieron lugar cambios celulares degenerativos similares. Los experimentos de dilución adecuados demostraron además que había tenido lugar la multiplicación del virus.

Ejemplo 5

Se efectuó otro experimento según el método descrito en el Ejemplo 3, pero usando una cepa de células obtenida del pulmón embrionario. Se halló que este virus también carece en tales cepas de células, y se consiguieron resultados similares a los descritos en el Ejemplo 4.

Ejemplo 6

Se obtuvieron hojas confluentes de la cepa de células, en tubos de ensayo, como se describe en el Ejemplo 1. Una muestra de producto de exudación nasal u ocular de un gato que padecía de "gripe felina", proporcionando así una fuente de picornavirus felinos, se mezcló con la solución salina tamponada con fosfato (2,0 ml), mencionada en el Ejemplo 1, que también contenía 200 unidades de penicilina y 100 mg de estreptomina, por mililitro. El medio nutritivo se retiró de la monocapa de cepa de células, y fué reemplazado por la mezcla de producto de exudación y tampón, y se incubó a 37°C durante 2 horas. Luego se separó la mezcla de producto de exudación y tampón, y las células se lavaron con solución tampón estéril nueva. La cepa, de células infectadas fué incubada luego a 37°C en

336810



un medio nutritivo nuevo (1,5 ml).

5 Luego siguió examen microscópico diario del cultivo infectado, y de un cultivo de control, preparado con solución salina estéril en vez de la mezcla de producto de exudación y tampón. Se halló que la degeneración celular (efecto citopático) que apareció al cabo de 2 a 7 días de incubación, no fué distinta de la producida por picornavirus humanos, por ejemplo el virus de la poliomielitis. El virus se pudo transferir por pasos en serie en cultivos de la cepa de células, y los experimentos adecuados de dilución mostraron que había tenido lugar la multiplicación del virus en la cepa de células. Nuevos ensayos demostraron que los cultivos así obtenidos, por pasos en serie, estaban exentos de contaminación con otros microorganismos.

15

#### Ejemplo 7

El virus de enteritis infecciosa felina fué recuperado de tanto el bazo como el intestino delgado, tomados de gatos infectados a la altura de la enfermedad, e inoculado en cultivos de una cepa de células de pulmón embriónico felino. Para ensayar los cambios intranucleares, los cultivos fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Cuando los cambios fueron claramente evidentes (de 3 a 5 días después de la infección de los cultivos) los cultivos infectados fueron almacenados en estado congelado, a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

El virus almacenado en estado congelado a  $-30^{\circ}\text{C}$  fué descongelado después, e introducido en cultivos no infectados de cepas de células embriónicas felinas. En el momento apropiado, determinado por la presencia de cam-

28.4.67

- 13 - 336910



bios intranucleares, los cultivos infectados de cepas de células se volvieron a almacenar en estado congelado, a -30°C, hasta el paso siguiente.

5 Cuando se introdujo el virus en cepas de células embrionicas felinas, fué habitual añadir el virus simultáneamente con las células y medios de cultivo, al recipiente de cultivo. El cultivo de cepas de células embrionicas que contenían el inóculo de virus se incubó a 37°C.

10 La cepa de virus, para la que se reivindica la atenuación en gatos, se hizo pasar en serie, como se ha descrito antes, ocho veces en cepas de células de pulmón embrionico felino, y luego cinco veces en cepas obtenidas de todo el embrión felino. Una parte alicuota se hizo pasar dos veces más en cepas obtenidas de todo el embrión felino.  
15 Sin embargo, otra muestra se hizo pasar una vez en una cepa de células de todo el embrión felino, seguido por dos o tres pasos en cepas de células de pulmón embrionico felino.

20 El octavo paso de la cepa atenuada de virus de enteritis infecciosa felina fué ensayado, para determinar su inocuidad, en dos gatitos de 5 meses de edad. Se inyectó subcutáneamente a cada gatito 1,0 ml de fluido y células de cultivo de tejido infectado de virus, lo que era equivalente a 200 dosis infecciosas de cultivo de tejido.  
25 Ninguno de los gatitos mostró enfermedad clínica alguna, aunque el recuento total de leucocitos circulantes disminuyó desde el tercero al noveno día. Se obtuvieron a diario de los gatitos muestras de secreciones rectales, desde el segundo al noveno día después de la inoculación. Los  
30 cultivos de tejido inoculados con estas muestras no muestra-

336810



ron ninguna evidencia de virus.

En el 21<sup>º</sup> dia, estos dos gatitos, junto con otros dos gatitos de control, no inoculado, de edad similar, fueron estimulados por via oral con 1,0 ml. de una suspensión al 10% de hígado y bazo en caldo de suero de caballo al 10%. El hígado y bazo se obtuvieron de un caso fatal típico de enteritis infecciosa felina. Los gatos inoculados continuaron clínicamente normales durante todo el periodo de estímulo. Sin embargo, los gatos no inoculados de control quedaron piréxicos al 5<sup>º</sup> dia después del estímulo, perdieron estado fisiológico, estaban lánguidos y significativamente leucopénicos.

Recuento de leucocitos, media geométrica (x 10<sup>3</sup>)

Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Después de inocular	8,8	11,2	9,7	6,8	4,5	6,0	6,1	5,8	6,7	10,1
Después del estímulo: gatitos ino- culados	19,3	10,1	10,7	9,3	8,2	8,4	12,3	8,4	12,1	-
gatitos no inoculados	10,6	11,7	4,9	6,6	4,6	3,8	4,3	5,3	6,5	-

Los gatitos fueron sangrados antes de la inoculación y antes y después del estímulo, y se examinó el suero, para determinar la presencia de anticuerpos neutralizadores.

336810



Anticuerpos neutralizadores del suero

Gatito nº    Pre-inoculación    Pre-estímulo    Post-estímulo

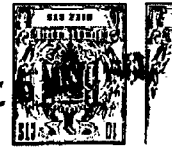
	Inocula-			
	dos:			
5	233	< 2 <sup>x</sup>	640	640
	234	< 2	640	2560
	No inocu-			
	lados:			
	235	NE <sup>xx</sup>	2	640
	236	NE	2	640

x Recíproco de la dilución del suero  
xx No ensayado

15 El 15º paso de esta cepa atenuada de virus de enteritis infecciosa felina fué ensayado, en gatitos, para determinar su inocuidad y carácter antígeno, y la capacidad de infección de gatitos no inoculados, por contacto. El virus fué cultivado en la cepa de células embriónicas felinas, y unos gatitos fueron inoculados subcutáneamente con 1,0 ml de vacuna. El experimento se efectuó en dos partes, A y B.

20 A. Primero se vacunó un gatito de 4 meses de edad con  $1,6 \times 10^5$  dosis infecciosas de virus de cultivo de tejido. El gatito continuó sano, y no hubo evidencia de leucopenia ni pirexia, y no se recuperó ningún virus de las heces fecales durante los quince primeros días del experimento. Se mantuvieron en contacto con los gatitos vacunados dos gatitos de 4 meses de edad y cuatro gatitos de 3 meses de edad. Ninguno de estos gatitos mostró ningún signo de mala salud, leucopenia ni pirexia.

30 B. En la segunda parte del experimento, 6 gatos de 6 a 7 meses de edad fueron vacunados con  $1,6 \times 10^3$  dosis infecciosas de virus de cultivo de tejido. Estos gatos



también continuaron sanos.

Los animales usados en los experimentos anteriores fueron sangrados inmediatamente <sup>antes</sup> antes de ser vacunados y 3 semanas más tarde. Se examinaron los sueros para determinar anticuerpos neutralizadores.

Anticuerpos neutralizadores de suero

Gato nº	Antes de la vacunación	3 semanas después de la vacunación
10	A. Inoculado	
	238	1,000
	No inoculados en contacto	
	237	<5
	239	<5
	240	<5
	241	<5
	243	<5
	244	<5
15	B. Inoculado	
	223	100
	224	1,000
	225	1,000
	226	1,000
	228	1,000
	229	1,000
	230	10,000

20 En otro experimento, tres gatitos de 3 meses de edad fueron vacunados subcutáneamente con 1,0 ml de virus al nivel del 18<sup>a</sup> paso, y propagados en una cepa de células de pulmón embrionario felino. Esta cantidad de virus equivale a  $1,6 \times 10^5$  dosis infecciosas de cultivo de tejido. Estos gatitos, junto con dos gatitos no inoculados, en contacto, de la misma edad, continuaron sanos y no mostraron evidencia de leucopenia ni pirexia.

30 Se obtuvieron muestras de suero de los gatitos vacunados, inmediatamente antes de la inoculación, y 11 y 22 días más tarde. Los gatitos no inoculados, en contacto,

29.4.67

336010



fueron sangrados al mismo tiempo. Se examinaron todos los sueros, para determinar los anticuerpos neutralizadores.

		Pre-vacunación		Post-vacunación (días)	
				11	22
5	Gatitos vacunados				
	247	<10	100	>10,000	
	250	<10	10,000	>10,000	
	252	<10	>10,000	>10,000	
10	Gatitos no inoculados, en contacto				
	251	<10	10	<10	
	254	<10	10	<10	

Se ha llegado a la conclusión de que esta cepa de virus de enteritirris infecciosa felina (panleucopenia) cultivada y hecha pasar por cepas de células embrionicas felinas, es antígena, estimula en los gatos la producción de anticuerpos neutralizadores homólogos, y no se propaga desde gatos vacunados a gatos susceptibles en contacto.

Unas botellas Roux, cada una de las cuales contenían de 12 a 15 x 10<sup>6</sup> células en 100 ml de medio de cultivo, como se describe en el Ejemplo 7, fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Las hojas de células confluentes selavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato, precalentada a 37°C, y fueron inoculadas con 10 ml de una suspensión no diluída de virus de enteritis infecciosa felina, que se obtuvo de la etapa de 15<sup>a</sup> a 18<sup>a</sup> paso de cultivo de tejidos, descrita en el Ejemplo 7, y representadaba 1,6 x 10<sup>6</sup> dosis infecciosas de cultivo de tejido del virus.

Se añadieron al cultivo 10 ml del medio S.M. 199 (veáse Morgan y otros, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, pág. 73, pág. 6), que contenían también 0,5 ml de una so-



lución al 4,5% de carbonato ácido sódico, con las cantidades usuales de penicilina y estreptomocina, y la mezcla se incubó a 37°C durante 72 horas.

5 Después el cultivo se congeló y descongeló rápidamente tres veces, y se usó y ensayó como se describe en el Ejemplo 7. Se obtuvieron resultados satisfactorios.

Cuando fué necesario, la preparación congelada y descongelada se volvió a congelar y se almacenó a -65°C.

10 Esta solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 18 de febrero de 1.966, nº 7258/55 y 8 de septiembre de 1.966, nº 40.225/66 prov., se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15

#### N O T A

20 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta patente de Invención en España 'por VEINTE años son los siguientes:

25 1.- Un método para producir una cepa de células que comprende células derivadas de embriones de felinos, y que son capaces de soportar virus patógenos, donde el tejido apropiado de embrión de felino es disgregado y luego cultivado o subcultivado, por pasos en serie en un medio nutritivo.

30 2.- Un método para producir una cepa de células en el cual las células se derivan del pulmón de embriones

336810

28.4.67



de felinos.

5 3.- Un método para producir una cepa de células en el cual las células se derivan del riñón, corazón, piel, músculo, amnios (placenta), lengua, hígado e intestinos del embrión, o de todo el embrión o cadáver de embrión.

10 4.- Un método para cultivar un virus donde en un cultivo de la cepa de células, obtenida por el método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, se inyecta un virus al que es susceptible la cepa, y luego se cultiva la cepa en un medio nutritivo.

5.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el medio nutritivo contiene medio basal de Eagle y suero bovino, y tiene un pH de aproximadamente 6,8 a 7,8.

15 6.- Un método según la reivindicación 5, en el cual el medio contiene también caldo de fongato de triptosa, con dos veces la cantidad usual de aminoácidos y vitaminas.

20 7.- Un método para cultivar un virus, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el cual el virus de enteritis infecciosa felina.

8.- Un método para cultivar un virus, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el virus es un virus de rinotraqueítis felina.

25 9.- Un método para cultivar un virus, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el cual el virus es un picornavirus felino.

30 10.- Un método para producir una cepa atenuada de virus de enteritis infecciosa felina, que comprende introducir una cepa virulenta del virus en cultivos de

