

P.- 42.966

ES/JG/Case
A 330

372269



SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>C-12</u>
SUBCLASE <u>K</u>

Memoria descriptiva

para solicitar CERTIFICADO DE ADICION por años

a nombre de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED

entidad / ~~de nacionalidad~~ británica

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

por: "MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRIN
CIPAL Nº 336.810", expedida el 2 de Octubre de 1.967,
por: " Un método para producir una cepa de células".
(Clase Internacional C12k)



Esta invención se refiere a linajes de células de embrión de felino heteroploides, al cultivo de virus en las mismas, y a vacunas que contienen tales virus.

5 Se ha descrito ya en la memoria descriptiva de la Patente española Núms. 336.810, en la solicitud de Patente Británica Nº 40225/66, y en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. de Serie 615.922, que nuevas cepas. o de acuerdo con la nueva terminología "linajes de células diploides", derivados de células de embrión de felino (gato) son capaces de soportar virus patógenos. Es
10 tos linajes son prácticamente diploides, ya que como mínimo un 75% de las células tienen su composición cromosómica inalterada.

15 Se ha encontrado ahora que los linajes de células anteriores pueden modificarse de manera importante y convertirse en linajes de células heteroploides incubándoles bastante más allá del nivel de incubación 40-avo al 50-avo. La propagación de estos linajes de células
20 se hace algo más lenta entre el nivel de incubación trigésimoquinto y el cuadragesimoquinto y se registran anomalías crecientes en los cromosomas mientras que el linaje pierde su carácter fundamentalmente diploide, definido
25 arriba. Cuando la proporción de células anormales se eleva por encima del 25%, el linaje se ha convertido netamente en un linaje de células heteroploides, con características
30 epiteliales desde el punto de vista morfológico, y es capaz de producir tumores en los abazones del hamster. Recupera también su capacidad de reproducirse rápidamente, y puede ahora formar colonias en un medio de agar semi-sólido.

27.11.69

372269



do.

5 Los linajes de células de embrión de felino así producidos pueden infectarse directamente con ciertos virus patógenos, tales como los virus de enteritis infecciosa y rinotraqueitis de los felinos de la mamalitis (herpes) de los bovinos y de la leucemia del gato, y los picornavirus de los felinos, a pesar de sus características cromosómicas heteroploides y morfológicas. Por otra parte, los mismos virus pueden cultivarse ahora y transferirse y pasar de un cultivo de un tal linaje a otro, sin exponer los virus a contaminación o condiciones variables del ambiente.

15 Estas células heteroploides se prestan - por sí mismas a la producción en masa para este propósito y pueden crecer rápidamente y cultivarse en un medio nutritivo. Pueden utilizarse cualquier medio conocido en la técnica que proporcione las condiciones físicas y químicas necesarias y la composición nutritiva para el cultivo y el sub-cultivo, esto es, para el mantenimiento, el crecimiento individual y la multiplicación de estas células.

20 Se ha preferido, no obstante, utilizar el Medio Basal de Eagle con algo de suero de bovino y particularmente el mismo medio con caldo de fosfato de triptosa y con una cantidad doble de la usual de amino-ácidos y vitaminas. Este procedimiento se lleva a cabo ventajosamente en un intervalo de temperatura comprendido entre 32°C y 39°C, preferiblemente entre 35°C y 37,5°C. A fin de facilitar el sub-cultivo, se acostumbra a tratar las láminas confluentes de las células del linaje con tripsina o un agente de quelación inocuo, tal como ácido etilenedia

27.11.69

372269



mintetraacético (EDTA), antes de cada transferencia a un nuevo medio.

5 además de los cultivos monocapa usuales que utilizan los medios anteriores, puede ser posible también cultivar el linaje de células heteroploides de acuerdo con la presente invención en cultivos de células suspendidas en un medio líquido similar.

10 Con objeto de infectar el linaje de células con el virus, el cultivo del linaje de células puede mezclarse con una suspensión salina del virus obtenido por ejemplo a partir del exudado de cualquier animal infectado o de otras fuentes. En el caso de los virus de enteritis infecciosa de los felinos, se ha preferido utilizar intestino delgado infectado, nódulos linfáticos mesentéricos, médula ósea, heces, y bazo de los gatos.

15 Una vez que se ha infectado el linaje de células, se incuba como se ha descrito arriba. Se ensayan luego muestran en busca de modificaciones intra-nucleares tiñendo el cultivo con hematoxilina y eosina. Transcurridas aproximadamente 18 horas después de la infección, los núcleos infectados (aproximadamente 1-2% del total de los núcleos) consumen más hematoxilina que los núcleos no-infectados. Esto va seguido en las 6 horas inmediatamente siguientes por un crecimiento de los nucléolos, por un oscurecimiento homogéneo del resto del contenido del núcleo y por el desarrollo de una zona transparente alrededor del nucléolo o nucléolos, si existe más de uno, y de otra zona transparente inmediatamente dentro de la membrana nuclear. Durante las 24 horas siguientes, se observa que las células infectadas se contraen y adquieren un color

27.11.69

372269



2048
casí totalmente negro, antes de desprenderse por último -
del cubreobjetos. Cuando se hacen claramente evidentes los
cambios, unos pocos días después de la infección, el culti
vo infectado se puede guardar congelado a -30°C . Esto des
truye las células, pero el virus conserva su capacidad pa
ra infectar nuevos cultivos no contaminados del mismo li
naje de células.

Es posible atenuar o atenuar más aún una
cepa de virus, a la cual sea susceptible el linaje de célu
las de embrión de felino heteroploides, mediante incuba -
ción en serie en cultivos del linaje de células. El nuevo
linaje de células puede utilizarse, por consiguiente, no
sólo para el cultivo de tales virus sino también para ate
nuarlos, con ventaja, ya que los mismos se manipulan más
fácilmente en el estado heteroploide que en el diploide.
Así pues, el virus puede producirse en gran escala con -
más facilidad y fiabilidad debido al hecho de que el lina
je heteroploide puede multiplicarse y sub-cultivarse para
este propósito sin limitación o riesgo importante de dete
rioro de su calidad.

De acuerdo con la presente invención en
cualquier aspecto, por lo tanto, se proporciona un lina
je continuo de células heteroploides de embrión de felino,
que comprende células procedentes de embrión de felino, -
teniendo más de un 25% de las células características cro
mosómicas anormales en comparación con los cromosomas de
las células de embrión de felino. En un aspecto particu
lar, se obtiene un tal linaje por incubación sucesiva de
un linaje de células diploides, que se ha obtenido origi
nariamente del tejido de embrión de felino, más allá del



nivel de incubación 40-avo al 50-avo, hasta que la proporción de células que tienen características cromosómicas anormales se eleva por encima del 25% del total.

5 El linaje de células de acuerdo con la presente invención puede presentarse en asociación con un medio de cultivo adecuado, tal como un cultivo continuo de células heteroploides de embrión de felino. Como ya se ha indicado, tal medio es preferiblemente el Medio Basal de Eagle, modificado si es necesario para contener -
10 diversas cantidades de otros ingredientes que contribuyen al crecimiento y mantenimiento del cultivo. En otro aspecto, se proporciona un método para el crecimiento e incubación del linaje de células anteriormente definido o un cultivo del mismo, que comprende cultivar el linaje de células en
15 un medio nutriente y transferir algunas o la totalidad de las células a un medio nutriente fresco.

El nuevo linaje de células es eminentemente adecuado para la propagación de virus, particularmente de los virus de la enteritis infecciosa de los felinos y rinotraqueitis de los felinos, o picornavirus de -
20 los felinos, los virus de la mammalitis (herpes) de los bovinos y los virus de leucemina del gato. El método para la propagación de un virus susceptible de propagarse en tales linajes de células, o seleccionado del grupo arriba definido, comprende las etapas de preparar el linaje
25 de células heteroploides como un cultivo libre de microorganismos contaminante, inocular dicho cultivo con una cepa del virus, y mantener el cultivo de células hospedantes así infectadas para producir la multiplicación de la
30 cepa no contaminada de dicho virus. Los virus así produci

27.11.69



dos representan material antigénico que puede utilizarse en una forma inactivada o atenuada.

5 Para el propósito de inactivación, la cepa del virus puede tratarse, por ejemplo, por medios físicos o por un agente químico que destruye el virus y por consiguiente priva a la cepa de su actividad infecciosa y patogénica sin anular, no obstante, su capacidad para inducir una respuesta inmunogénica en el animal que se desea proteger contra la infección por una cepa virulenta del mismo virus. Por ejemplo, se han encontrado adecuadas la formalina o la β -propidactona para inactivar tales virus, en particular el virus de la rinotrqueitis de los felinos.

15 Cepas virulentas del grupo anterior pueden propagarse e incubarse en serie en el linaje de células heteroploides proporcionado por la presente invención y atenuarse suficientemente sin perder su inmunogenicidad. La presente invención, por consiguiente, proporciona también un método para atenuar un virus seleccionado del grupo anterior, que comprende las etapas de preparar el linaje de células heteroploides como un cultivo exento de micro-organismos contaminantes, inocular dicho cultivo con una cepa virulenta del virus, incubar en serie tal cultivo infectado del virus empleando cultivos del linaje de células heteroploides exentos de micro-organismos contaminantes hasta que el virus incubado pierde su infectividad y patogenicidad pero retiene todavía su poder inmunogénico. El número de incubaciones depende de la virulencia de la cepa del virus y puede llegar a ser necesario incubarles más de 40 veces para obtener una cepa satisfactoria. Ventajosamente, la cepa atenuada así producida no

29 NOV 1969

se invertirá al estado virulento al pasar del animal inoculado a otros animales en contacto con el primero.

5 El material antigénico, constituido por virus inactivados o atenuados producidos empleando el linaje de células heteroploides de felino, de acuerdo con la presente invención, puede presentarse como una vacuna en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede tomar la forma de un líquido inyectable, tal como una solución salina acuosa tamponada, o de un vehículo sólido que contenga, por ejemplo, estabilizadores u otros aditivos. Los estabilizadores que se han encontrado 10 adecuados para el propósito incluyen gelatina degradada, existente en el mercado como "Sol-u-pro", o sorbita.

De acuerdo con la presente invención, en un aspecto ulterior se proporciona un método para proteger 15 animales, en particular gatos, contra la enteritis infecciosa de los felino, la rinotraqueitis de los felinos o infecciones producidas por lo picornavirus de los felinos o la leucemia del gato. De un modo análogo se puede proteger el ganado vacuno contra la mammalitis (herpes) de los 20 bovinos. Los métodos respectivos comprenden la inoculación del animal susceptible con una vacuna contra la enfermedad de que se trate como se ha definido arriba, conteniendo dicha vacuna suficiente material antigénico para proporcionar protección contra una infección natural por una cepa no atenuada del virus en cuestión. 25

Tanto las vacunas atenuadas como las inactivadas contra la enteritis infecciosa de los felinos han protegidos con éxito gatos contra la invasión de una 30 cepa no atenuada del virus. Se prefiere utilizar una cepa

27.11.69

372260



inactivada del virus de la rinotraqueitis preparada de -
acuerdo con la presente invención y presentada como una -
vacuna para la protección de los gatos contra la enferme-
dad.

5 Los ejemplos que siguen ilustran la inven-
ción.

EJEMPLO 1

Una muestra, representando al menos apro-
ximadamente 1×10^6 células de un cultivo de la cepa de -
10 células en el nivel de incubación cuadragésimo, producido
de acuerdo con el Ejemplo 1 de la Memoria Descriptiva de
la Patente Española Nº 336.810 y Solicitud de Patente de
Estados Unidos Núm. de Serie 615.922, se transfirió a una
botella aplastada para uso médico de 112 ml de capacidad,
15 que contenía Medio Basal de Eagle (80 partes en volumen)
(ref. H. Eagle, Science, 1955, 122,504), modificado de -
tal manera que tuviese una cantidad doble de la usual de
amino-ácidos y vitaminas, caldo de fosfato de triptosa -
(10 partes en volumen), y suero de bovino (10 partes en
20 volumen) en forma de una solución estéril.

Los cultivos monocapa así formados se -
subcultivaron incubando en serie el contenido de una bo-
tella a 2 ó 3 botellas una o dos veces por semana. Para
este fin, se suspendieron nuevamente las células con una
25 solución al 0,5% de edetato sódico en una solución al -
0,1% de tripsina en el tipo anterior de medio salino tam-
ponado de fosfato.

Se observó que la velocidad de crecimien-
to disminuía hasta aproximadamente el nivel de incubación
30 45-avo, pero que volvía a ser normal después. Las anorma



lidades cromosómicas eran cada vez más abundantes y el cultivo adquirió gradualmente un carácter heteroploide. El linaje de células así obtenido se incubó ulteriormente hasta el nivel de incubación 61-avo.

5

EJEMPLO 2

Otra muestra del nivel de incubación 12-avo del procedimiento de cultivo descrito en el Ejemplo 5 de la Memoria Descriptiva de la Patente Española Núm. 336.810 se propagó por medio de incubaciones en serie de acuerdo con el método del Ejemplo 1 anterior, y la cepa de células así obtenida se convirtió gradualmente en un linaje de células heteroploides que se incubó ulteriormente hasta el nivel de incubación 61-avo.

10

EJEMPLO 3

15

Ambos linajes de células descritos en los Ejemplos 1 y 2 se infectaron en diversos niveles de incubación con virus de la enteritis infecciosa de los felinos tomados de una misma fuente, como se describe en la Memoria Descriptiva a la que se ha hecho referencia. Se encontró que los linajes de células eran susceptibles al ataque del virus de manera análoga a las cepas de células originales, y se expresó el grado de infección por el porcentaje de células infectadas a un nivel de dilución doble del virus.

20

25

Los resultados se tabulan como sigue:

	<u>Nivel de incubación de las células</u>	<u>% de células infectadas a dilución doble del virus, con virus obtenido de una sola fuente</u>
A	41	68
	44	70
	47	75

30

372260



	<u>Nivel de incubación de las células</u>	<u>% de células infectadas a dilución doble del vi- rus, con virus obtenido de una sola fuente</u>
	A	
	50	65
5	50-51 (mezclados)	70
	53	70
	54	67
	56	70
	56	71
10	57	70
	58	69
	59	69
	60	64
	61	61
15		
	B	
	12	44
	14	77
	17	69
	20	71
20	23	72
	32	72
	36	74
	37	77
	42	75
25	49	73
	55	76
	61	72

30 Se incubó ulteriormente en serie el vi-
rus de la enteritis infecciosa de los felinos por diversos
cultivos del linaje de células de embrión de felino, estan

372269



do algunos de los cultivos en la etapa diploide y algunos en la etapa tetraploide. En todos y cada uno de los casos, cuando los cambios intranucleares fueron evidentes, por tinción con hematoxilina y eosina, los cultivos infectados se congelaron y guardaron a -30°C .

El virus que se guardó congelado a -30°C se descongeló después y se incubó en cultivos no infectados de linajes de células de embrión de felino. En el momento apropiado, juzgado por la presencia de cambios intranucleares, los cultivos infectados de las células se guardarán nuevamente congelados a -30°C hasta la incubación siguiente.

Cuando se incubó el virus en linajes de células de embrión de felino, por lo general se añadió el virus simultáneamente con las células y el medio de cultivo al recipiente de cultivo. El cultivo de cepas de células de embrión que contenían el inoculante del virus se incubó a 37°C .

La cepa de virus, cuya atenuación para los gatos se reivindica, se incubó en serie en linajes de células de felino procedentes de los pulmones del embrión. Las etapas finales, para conseguir una atenuación satisfactoria, fueron como sigue:

25	Nivel de incubación del <u>virus</u>	Nivel de incubación <u>de las células</u>	
	40	15	} linajes diploides
	41	17	
	42	18	
	43	20	
30	44	26	

27.11.69

372269

29 NOV 1969



	<u>Nivel de incubación del virus</u>	<u>Nivel de incubación de las células</u>	
	45	53	} linajes heteroploides
	46	55	
5	47	56	
	48	60	
	49	62	
	50	64	
	51	65	
10	52	70	
	53	71	

El nivel de incubación 48-avo del virus - se ensayó en gatos inoculando tres animales experimentales con 1 ml. de la suspensión del virus.

15 Los resultados fueron los siguientes:

Número de leucocitos, promedio geométrico

Día	Después de la vacunación de 3 gatos	Después del enfrentamiento con virus de EI (1), virulentos, administrados oralmente		
		3 gatos vacunados	3 gatos de control	
	0	9.800	5.200	21.800
	1	8.700	NO DETERMINADO	NO DETERMINADO
	2	7.200	NO DETERMINADO	NO DETERMINADO
	3	6.700	8.600	10.400
25	4	5.700	9.100	15.300
	5	5.700	8.300	12.300
	6	6.600	10.900	5.400
	7	7.200	9.000	1.500 +
30	8	9.300	9.500	1.800 +

27.11.69

372269



continua. . .

9	10.000	9.300	2.600
10	9.400	12.100	9.500

5 + Uno de los gatos de control murió el 7º día, y otro el 8º día.

(1) EIF = Enteritis infecciosa de los felinos.

Se comprobó que el procedimiento de atenuación era satisfactorio, y el linaje de células de embrión de felino heteroploides pueden utilizarse para tal propósito con ventaja.

EJEMPLO 5

15 Cultivos del linaje de células heteroploides de embrión de felino obtenido en el Ejemplo 1 se infectaron con una muestra de exudado nasal u ocular de un gato que sufría rinotraqueitis. El exudado se mezcló con una solución salina tamponada con fosfato (2,0 ml) que contenía también 200 unidades de penicilina y 100 mg de estreptomina por mililitro.

20 Se prepararon monocapas de linajes de células de acuerdo con el Ejemplo 1 en cinco tubos separados. Se retiró el medio nutriente y se reemplazó con la mezcla tampón-exudado, incubándose a 37º C durante 2 horas. Se retiró luego la mezcla tampón - exudado y se lavaron las células con solución tampón estéril fresca. Los tubos infectados que contenían medio nutriente fresco (1,5 ml por tubo) se incubaron luego a 37º C en medio nutriente fresco (1,5 ml).

30 Se llevó a cabo a continuación un examen microscópico diario de los cultivos infectados y de los cultivos de control, preparados con solución salina -

27.11.69

29



estéril en lugar de con la mezcla tampón exudado.

Se observó el efecto citopático del virus.

Otros ensayos demostraron que los cultivos infectados estaban exentos de otro micro-organismos. El virus pudo transmitirse en serie a cultivos frescos en tubos de la misma cepa de células, en los cuales tuvieron lugar cambios degenerativos celulares semejantes. Experimentos de dilución adecuados demostraron ulteriormente que había tenido lugar multiplicación del virus.

Los virus obtenidos de este modo pueden inactivarse por tratamiento con formalina o β -propiolactona de acuerdo con el procedimiento usual conocido en la técnica, y pueden inocularse gatos con la vacuna así producida. Los resultados indican que se ha alcanzado un grado satisfactorio de inmunidad contra una invasión de una cepa virulenta del virus de la rinotraqueitis.

EJEMPLO 6

Cultivos del linaje de células heteroploides de embrión de felino obtenido en el Ejemplo 1 se infectaron con una muestra de exudado nasal u ocular de un gato que sufría "influenza de los felinos", que por consiguiente era una fuente de picornavirus de los felinos.

La muestra se mezcló con la solución salina tamponada con fosfato (2,0 ml), que contenía también 200 unidades de penicilina y 100 mg de estreptomina por mililitro.

Se retiró el medio nutriente de la monopa del linaje de células, y se reemplazó con la mezcla tampón-exudado, incubándose a 37°C durante 2 horas. La mezcla tampón-exudado se retiró después y se lavaron las



células con solución tampón estéril fresca. El linaje de células infectadas se incubó luego a 37°C en un medio nutritivo fresco (1,5 ml).

5 Se efectuó a continuación un examen microscópico diario del cultivo infectado y de un cultivo de control, preparado con solución salina estéril en lugar de con la mezcla tampón-exudado. Se encontró que la degeneración celular (efecto citopático) que apareció al cabo de varios días de incubación, no era diferente de la producida por los picornavirus humanos, por ejemplo el virus de la poliomielitis. El virus pudo transferir por incubaciones en serie en cultivos de la cepa de células, y experimentos de dilución adecuados demostraron que había tenido lugar una multiplicación del virus en la cepa de células. Ensayos adicionales demostraron que los cultivos así obtenidos por incubación en serie estaban exentos de otro micro-organismos contaminadores.

10

15

EJEMPLO 7

Se produjo un linaje heteroploide incubando en serie el linaje de células diploides de embrión de felino obtenido a partir del embrión total de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2 de la Memoria Descriptiva de la Patente Española Núm. 336.810.

20

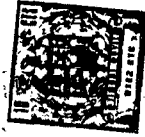
Tanto el nivel de incubación decimonono (etapa diploide) como el nivel de incubación 46-avo (etapa heteroploide) se infectaron con una misma fuente del virus de la enteritis infecciosa de los felinos, como en el Ejemplo 3 de la presente Memoria Descriptiva. El porcentaje de células infectadas era de 66% y 67%, respectivamente.

25

30

372269

27.11.69



EJEMPLO 8

5 Cultivos del linaje de células heteroploides de embrión de felino obtenido en el Ejemplo 1 se infectaron con el virus de la enteritis infecciosa de los felinos de la manera usual. Después de la incubación, se congelaron y se descongelaron tres veces los cultivos, tratándose después con una solución de formaldehído al 40% a fin de ajustar su concentración en el medio a 0,2%. Se incubó el cultivo con el agente inactivante a 37°C durante 10 3 días.

A una muestra de los cultivos tratados se añadió solución salina tamponada de fosfato (STF), suficiente para hacer la concentración final de STF igual al 25%. A otra muestra se añadió hidrogel de alúmina ajustando la concentración al 25%. 15

Grupos de 5 gatos se inocularon subcutáneamente con 1 ml de cada tipo de las vacunas anteriores, respectivamente. Veintiun días más tarde, los gatos recibieron una segunda dosis de la misma cuantía. 20

Pasados otros veintiun días, todos los gatos vacunados y 3 gatos de control hubieron de hacer frente a una invasión virulenta por vía oral del virus de la enteritis infecciosa de los felinos. No murió ninguno de los animales vacunados, en tanto que sucumbieron dos de los gatos de control. 25

Se dedujo que la vacuna inactivada producida de la manera arriba indicada proporcionaba una protección satisfactoria.

EJEMPLO 9

30 Se incubó 48 veces virus de la enteritis

5 infecciosa de los felinos en cultivos del linaje de células heteroploides de embrión de felino del modo descrito en el Ejemplo 3. La cepa de virus presenta en el fluido de cultivo y células de la última etapa de subcultivo se administraron por vía subcutánea a 3 gatos, sin dilución alguna, en una dosis de 1 ml y se observó un número de leucocitos satisfactorio en diversas etapas después de la inoculación, y dos de los animales atacados el día vigésimo-primeros después de la inoculación sobrevivieron al ensayo.

10 Todos menos uno de los animales de control sucumbieron a la infección.

EJEMPLO 10

Tres partes en volumen de la vacuna líquida preparada de acuerdo con el Ejemplo 9 se mezclaron con dos partes en volumen de una solución de sorbita al 25% y dos partes en volumen de una solución al 25% de "Solupro" (Marca Comercial). Se liofilizó la mezcla, y dos muestras del producto liofilizado seco se guardaron a 30°C durante 47 y 75 semanas, respectivamente, y otras dos muestras a 4°C durante iguales períodos de tiempo. Se comprobó que las vacunas reconstituídas tenían una efectividad satisfactoria en ensayos con cultivos de tejidos.

15

20

Se inocularon gatitos de nueve semanas con muestras de la vacuna y se les administró una nueva dosis dos semanas más tarde. Pasados otros 14 días, se sangraron los animales y se comprobó que en todos ellos existía un nivel satisfactorio de anticuerpos.

25

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 8 de Octubre de 1.968, bajo el Nº 47737/68, se acoge a los beneficios del Artículo

30

27.11.69

372269

lo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



5

- REINVINDICACIONES -

10

Los puntos de invención, propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Certificado de Adición en España, son los siguientes:

15

1.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 336.810, expedida el 2 de octubre de 1.967, por " un método para producir una cepa de células", caracterizadas por un método de producir un linaje permanente de células heteroploides de embriones de felino o un cultivo de la misma, que comprende el paso sucesivo de un linaje de células diploides, que ha sido originalmente derivado de tejidos de embriones de felino, en un medio que proporciona la condición física y química y composición de nutrición necesarias, para cultivar y subcultivar las células, más allá del nivel de paso cuarentaésimo o quincuagésimo hasta que la proporción de células que tienen características de cromosomas anormales ascienda al 25% del total, y separar las células del medio, si se desea.

25

30

372269

27.11.69



2.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal, caracterizadas por un método de cultivar o hacer pasar un linaje permanente de células heteroploides de embriones de felino, o un cultivo de las mismas que comprende el cultivo del linaje de células en un medio de nutrición y la transferencia de algunas o todas las células a un medio de nutrición nuevo, si se desea.

3.- Mejoras según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en las cuales el medio de nutrición es el Medio Basal de Eagle con suero de bovino.

4.- Mejoras según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en las cuales el cultivo se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 32 y 39°C, preferiblemente entre 35 a 37,5°C.

5.- Mejoras según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en las cuales el cultivo se lleva a cabo en forma de cultivos de monocapa que forman láminas confluentes de células.

6.- Mejoras según la reivindicación 5, en las cuales las láminas confluentes son tratadas con tripsina o un agente de quelación inocuo, antes de cada transferencia a un medio nuevo.

7.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal, caracterizadas por un método de propagar un virus susceptible de linajes permanentes de células heteroploides de embriones de felino, o cultivos de los mismos que comprende las operaciones de preparar el linaje de células heteroploides en forma de un cultivo libre de microorganismos contaminantes, inocular dicho cultivo con una cepa de virus y mantener el cultivo de células

27.11.69

372200



huesped infectado de tal manera que produzca una multipli-
cación de dichos virus.

5 8.- Mejoras según la reivindicación 7, en las cuales el virus es seleccionado de la clase que consis-
te en virus de enteritis infecciosa de los felinos, virus de rinotraqueitis de los felinos, picornavirus de los feli-
nos, virus de mammalitis de los bovinos (herpes), y virus de leucemia de gato.

10 9.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal, caracterizadas por un método de a-
tenuar un virus seleccionado de la clase que consiste en el virus de enteritis infecciosa de los felinos, virus de rinotraqueitis de los felinos, y cornavirus de los felinos, virus de mammalitis de los bovinos (herpes), y virus de
15 leucemia de gato, que comprende las operaciones de prepa-
rar el linaje de células heteroploides en forma de un cul-
tivo libre de microorganismos contaminantes, inocular dicho cultivo con una cepa virulenta del virus, y hacer pasar
20 serialmente tal cultivo infectado del virus utilizando -
cultivos del linaje de células heteroploides libre de mi-
croorganismos contaminantes, hasta que el virus hecho pa-
sar pierde su capacidad infectiva y patógena pero conser-
va todavía su poder de inmunización.

25 10.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal, caracterizadas por un método de pro-
ducir material antigénico, que comprende las operaciones de propagar un virus según cualquiera de las reivindica-
ciones 7 u 8, e inactivar seguidamente el virus por me-
dios físicos o químicos, tales como tratamiento con for-
malina o β -propiolactona, por métodos en sí conocidos.
30

29 NOV 1969

11.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal, caracterizadas por preparar a continuación una vacuna, que comprende un virus atenuado según el método de la reivindicación 9, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

12.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal, caracterizadas por preparar a continuación una vacuna que comprende un virus inactivado según el método de la reivindicación 10, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

13.- Mejoras según las reivindicaciones 11 ó 12, caracterizadas porque comprende un excipiente sólido farmacéuticamente aceptable, que contiene un excipiente de liofilización.

15

14.- Mejoras según la reivindicación 13, en las cuales el excipiente de liofilización contiene un estabilizador, tal como una gelatina o sorbita degradadas.

15.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 336.810, expedida el 2 de Octubre de 1.967, por: "Un método para producir una cepa de células"

20

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

Esta Memoria consta de veintidos hojas es cristas a máquina por una sola cara.

25

Madrid,

P.A.

29 NOV. 1969

Alberto de Elzaburu
Por Poder

372269