

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



(18) ES	(19) NUMERO	(10) A1
(20) FECHA DE PRESENTACION		

PATENTE DE INVENCION

446396

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
576.527	12 de mayo de 1.975	Norteamérica.

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

(64) TITULO DE LA INVENCION
Procedimiento para preparar vacunas estimulantes de la producción de anticuerpos contra virus.

(71) SOLICITANTE (ES)
CUTTER LABORATORIES, INC., entidad norteamericana.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Fourth and Parker Streets, Berkeley, California 94710, EE.UU. de A.

(72) INVENTOR (ES)
Victor Jack Cabasso.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
D. JAIME GOMEZ-ACEBO Y MODET

Esta invención se relaciona con la preparación de una nueva cepa celular, con el cultivo de virus en la misma y con la producción de vacunas a partir de dichos virus.

5 Aunque las células animales primarias se utilizan frecuentemente como medios de cultivo para el crecimiento de virus, es de común conocimiento que tales células son en general indeseables puesto que es necesaria la producción repetida de cultivos a partir de tejidos frescos. Desde un  
10 punto de vista económico, esto es impracticable cuando se requieren grandes cantidades para la producción comercial de vacunas. Las células primarias llevan también frecuentemente contaminantes bacteriales y virales.

15 Se están llevando a cabo constantemente investigaciones para descubrir cepas celulares viables, estables, o líneas celulares que sean económicamente adecuadas para la propagación de virus en la producción de vacunas humanas y veterinarias. Se ha encontrado cierto número de cultivos celulares pero muy pocos de ellos son aceptables por una o más  
20 razones. Por ejemplo, algunos de tales cultivos llegan a ser inestables en un periodo de tiempo y no mantienen una velocidad de crecimiento uniforme. Otros de ellos pueden adquirir un potencial para la carcinogénesis. En algunos cultivos, resultan insatisfactorias las velocidades de multiplicación  
25 y división de un paso al siguiente.

30 Se ha descubierto una nueva cepa celular, que puede ser cultivada y sub-cultivada durante hasta 35 pasadas aproximadamente, sin mostrar cambio alguno en sus características y que resulta adecuada para el crecimiento de diversos virus para la producción de vacunas. La nueva cepa

celular de la presente invención es una cepa celular diploidea derivada de tejido pulmonar embrionario de caninos (CLDLu). En primer lugar, las células se derivan del pulmón desmenuzado en un medio de crecimiento, preferiblemente MEM de Eagle suplementado con suero de ternera fetal y conteniendo antibióticos y un fungicida. El stock celular principal (MCS) del subcultivo quinceavo se congela y a partir de este MCS se obtienen cultivos celulares a partir de 20 pasadas adicionales (MCS+20) reservándose para los estudios de caracterización. La población celular se dobla en cada pasada entre los dos y cuatro días a 35-37°C.

Las siguientes características, obtenidas a partir de estudios sobre células de las pasadas MCS y MCS+20, definen la nueva cepa celular de esta invención:

1. Las células son del tipo fibroblasto.
2. Las células son diploideas tal y como se demuestra por su cariólogía.
3. Las células están libres de micoplasma, bacterias, hongos y agentes virales perjudiciales.
4. Las células no son tumorigénicas ni oncogénicas.
5. Las células son caninas tal y como se confirma por el número de cromosomas diploideos modales (de 78) y por los ensayos de inmunofluorescencia.

La presente invención incluye también un sistema de cultivo celular que comprende la cepa celular diploidea de pulmón canino fetal en un medio nutriente que es adecuado para el crecimiento de diversos virus. Preferiblemente, dicho sistema de cultivo celular incorpora suero de ternera fetal. Una composición preferida del sistema de cultivo celular comprende un inóculo de aproximadamente  $4 \times 10^6$

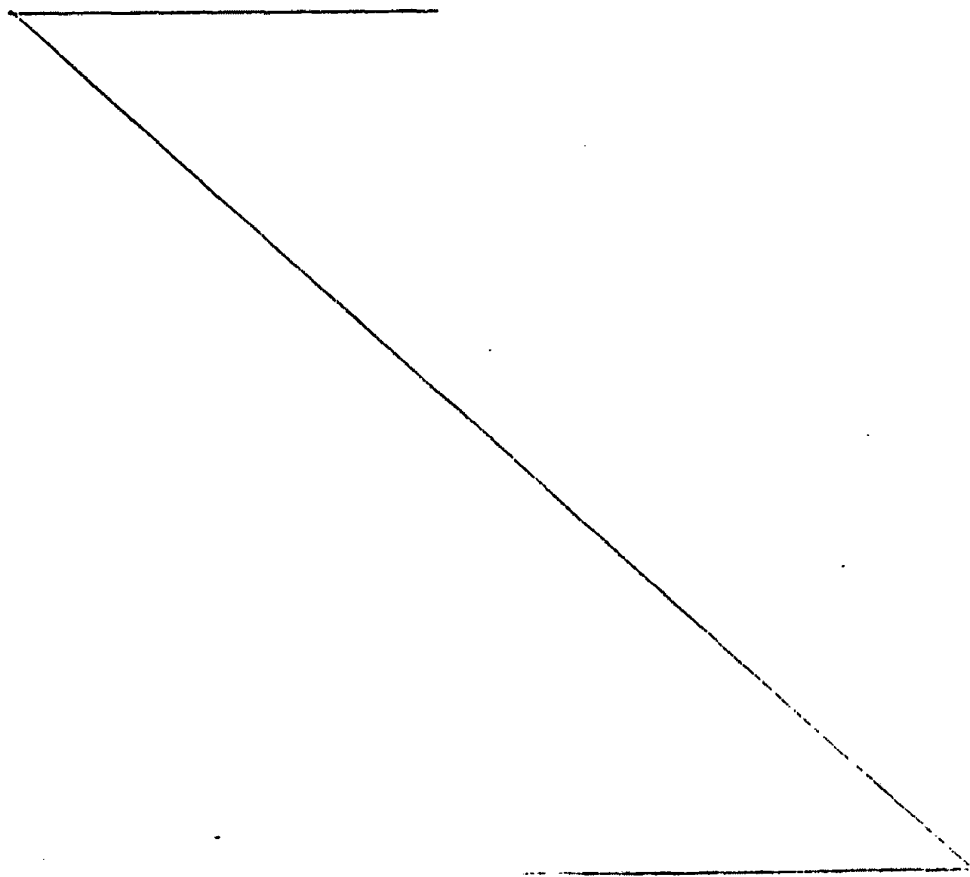
de las células pulmonares caninas fetales en una solución que es de 80-90 % aproximadamente con respecto a MEM de Eagle, aproximadamente 0,15 % con respecto a BSS de Earle con bicarbonato y entre 10 y 20 % de suero de ternera fetal (más preferiblemente 20 %). Se pueden emplear otras formulaciones de medios de cultivo de tejidos para el soporte de las células de pulmón canino fetal.

En el sistema de cultivo celular según la presente invención se puede emplear para cultivar una variedad de virus incluyendo: rabdovirus, por ejemplo cepas de Flury PV-12 y HEP de virus de rabia; paramixovirus, por ejemplo virus de parainfluenza tipo 3 y virus de moquillo canino (cepa Cabasso); orbivirus, por ejemplo virus de lengua azul; y virus de herpes, por ejemplo virus infecciosos de rinotraqueitis bovina. La cepa celular de la presente invención, en combinación con el medio nutriente, ha demostrado una notable superioridad con respecto a otras cepas celulares o líneas celulares, en su capacidad para soportar el crecimiento de diversos virus, en particular virus de rabia, que se traduce en unos títulos muy elevados de los virus. Igualmente, es de un interés particular el empleo del sistema de cultivo celular para la producción de virus de rabia para vacunas no solo adecuadas para uso veterinario sino también para uso humano.

La producción de vacunas cae también dentro del alcance de la presente invención. Los virus cultivados a partir del sistema de cultivo celular de esta invención, se procesan adicionalmente para obtener vacunas mediante métodos conocidos en la técnica. De este modo, el producto final de un cultivo de virus se puede emplear como tal o puede ser

atenuado o inactivado por cualquier procedimiento conocido para proporcionar un material antigénico no productor de enfermedades, que puede ser incorporado en una forma administrable y dosificado como una vacuna para estimular la producción de anticuerpos por el anfitrión, para la inmunización activa. La forma de dosificación puede incluir aquellos preparados que son adecuados para administración intranasal, oral o parenteral, pudiendo comprender adyuvantes fisiológicamente aceptables y otros medios de liberación retardada así como sales y/o agentes tampón.

Se ha llevado a cabo un depósito de la cepa celular de pulmón canino fetal de la presente invención en Rockville, Maryland 20852, como A.T.C.C. No. CL-175.



La invención podrá comprenderse mejor por los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

Producción de la cepa celular

5 Tejido pulmonar obtenido de un feto hembra asepticamente separado de una perra en su día 50 aproximadamente de gestación, se desmenuza, se tripsiniza durante 5 minutos a 37°C utilizando una solución al 0,25 % de tripsina y se deja crecer en una botella de 75 cm<sup>2</sup> en un medio compuesto  
10 de 89,85 % de MEM de Eagle en 0,15 % de BSS de Earle con bicarbonato sódico (1,43 g/litro) suplementado con 10 % de suero bovino fetal. Se incluyen antibióticos (penicilina, 100 unidades/ml, y estreptomina, 100 mcg/ml) y fungicida (anfotericina B, 2,5 mcg/ml). La población celular se dobla  
15 aproximadamente entre los 2 y 3 días a 35-37°C. Después de la tripsinización y cultivo en el mismo medio durante dos pasadas adicionales, se obtiene un crecimiento celular mejorado incrementando el suero bovino fetal a 20 % en las pasadas 4 a 15. En el subcultivo 15, el medio se modifica adicionalmente por  
20 la inclusión de tampón HEPES 0,01 M. Las células obtenidas en el subcultivo 15 se congelan para proporcionar un stock principal de semillas celulares (MCS) que se utiliza en el mismo medio modificado y se sub-cultiva durante 20 pasadas adicionales (MCS+20). A continuación, se caracterizan las  
25 células de la pasada 15 (MCS) y las células de la pasada 35 (MCS+20).

Las células de MCS y MCS+20 son similares a fibroblastos y están libres de micoplasma, levadura, bacterias y hongos, según se determina por la norma standard P-72 de  
30 United States Department of Agriculture (USDA) Animal &

Plant Health Inspection Service, APHIS, Veterinary Services  
(Formely Veterinari Biologics Services (VBS).

5 Los resultados del análisis de cromosomas de las células se muestran en la siguiente Tabla I, en donde se indica que las células son caninas y la retención es de cariotipo diploide.

TABLA I - DISTRIBUCION DE FRECUENCIA DE CROMOSOMAS EN 50 CELULAS

Cromosomas	59	63	65	68	69	71	72	73	74	75	76	77-78	79	80	81	82	
Células - MCS		1		1	2		2	1	3	3	3	3	23(46%)	5		2	1
Células - MCS+20	1		1			2		3	2	2	8	3	22(44%)	3	2		1

El análisis cariotípico para las células MCS y MCS+20, confirma también la similitud morfológica entre la gama de 20 pasadas.

15 Ensayos efectuados con la norma Standard P-72 VBS, demuestran que las células están libres de agentes virales perjudiciales.

20 Se efectúan ensayos relativos a la tumorigenicidad y oncogenicidad en hamsters sometidos a tensión con cortisona, de acuerdo con la norma Standard VBS P-72, anexo B, publicada por la Veterinary Biologics Division de USDA, 1 de julio, 1970. No existe evidencia alguna de formación de tumores y no se detectaron anomalías en la comprobación de bolsas u órganos en las cavidades corporales de los hamsters.

25 El ensayo con respecto a las células no caninas mediante la técnica de inmunofluorescencia de acuerdo con la norma standard VBS P-72, anexo D, publicado el 1 de julio de 1.970, confirma la identidad canina de la cepa celular y demuestra la ausencia de contaminación con especies eterólogas de células de uso simultáneo en nuestros laboratorios.

EJEMPLO 2

Método general para el cultivo de virus en la cepa celular

Se infectan células CLDLu bien en suspensión o bien después de la formación de una monocapa confluyente en recipientes de cultivo, tales como tubos o botellas de 907 g. A los recipientes de cultivo, que contienen las células, se añade virus adecuadamente diluido, tal como 0,2 ml de una dilución de virus de  $10^{-2,0}$  a  $10^{-3,5}$ , lo que representa una multiplicidad de infección de 0,0001 a 1. Si el virus se añade a células suspendidas, se requiere un periodo de adsorción de aproximadamente 1 hora a 34-37°C. El virus diluido que se añade a las monocapas celulares, permanece en contacto con las células durante un periodo de tiempo, tal como de 0,5 a 1 hora, a 34-37°C, para permitir que tenga lugar la adsorción. Para las células infectadas en suspensión, el medio de crecimiento consistente en aproximadamente 80-85 % de MEM de Eagle en aproximadamente 0,15 % de solución de sal equilibrada de Earle, suplementado con 15 a 20 % de suero de ternera fetal, proporciona los nutrientes necesarios para permitir que tenga lugar la formación de monocapas. La exclusión de contaminantes microbiales se mantiene por la presencia de combinaciones de formulaciones antibióticas, tal como 100 unidades/ml de penicilina y 100 mcg/ml de estreptomycinina o 30 unidades/ml de neomicina y 30 unidades/ml de polimixina, más 2,5 mcg/ml de anfotericina B. El pH del medio de crecimiento y mantenimiento, se controla por la adición de tampón HEPES 0,01 M y bicarbonato sódico al 0,19 %.

Después de la incubación a 34-37°C durante un periodo suficiente para permitir que tenga lugar la réplica viral, se recogen fluidos infectados cuando, en el caso de virus fitolíticos, el 70-90 % de las células infectadas exhi-

ben un efecto fitopatogénico típico. Para los virus no fitolíticos, los fluidos infectados se recogen cuando la cresta de crecimiento viral ha tenido lugar, tal y como se muestra por las valoraciones previas de la curva de crecimiento, normalmente 2-7 días después de la infección. Los ciclos múltiples de recogidas virales de fluidos infectados son también posibles en el caso de los virus no fitolíticos, mediante separación del medio agotado, adición de medio fresco e incubación continua de las células infectadas hasta que se consigue, en 1-3 días, una nueva cresta de crecimiento viral.

### EJEMPLO 3

#### Cultivo de Rabdovirus en la cepa celular

Para adaptar rabdovirus al sistema de cultivo celular, se crecen cepas de Flury PV-12 ó HEP de virus de rabia en células CLDLu durante 5-9 pasadas, para preparar virus de semillas. Transcurridos 3 ó 4 días, las células se infectan en suspensión, cuando los ensayos de anticuerpos fluorescentes muestran un 10-50 % de células fluorescentes, se separan las células infectadas de la pared cristalina del recipiente de cultivo con solución de tripsina-EDTA y se resuspenden en el medio de crecimiento. Se añaden células de cada recipiente de cultivo utilizado en el primer ciclo de crecimiento, a cada uno de dos recipientes de cultivo nuevos para el segundo ciclo de crecimiento. Transcurridos 3 ó 4 días de la división celular 1:2, los ensayos fluorescentes de anticuerpos de las células infectadas demuestran la presencia de células positivas al 100 % al antígeno de la rabia. Los fluidos infectados son recogidos, reunidos y almacenados a -70°C en porciones alicuotas. Los títulos de estas cosechas de virus oscilan entre  $10^{5,5}$  y  $10^{7,5}$  ratón LD<sub>50</sub>/ml.

EJEMPLO 4

Cultivo de paramixovirus en la cepa celular

Se prepara virus de parainfluenza, tipo 3, a partir de virus infectados con células ATCC PK-15, representando este material 3-4 transferencias de cultivo de tejido del virus. Transcurridos de 4 a 6 días desde la inoculación de los cultivos celulares CLDLu, las células muestran una marcada degeneración en el momento de ser recogidas. Las células y fluidos son reunidos y almacenados a -70°C en partes alicuotas. Los títulos de tales recogidas de virus oscilan entre  $10^{6,0}$  y  $10^{7,0}$  TCID<sub>50</sub>'s/ml.

similarmente, se prepara virus de moquillo canino (cepa Cabasso) a partir de suspensiones embriónicas de pollos infectadas con virus, representando este material de 40 a 45 transferencias de subcultivo del virus. Transcurridos de 3 a 4 días desde la inoculación de la suspensión celular CLDLu, las células muestran cierta degeneración en el momento de ser recogidas. Las células y fluidos son reunidos y almacenados a -70°C en partes alicuotas. Los títulos de estas recogidas virales oscilan entre  $10^{3,0}$  y  $10^{4,0}$  TCID<sub>50</sub>'s/ml.

EJEMPLO 5.

Cultivo de virus de herpes en la cepa celular

Se prepara virus de rinotraqueitis bovino infeccioso a partir de células primarias de riñón de bovinos infectadas con virus, representando este material de 3 a 4 transferencias de cultivo de tejido del virus. Transcurridos de 4 a 6 días desde la inoculación de los cultivos de CLDLu, aproximadamente el 75 % de las células aparecen afectadas, en cuyo momento se recogen. Las células y fluidos son reunidos y almacenados a -70°C en partes alicuotas. La valoración de



caracterizado porque el medio nutriente incluye suero de ternera fetal.

5 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho virus es un miembro del grupo consistente en virus de rabia, virus de rinotraqueitis infecciosa bovina, virus de moquillo canino, virus de parainfluenza tipo 3 y virus de lengua azul.

10 4.- Procedimiento para preparar vacunas estimulantes de la producción de anticuerpos contra virus, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 12 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 14 JUN 1977

CUTTER LABORATORIES, INC.

