



ESPAÑA

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

11	NUMERO	10	A1
21			
22	FECHA DE PRESENTACION		

20 JUL. 1978

PATENTE DE INVENCION

60	PRIORIDADES:	92	FECHA	93	PAIS
91	NUMERO				
	52674/76		16-12-1976		Gran Bretaña

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA
			C12K, A61K		

54	TITULO DE LA INVENCION
"UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE GAMMA-GLOBULINAS Y ACIDOS INMUNONUCLEICOS"	

71	SOLICITANTE (S)
THE INTERNATIONAL INSTITUTE OF DIFFERENTIATION LIMITED (Folio A/28150)	

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Valley House, Hirzel Street, St. Peter Port, Guernsey, Islas del Canal

72	INVENTOR (ES)
Dimitri Viza, Dimitri Adamopoulos y John Phillips	

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-67.655)	

1 Esta invención se refiere a la producción de material
inmunológico, y en particular se refiere a la producción -
de gammaglobulinas, ácidos inmunonucleicos y productos in-
munodializados, por inducción y cultivo de líneas celula--
5 res in vitro.

 Una necesidad fundamental para la supervivencia de ---
animales es la capacidad de resistir la infección por orga-
nismos parásitos tales como virus, bacterias, hongos y ani-
males parásitos presentes constantemente en el medio cir--
10 cundante. La inmunidad de los animales para tales organiz-
mos es aportada por una variedad de diferentes mecanismos
que incluyen la fagocitosis, la actividad química de los -
anticuerpos, y la producción de interferones para inhibir
la reproducción de los virus.

15 Durante las dos últimas décadas ha habido una inves-
tigación considerable en diversos campos inmunológicos, in-
cluyendo el estudio de las reacciones inmunológicas que im-
plican la producción de material que combate específicamen-
te a los antígenos particulares introducidos en un animal.
20 La producción de material capaz de transferir estas reac-
ciones inmunológicas específicas, bien a portadores no in-
munizados cuando se inyectan in vivo, o a células "natura-
les" capaces de una reacción inmunológica cuando se incu--
ban in vitro, es evidentemente de importancia para la in--
25 vestigación médica y veterinaria. Véase, por ejemplo, H.
S. Lawrence: "The transfer in humans of delayed skin sensi-
tivity to streptococcal M substance and to tuberculin with
disrupted leukocytes", J. Clin-Invest, (1955), 34, 219-30,
ó "Transfer of immunological information in humans with --
30 dialysates of leukocyte extracts", Trans. As. Amer. Physi-

1 cians, 1968, 76, 84-91. La presencia de células vivas es
esencial para la reproducción de tales materiales inmunoló-
gicos.

5 Las células linfoides de los animales que se han inmu-
nizado contra un antígeno específico llevan incorporada --
probablemente la información inmunológica en sus ácidos nu-
cleicos, formando los llamados "ácidos inmunonucleicos", -
que probablemente llevan la memoria inmunológica. Estos -
ácidos inmunonucleicos se caracterizan por su capacidad pa-
10 ra conferir reactividad inmunológica contra antígenos espe-
cíficos a linfocitos "naturales" cuando se inyectan in vi-
vo, o cuando se incuban linfocitos "naturales" con los áci-
dos inmunonucleicos in vitro. Los animales con tales célu-
las linfoides "sensibilizadas" pueden reaccionar fácilmen-
15 te en un nuevo encuentro con el antígeno correspondiente y
resistir, por ejemplo, los ataques de organismos bacteria-
nos o víricos que llevan este antígeno.

Se ha establecido una variedad de líneas de células -
20 in vitro de origen humano y animal, pero no se ha logrado
un sistema de cultivo satisfactorio para la producción - -
in vitro de gammaglobulinas específicas para un antígeno -
dado. Las células linfoblastoides en cultivo pueden produ-
cir espontáneamente anticuerpos que se dirigen a antígenos
desconocidos, y por lo tanto no pueden usarse para ningún
25 fin práctico. Además, las células en cultivo cambian fre-
cuentemente sus características cuando se cultivan durante
cualquier tiempo, y pierden algunos atributos de su estado
diferenciado. Por lo tanto, se consideró improbable que -
pudiera encontrarse una línea de células que fuera capaz -
30 de ser inducida a producir ácidos inmunonucleicos específi

1. -cos, es decir capaces de incorporar en los ácidos nucleicos de las células la información contenida en los ácidos inunucleicos exógenos específicos, y, además, de reproducir tales ácidos inunucleicos específicos. También se
5 consideró improbable la producción de anticuerpos específicos (gammaglobulinas) usando un cultivo de una línea celular.

Sin embargo, al efectuar una investigación sobre una línea de células fibroblastoides establecidas conocida como LDV/7, se descubrió sorprendentemente que cuando se in
10 cubaban células LDV/7 con ácidos inunucleicos específicos (denominados en adelante i-RNA e i-DNA) obtenidos de células linfoides donadoras, humanas o animales, sensibilizadas previamente para un antígeno dado, las células in
15 corporarían esta información inmunológica y reproducirían las moléculas inductoras. Además, cuando las células - - LDV/7 inducidas se rompían y después se dializaban, se en
contró que el producto de la diálisis transfería inmunidad específica, por mediación de las células, a otras células, tanto in vivo como in vitro. Naturalmente, esta -
20 inmunidad podía transferirse a células LDV/7 "naturales" que se seguirían después reproduciendo los ácidos inunucleicos usados originalmente. Un producto de diálisis con estas propiedades se denomina en adelante producto de
25 inmunodiálisis. Se descubrió también que la incubación - de la línea de células con ácidos inunucleicos y/o productos de inmunodiálisis induciría a las células a producir gamma-globulinas específicas para el antígeno contra el que se había inmunizado el donador original.

30 La línea de células LDV/7 se desarrolló a partir de

1 leucocitos sanguíneos periféricos obtenidos a partir de --
un voluntario varón, aparentemente sano, de 75 años.

5 Las células pueden desarrollarse en un cultivo en --
suspensión, bien en cultivos estáticos o en cultivos en ro-
tación, y también pueden cultivarse en agar. Esta propie-
dad es particularmente útil, ya que permite aplicar méto-
dos bacteriológicos bien establecidos al control in vitro
de células humanas. Es posible la formación de colonias,
por ejemplo, y es también posible estudiar el efecto de -
10 diversos factores, tales como el factor estimulante de la
colonia, en la diferenciación de las células.

La línea de células se estableció inicialmente por -
medio del siguiente procedimiento (los tantos por ciento
citados en toda la Memoria son en volumen):

15 La mayor parte de los eritrocitos se separaron de la
muestra original de sangre por adición de 20% de Plasma--
gel, y se desecharon después de sedimentar en tubos de en-
sayo. La suspensión recuperada tenía una relación de eri-
trocitos a leucocitos de menos de 20:1. Los leucocitos -
20 así recuperados se pusieron después en suspensión en medio
RPMI 1640 que contenía 20% de suero fetal de ternero, a -
una concentración de 2×10^6 leucocitos/ml. Dos tercios
del medio se sustituyeron por medio de nueva aportación -
dos veces por semana. Como hubo muertes de células en --
25 las primeras semanas, los cultivos se concentraron lo ne-
cesario para mantener la concentración de células por en-
cima de 10^6 células/ml.

30 Las células se cultivaron en frascos de vidrio Roux.
Seis semanas después del comienzo de los cultivos, las cé-
lulas de uno de estos frascos mostraron características -

1 de desarrollo, es decir se hicieron mayores y empezaron a multiplicarse, y se usaron para establecer inicialmente - la línea de células LDV/7.

5 Esta línea de células se ha desarrollado desde entonces en grandes cantidades, usando las técnicas de propagación que se describen a continuación:

10 La línea de células LDV/7 puede mantenerse en una variedad de medios nutrientes. Puede cultivarse en medio RPMI 1640 que contiene de 5% a 30% de suero fetal de ternero. Preferiblemente, el medio nutritivo consta de medio RPMI que contiene 10% de suero fetal de ternero. Además, puede usarse medio Esencial de McCoy e Eagle para el subcultivo de la línea de células.

15 Las células crecen en suspensión a 37°C y forman aglomerados que pueden dispersarse por agitación suave del medio. Las células se someten a un paso al menos tres veces por semana. El número usual de siembra es de 5×10^5 células/ml, y las células se dejan crecer en cultivo estático hasta que se alcanza una concentración de 10^6 células/ml. Las células se desarrollan también en cultivo en rotación, en el que un agitador magnético giratorio estéril mantiene a las células en suspensión en el medio nutritivo. Puede obtenerse después una concentración superior, del orden de $1,5 \times 10^6$ células/ml. El tanto por ciento de células muertas es del orden de alrededor de 5%, pero varía según las condiciones del cultivo. El tiempo de generación de las células es de aproximadamente 24 horas, dependiendo también de las condiciones de cultivo.

25
30 En general, las condiciones tales como pH y temperatura en las que se propaga la línea de células son sustan

1 cialmente las mismas que las que los leucocitos encontra
rían en un ser humano.

5 El análisis cariotípico de las células mostró que -
la línea de células LDV/7 es hipotetraploide. El número
de cromosomas varía entre 80 y 93. Un estudio de la mor
fología de las células bajo el microscopio óptico reveló
un tamaño de células heterogéneo, y que la mayor parte -
de las células tienen un aspecto similar a un blasto. -
Un trabajo posterior usando un microscopio electrónico -
10 confirmó la heterogeneidad de la línea de células, que -
mostraba células mononucleares redondas de diverso tama
ño con diferenciación citoplásmica y retículo endoplásmi
co rugoso, y propiedades macrófagas. Parece haber al me
nos dos poblaciones celulares, una de células pequeñas -
15 de menos de 15 micras de diámetro, y una de células gran
des de desde 15-30 micras de diámetros. Aparentemente -
las células grandes se derivan de las pequeñas.

Se han obtenido tres colonias con números de cromoso
mas de 84 para la primera y de 85 para la segunda y la -
20 tercera, lo que atestigua la eficacia de la formación de
colonias.

Las propiedades fagocíticas de las células se estudia
ron también bajo el microscopio electrónico. Podían ver
se claramente algunas de las células fagocitadas por otras
25 células. No se descubrió ninguna partícula vírica en las
micrografías electrónicas obtenidas, ni de las muestras -
tomadas en las condiciones usuales de cultivo ni de culti
vos desarrollados a +40°C. Conviene advertir que esta lí
nea de células es muy sensible a la cortisona hormonal es
30 teroide adrenocortical, lo que sugiere la presencia de --

04018

1 células linfoblastoides y/o células pedunculares. Tam---
bién es de advertir que no se detectaron antígenos de vi-
rus EB por inmufluorescencia.

5 La tipificación tisular de las células LDV/7 para --
determinar la histocompatibilidad para antígenos HL-A ré-
veló la presencia de las siguientes especificidades: HLA 2
y HLA 32 para el primer "locus" y especificidad HLA W 14
para el segundo "locus". Sin embargo, se observó también
10 una reactividad débil con otros antisueros para otras es-
pecificidades para HLA, pero ésto se consideró no especí-
fico.

15 Las células LDV/7 se han depositado en el Laboratoire
d'Immunobiologie, Faculté de Medecine Broussais Hotel-Dieu,
15 Rue de L'ecole de Medecine, Paris 75006, y están dispo-
nibles para el público a petición. Se describe la línea
de células LDV/7, y se reivindica un procedimiento para -
su propagación, en la Solicitud de patente española - - -
465.060, presentada en igual fecha que la

20 No es posible en todos los casos producir material -
inmunológico de otras líneas de células establecidas, ya
que no todas las líneas de células son inducibles del mo-
do descrito anteriormente en relación con la línea de cé-
lulas LDV/7. En particular, se descubrió que no podían -
inducirse tres líneas de células obtenidas de pacientes -
25 de leucemia, dos de tumores de linfoma de Burkitt y tres
establecidas a partir de linfocitos periféricos obtenidos
de voluntarios sanos. Sin embargo, se consiguió una in--
ducción con éxito cuando se usaron las líneas de células
de linfoblastoides BRI 8 y BEC 11, aunque no en el grado
30 alcanzado por la línea de células LDV/7.

1 Se ha puesto de manifiesto que una condición que tie
ne que cumplir una línea de células para lograr una induc
ción con éxito de un modo sencillo, y para que esa línea
de células produzca después gamma-globulinas específicas,
5 es el uso de una línea de células que ya es productora de
gamma-globulinas. Naturalmente, tales gamma-globulinas -
se dirigen contra antígenos desconocidos, como se dijo an
tes. Por ejemplo, las líneas celulares que origin linfoc
de (líneas de células de mieloma o linfoblastoides) que -
10 satisfacen este criterio pueden inducirse para producir -
gamma-globulinas específicas., i-RNA e i-DNA. No obstan
te, no ha de excluirse la posibilidad de que puedan indu
cirse líneas de células que no producen gamma-globulinas
espontáneamente. La inducción de líneas de células que -
15 ya producen gamma-globulinas espontáneamente, usando las
técnicas descritas anteriormente en relación con la línea
de células LDV/7, conducirá pues a la producción de gamma-
-globulinas con la misma especificidad que el material in
ductor.

20 La presente invención proporciona, por lo tanto, un
procedimiento de producción de gammaglobulinas y ácidos -
inmunonucleicos (tal como se han definido anteriormente),
ambos específicos para un antígeno dado, que comprende:

25 (i) cultivar in vitro una línea celular inducible en
presencia de ácidos inmunonucleicos específicos o produc
tos de inmunodiálisis específicos, obtenidos o bien de cé
lulas linfoides donadoras humanas o animales sensibiliza
das para dicho antígeno específico, o de células de una -
línea de células previamente inducida sensibilizadas para
30 dicho antígeno específico, ó en presencia de la fase lí-

1 quida de un cultivo de una línea de células previamente -
inducida sensibilizada para dicho antígeno específico, y
(ii) extraer gamma-globulinas de la fase líquida del
cultivo de células así inducidas y/o extraer los ácidos -
5 inmunonucleicos de las células así cultivadas.

En un segundo aspecto, la presente invención propor-
ciona un procedimiento de producción de productos de inmu-
nodiálisis, como se han descrito anteriormente, que com-
prende:

10 (i) cultivar in vitro una línea de células inducible
en presencia de ácidos inmunonucleicos específicos obteni-
dos, o bien de células linfoides donadoras humanas o ani-
males sensibilizadas para dicho antígeno específico, o de
células de una línea de células previamente inducidas sen-
sibilizadas para dicho antígeno específico, o bien en pre-
15 sencia de la fase líquida de un cultivo de una línea de -
células previamente inducidas sensibilizadas para dicho -
antígeno específico, y

(ii) obtener el producto de inmunodiálisis de las cé-
20 lulas así cultivadas.

Para llevar a cabo la inducción de ciertas líneas de
células, las condiciones empleadas en relación con la lí-
nea de células LDV/7 son suficientes. En otros casos pue-
den requerirse modificaciones triviales de tales técnicas,
25 tales como el tiempo de incubación, o pueden ser necesari-
as modificaciones más sutiles, tales como cambiar la su-
perficie de las células usando enzimas proteolíticas, o -
el tratamiento con ácidos embrionario nucleicos.

Las líneas de células que pueden emplearse en los --
30 procedimientos de la presente invención incluyen líneas -

1 de células mutantes derivadas de la línea de células ---
LDV/7. Naturalmente, tal línea de células mutantes tie-
ne que ser estable para cualquier uso práctico. El cambio
hereditario que causa la línea de células mutantes puede
5 ser espontáneo, o puede inducirse por medio de diversos -
agentes químicos o físicos, tales como rayos X o luz ul-
travioleta.

En el procedimiento de la presente invención para la
producción de gamma-globulinas específicas, se prefiere -
10 cultivar líneas de células de origen linfoide (líneas de
células de mieloma o linfoblastoides) que espontáneamente,
antes de la inducción, producen gamma-globulinas, por ejem-
plo, contra antígenos desconocidos, en sus medios de cul-
tivo. Se prefieren más particularmente las líneas de cé-
15 lulas de mielomas. Si hay que emplear una línea de célu-
las linfoblastoides, se prefiere particularmente cultivar
la línea de células LDV/7.

Tanto en la producción de ácidos inmunonucleicos, --
particularmente i-RNA, como en productos de inmunodiálisis
20 según la presente invención, pueden emplearse líneas de -
células inducibles de origen linfoide, como anteriormente,
que producen espontáneamente gamma-globulinas antes de la
inducción. Se prefiere también el uso de la línea de cé-
lulas linfoblastoides LDV/7. Naturalmente, estas líneas
25 de células pueden usarse también en la formación de pro-
ductos de inmunodiálisis por el procedimiento descrito an-
tes.

El ácido inmunonucleico, o, en el procedimiento de -
preparación de gamma-globulinas o ácidos inmunonucleicos
30 específicos, el producto de inmunodiálisis empleado para

1 -inducir inicialmente la línea de células empleada, se ob-
tiene de un donador humano o animal previamente inmuniza-
do (por ejemplo oveja, conejo, cobaya o rata). Cuando se
emplean donadores animales, usando animales exentos de --
5 gérmenes e inmunizados contra un antígeno, es posible una
sensibilización virtualmente monoespecífica. El i-RNA pue
de extraerse de las células linfoides del donador por el
método de fenol en caliente, y el i-DNA por extracción con
fenol frío usando un agente fuerte formador de quelatos,
10 por ejemplo 4-aminosalicilato de sodio, y un detergente,
por ejemplo triisopropilnaftalensulfonato de sodio. La -
incubación de estos ácidos inmunonucleicos o productos de
inmunodiálisis con una línea de células capaces de repro-
ducir las moléculas inductoras, por ejemplo las líneas de
15 células linfoblastoides conocidas como LDV/7 y BRI 8, da
como resultado la producción de grandes cantidades de áci
dos inmunonucleicos específicos para un antígeno dado. La
reproducción o duplicación de los ácidos inmunonucleicos
inductores tiene lugar en el sistema de cultivo de las cé
lulas al mismo tiempo que la reproducción de los propios
20 ácidos nucleicos de las células durante el curso normal de
la división celular. Esto podría deberse, por tanto, a -
la desrepresión de ácido nucleicos endógenos, es decir des
represión de DNA que entonces produce el correspondiente
25 i-RNA. Se apreciará, sin embargo, que no parece haber --
una barrera de especie que impida, por ejemplo, la induc-
ción de la línea de células linfoblastoides LDV/7, que es
de origen humano, por el i-RNA obtenido de las células --
linfoides de oveja.

30

Subsiguientemente puede producirse un producto de --

1 - inmunodiálisis rompiendo las células inducidas, por ejem-
plo, por técnicas de congelación-descongelación repetida,
o por medio de un homogeneizador, y dializando después el
5 producto de la homogeneización. Este producto de immu-
diálisis de los leucocitos humanos o animales sensibiliza
dos para un antígeno dado, contiene moléculas de peso mo-
lecular menor de 10.000. El producto de diálisis es ca-
paz de transferir la información inmunológica a las célu-
las del cultivo. Estas células, tras la incubación con -
10 el producto de inmunodiálisis inductor, demostraron produ-
cir i-RNA e i-DNA que llevaban la misma especificidad que
el producto de inmunodiálisis usado para la inducción. La
actividad del producto de inmunodiálisis no se destruyó -
por tratamiento con RNA-asa o DNA-asa, pero se destruyó -
15 por tratamiento con pronasa. Esto sugeriría que la infor-
mación era transportada por una pequeña proteína de peso
molecular menor de 10.000, y que esta información podría
transcribirse a un ácido nucleico. Aunque el mecanismo -
de tal transcripción permanece oscuro, este resultado, es
20 decir la transferencia de información de proteínas a áci-
dos nucleicos, es totalmente inesperado para los conoci-
mientos existentes sobre biología molecular. Conviene ad-
vertir que la reciente evidencia sugiere que el i-RNA res-
ponsable de la transferencia de inmunidad para un antígen-
25 no específico es RNA mensajero; véase P. Bibello, M. - -
Fishman y G. Koch, Cell Immunol. 23, 309-319 (1976).

Se han encontrado anticuerpos específicos (gamma-glo-
bulinas) en la fase líquida obtenida de cultivos de célu-
las inducidas con i-RNA, i-DNA y/o productos de inmunodiá-
30 lisis. Sorprendentemente, estas gamma-globulinas especí-

1 -ficas (principalmente IgG) eran siempre de especificidad
humana cuando la línea de células empleada era de origen
humano, aun cuando el ácido inmunucleico inductor fuera -
de origen animal (por ej. de oveja, de conejo). Esto su-
5 giere también la desrepresión del genoma de la célula por
tadora por el ácido nucleico del animal. Esto está apoya
do por la siguiente evidencia. El proceso de la inducción
de líneas celulares causa cambios superficiales en las cé-
lulas, y en particular la aparición de receptores de anti-
10 genos específicos que son probablemente gamma-globulinas.
Además, los experimentos con células LDV/7, i-RNA de ove-
ja y gamma-globulina anti-oveja de conejo muestran que no
se pueden detectar gamma-globulinas de oveja en los culti-
vos inducidos, lo que indica que las gamma-globulinas es-
15 pecíficas producidas por las células LDV/7 son alotipos -
humanos. Además, cuando se extrajeron los anticuerpos es-
pecíficos sobre una columna inmuno-absorbente del corres-
pondiente antígeno, y se sometieron a ensayo después de -
la elución, sólo había presentes alotipos humanos.

20 Además, la incubación de células no inducidas con la
fase líquida de un cultivo inducido sí induce la produc-
ción de i-DNA e i-RNA en las células "naturales", y tam-
bien, con bastante frecuencia, la producción de gamma-glo-
bulinas específicas. Por consiguiente, los factores de -
25 inducción del medio de cultivo tisular, así como los anti-
cuerpos, pueden extraerse y purificarse. Las gamma-globu-
linas pueden extraerse usando una columna de inmunoabsor-
bente específico con el correspondiente antígeno o anti-
30 cuerpo antiglobulina humana xenogénico sobre el que se ---
uniría la gamma-globulina específica contenida en el me---

1 dio. Las gamma-globulinas pueden obtenerse después fácilmente por elución posterior.

5 Aunque los ejemplos que van más adelante se refieren fundamentalmente al uso de hemocianina KLH (Key-hole limpet) como antígeno sensibilizante, ello es sólo porque se ha encontrado que es conveniente experimentalmente hacerlo, y no ha de considerarse en modo alguno como limitación de la generalidad del antígeno sensibilizante que puede emplearse. También se han usado con éxito otros antígenos, tales como bacterias de brucella, coccidioidina o histoplasmina.

10

15 El uso de los materiales inmunológicos hasta ahora descritos para transferir inmunidad por mediación de células contra antígenos específicos, es de importancia evidente en el campo de la medicina. Las moléculas inductoras pueden obtenerse, por ejemplo, de animales exentos de gérmenes inmunizados contra un antígeno, obteniendo así mediadores inmunológicos virtualmente monoespecíficos. La formación de colonias de los cultivos de células después de la inducción dará también como resultado un cultivo para la producción de gamma-globulinas monoespecíficas. La producción en masa de tales mediadores in vitro tiene muchas aplicaciones. El uso de productos de inmunodiálisis presenta una ventaja con relación a los ácidos inmunonucleicos, ya que raramente es posible obtener reacciones inmunológicas contra los productos de inmunodiálisis, y éste evita reacciones anafilácticas. Además, no hay riesgo vírico usando productos de diálisis celulares, mientras que la presencia hipotética de un genoma viral en ácidos

20

25

30

inmunonucleicos es difícil de excluir. Por consiguiente

1 - está también en el objeto de esta invención un medicamen-
to capaz de ser administrado en dosis unitarias, que com-
prenda al menos uno de los ácidos inmunonucleicos (i-RNA
ó i-DNA) y/o productos de inmunodiálisis específicos para
5 un antígeno dado, producidos por un procedimiento como se
ha descrito anteriormente. Las gamma-globulinas humanas
específicas producidas in vitro han de tener una amplia -
gama de aplicaciones y pueden usarse como sustitutos de -
las gamma-globulinas obtenidas a partir de donadores ani-
10 males o humanos y que se usan corrientemente en inmunote-
rapia pasiva o con fines de diagnóstico. Así pues, la in-
vención proporciona un medicamento capaz de ser adminis-
trado en forma de dosis unitaria, que comprende gamma-glo-
bulinas específicas producidas por el procedimiento de la
15 presente invención.

La invención se ilustra además por medio de los Ejem-
plos que siguen:

EJEMPLO 1

20 (a) Método general de inducción inicial de una línea de
células por medio de ácidos inmunonucleicos obtenidos de
un donador previamente inmunizado.

Una disolución de RNA o una disolución de DNA obteni-
da de las células linfoides de un donador previamente in-
munizado contra un antígeno específico, se trataron con -
25 DNA-asa y RNA-asa respectivamente, para asegurarse de que
no había DNA ni RNA presentes, respectivamente. Se incu-
baron 10^7 LDV/7 durante 30 a 60 minutos con 0,5 a 1,00 mg
del RNA ó DNA en disolución.

Las células se pusieron en suspensión a una concentra-
30 ción de 5×10^5 células/ml en medio RPMI 1640 complementa

1 do con 10% de suero fetal de ternero. Se dejó que se de-
sarrollase el cultivo hasta que las células alcanzaron --
una concentración de 10^6 células/ml, y después se sometie-
ron a un paso en medio de nueva aportación, lo que dismi-
5 nuyó la concentración de células a 5×10^5 células/ml. --
Las células se recolectaron cuando la producción total --
del cultivo era del orden de 10^{10} células. Después se ob-
tuvieron inmuno-RNA y productos de inmunodiálisis a par--
tir de estas células, y se extrajeron gamma-globulinas es-
10 pecíficas del medio de cultivo del tejido.

(b) Método general de inducción de una línea de células
usando producto de diálisis obtenido de células LDV/7 in-
ducidas inicialmente. Los productos de diálisis de las --
células preparadas como anteriormente se obtuvieron des--
15 pués de congelar-descongelar 10^9 células en 10 ml. de agua
destilada y posterior diálisis a través de una bolsa de --
diálisis bajo vacío.

100 ml de células LDV/7 a una concentración de 5×10^5
células/ml se incubaron con los productos de diálisis ob-
20 tenidos de 5×10^7 células inducidas como anteriormente.
Las células se subcultivaron hasta que la producción total
era de 2×10^9 células y se obtuvieron de estas últimas --
i-RNA, i-DNA y productos de inmunodiálisis.

25 La especificidad del i-RNA obtenido de las células --
de cultivo después de la inducción con i-RNA, i-DNA o pro-
ducto de inmunodiálisis para los antígenos de melanoma ma-
ligno se evaluó en un sistema de citotoxicidad con media--
ción de células. Las células objetivo eran las líneas de
células de melanoma maligno. Los índices de citotoxicidad
30 mostraron que los ácidos inmunonucleicos o los productos

1 de inmunodiálisis hacen a los linfocitos sanguíneos periféricos inactivos "naturales" específicamente citotóxicos para las células objetivo después de la incubación.

EJEMPLO 2

5 En una serie diferente de experimentos se encontró -- que la incubación de células LDV/7 ó BRI 8 con ácidos inmunonucleicos o productos de inmunodiálisis como en el -- Ejemplo 1 induce la aparición de puntos receptores de antígenos específicos sobre la superficie celular de las células linfoblastoides.

10

(a) Cuando se incubaron células LDV/7 con ácido i-nucleicos o productos de inmunodiálisis específicos para KLH -- (hemocianina Keyhole-limpet), las células LDV/7 desarrollaban posteriormente puntos receptores para este antígeno. Esto puede verse por una formación en forma de rosetón de SRBC (glóbulos rojos de oveja) que se habían recubierto previamente con KLH. Además, en estos experimentos pudo detectarse una producción de anticuerpo anti-KLH específico en el medio de cultivo.

15

20 (b) La línea de células linfoblastoides BRI 8 se indujo empleando las técnicas del Ejemplo 1, en presencia de -- i-RNA, y, en un segundo experimento, de productos de inmunodiálisis, ambos específicos para KLH. Posteriormente -- se observó la formación del rosetón como en (a).

25

EJEMPLO 3

El I-RNA usado en esta serie de experimentos se extrajo de los ganglios linfáticos y el bazo de ovejas inmunizadas con, o bien células de melanoma o células de carcinoma de colon. El inmuno-RNA de oveja se denomina en -- adelante Is-RNA. El I-RNA de una oveja inmunizada con --

30

1 Hemocianina Keyhole-Limpet (KLH) se usó como control.

5 La secuencia de la inmunización de la oveja y el método del fenol caliente para la extracción de i-RNA se han descrito en otros lugares: véase D.H. Kern, D. Fritze, C.R. Drogemuller y Y.H. Pilch. J. Nat. Cancer. Inst., 57, 97-103 (1976) y L.L. Veltman, D.H. Kern e Y. H. Pilch, -
10 Cell. Immunol. 131, 367-377 (1974), respectivamente. Las preparaciones de i-RNA se someten a evaluación de su contenido de proteína, RNA y DNA. Se determinan también los perfiles del gradiente de densidad de sacarosa del i-RNA, ya que ésto permite la estimación de cualquier actividad biológica destructora de degradación: véase Y. H. Pilch, K.P. Ramming y P. J. Deckers en H. Bush. Ed: Methods in -
15 Cancer Research, Vol 9, Nueva York, Academic Press, 1973, 192-254.

20 La actividad biológica de estos i-RNA se determina en un ensayo de microcitotoxicidad in vitro: véase RNA in the Immune response, H. Friedman, Ed. Ann. N.Y. Acad. Sci., 207 (1973). Su capacidad para convertir linfocitos sanguíneos periféricos humanos alogénicos normales en células efectoras citotóxicas se somete a ensayo después de la incubación in vitro de linfocitos con i-RNA, tras lo cual se somete de nuevo a ensayo la actividad citotóxica de los -
25 linfocitos tratados frente a células tumorales humanas -- cultivadas del mismo tipo histológico que las usadas para inmunizar la oveja donadora de Is-RNA.

La línea de células linfoblastoides LDV/7 se induce con Is-RNA como sigue:

30 1 mg de Is-RNA se disuelve en 0,5 ml. de medio RPMI 1640; esta disolución se hace 0,35 M con respecto a saca-

1 rosa. Después se ponen en suspensión 10^7 células LDV/7 -
en esta disolución y se incuban durante al menos 30 minu-
tos a 37°C con agitación continua. Al final de la incuba-
ción, se añade nuevo medio y el volumen final se ajusta a
5 20 ml., llevando así la concentración de células a 5×10^5
células/ml. Como el tiempo medio de duplicación de esta
línea celular, cuando se cultiva en condiciones estáticas,
es del orden de 24 horas, se añade cada día un volumen de
medio de nueva aportación (RPMI 1640, suplementado con 10%
10 de suero fetal de ternero) igual al volumen existente de
cultivo, hasta que el volumen total del cultivo llega a 3
litros, produciendo así alrededor de 2×10^9 células. Una
parte alícuota de 10^7 células de este cultivo se induce -
una segunda vez con el mismo Is-RNA siguiendo el mismo --
15 procedimiento. Esta parte alícuota nuevamente inducida -
sirve para la siembra de un segundo cultivo, que de nuevo
se suplementa con medio de nueva aportación y se desarro-
lla hasta que se obtiene un número deseado de células. --
Usualmente el segundo cultivo se desarrolla hasta obtener
20 4×10^9 células. Las células de los dos cultivos se reú-
nen y se almacenan congeladas a -20°C . Se extrae I-RNA -
de las células congeladas (Ic-RNA) y se determina su acti-
vidad biológica como se ha descrito antes. Usualmente se
obtienen entre 0,7 y 1,5 mg de RNA total a partir de 10^9
25 células. Todos los lotes de Ic-RNA extraídos de este modo
dieron un perfil no degradado en gradientes de densidad -
de sacarosa.

Los Ic-RNA extraídos de las células LDV/7 cultivadas
se someten a ensayo para determinar su capacidad para indu-
cir linfocitos humanos naturales para que se transformen
30

04018

1 en citotóxicos para células objetivo tumorales in vitro.
Los linfocitos humanos se aislaron de la sangre periféri-
ca de un donador sano sobre gradientes isopacos de Ficol.
Su actividad se compara con la de las preparaciones de --
5 Is-RNA inductoras. En ocho de cada diez experimentos se
comprobó que las preparaciones de Ic-RNA eran capaces de
conferir una citotoxicidad importante para las células tu-
morales objeto a linfocitos alogénicos naturales. La Ta-
bla 1 muestra los resultados de dos experimentos típicos
10 con buenos resultados.

Como células efectoras se usaron linfocitos humanos
alogénicos de la sangre periférica de un donador de sangre
sano. 5×10^7 células se incubaron con i-RNA extraído de
15 (a) células LDV/7 no inducidas (c-RNA), (b) una oveja inmu-
nizada con KLH (Is-RNAK), (c) una oveja inmunizada con cé-
lulas de carcinoma de colon humano (Is-RNAc), (d) una ove-
ja inmunizada con células de melanoma humano (Is-RNA_m), y
(e) tres lotes de células LDV/7 (Ic-RNA), tras su induc-
ción con cada uno de tres tipos diferentes de Is-RNA (k,
20 c y m). Los linfocitos incubados sin i-RNA proporciona-
ron el testigo (Cl). Cada cifra representa la media de -
seis valores. Se observaron diferencias significativas -
(P menor de 0,005) entre la actividad de los I-RNA obteni-
dos, bien de la oveja inmunizada con células tumorales, o
25 de los cultivos de LDV/7 inducidos con estos Is-RNA anti-
tumor, por un lado, y los testigos (linfocitos incubados
sin RNA, c-RNA, Is-RNA ni Ic-RNAK), por otro lado. No se
observaron diferencias significativas entre los índices --
de citotoxicidad obtenidos con preparaciones activas de -
30 Is-RNA y los Ic-RNA de células LDV/7 inducidas con estos

1 - Is-RNA. NT = no ensayado.

5 La expresión "linfocitos alogénicos" se usa aquí con referencia al paciente, donador de las células tumorales empleadas para la inmunización de las ovejas. Las células tumorales cultivadas usadas para los ensayos de citotoxicidad eran alogénicas con respecto al donador de células tumorales, y eran del mismo tipo histológico que las usadas para la inmunización de las ovejas. El mismo donador de sangre proporcionó los linfocitos efectores en todos -
10 estos experimentos.

Tabla 1

	1	2
Cl	$0 \pm 0,07$	$0 \pm 0,10$
c-RNA	$0,03 \pm 0,05$	$0,07 \pm 0,05$
15 Is-RNAK	NT	$0,12 \pm 0,02$
Ic-RNAK	NT	$0,10 \pm 0,03$
Is-RNAc	$0,50 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,09$
Ic-RNAc	$0,48 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,08$
Is-RNA _m	$0,34 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,08$
20 Ic-RNA _m	$0,34 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,05$

No obstante, hay que resaltar que estos resultados - no sugieren que la citotoxicidad observada se debe solamente a especificidades tumorales, ya que tanto las preparaciones de Is-RNA como de Ic-RNA pueden transferir reactividad inmunológica contra especificidades de HL-A, así como contra antígenos asociados a los tumores. Lo que se ve claramente es que el Ic-RNA confiere índices similares de citotoxicidad a linfocitos humanos normales que los conferidos por el Is-RNA usado para la inducción.
25

30 Hay que advertir también que las células LDV/7 son -

1 - capaces de producir Ic-RNA que lleva las mismas especifici-
cidades que el Is-RNA al menos 10 semanas después de la -
inducción inicial, y el Ic-RNA mostró la misma actividad
específica siempre que se extrajo de 3 a 10 semanas des-
5 pués de la inducción.

EJEMPLO 4

Se extrae I-RNA de los tejidos linfáticos de oveja -
inmunizada, bien con Hemocianina Keyhole-Limpet (KLH), o
con tejidos tumorales humanos (melanoma, carcinoma de co-
10 lon), o con KLH y coadyuvante completo de Freund (FCA), o
con FCS sólo. Se extrae I-RNA de oveja no inmunizada en
las mismas condiciones. Se usa un método con fenol calien-
te para la extracción de RNA. Se determina la concentra-
ción de DNA, RNA y proteínas de cada preparación y la au-
sencia de degradación significativa, determinada por aná-
15 lisis de perfiles de gradiente de densidad de sacarosa. -
Las preparaciones de I-RNA se mantienen liofilizadas has-
ta su uso.

Se usó la línea de células linfoblastoides LDV/7 pa-
20 ra estos experimentos. Las células se desarrollan en me-
dio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal
de ternero (FCS), en cultivo en suspensión, y su tiempo -
medio de duplicación, en las presentes condiciones experi-
mentales, es de alrededor de 24 horas.

25 Para la inducción, se incuban 10^7 células LDV/7 duran-
te 60 minutos en 1 ml. de medio RPMI 1640, sin FCS, que -
contiene 1 mg de I-RNA. Al final del período de incuba-
ción se añaden 19 ml. de medio con 10% de FCS, de modo --
que la concentración de células se ajusta a 5×10^5 célu-
30 las/ml. Las células se desarrollan después en condiciones

1 típicas de cultivo.

Evidencia de la formación de receptores de membrana, específicos para el antígeno dado, sobre la superficie de las células LDV/7 inducidas:

5 (a) Inmunocitoadherencia

Se mezclan hematíes de oveja (SRBC) con un volumen igual de una disolución de ácido tánico al 0,005%, y se incuban durante 10 minutos a 37°C. Después de lavarlas en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), las células se ponen en suspensión en PBS en una proporción de 1:20 en volumen/volumen. 1 ml. de esta suspensión se mezcla con 5 ml. de PBS que contiene 1 mg/ml de KLH y se incuba durante 10 minutos a 37°C para fijar el antígeno sobre las membranas de los SRBC. Después de lavar, los SRBC recubiertos con antígeno se ponen de nuevo en suspensión en 5 ml de PBS. Se mezclan células LDV/7 lavadas con los SRBC recubiertos con antígeno y se incuban durante dos horas a 37°C. Se toman muestras al final del período de incubación, se colocan entre portaobjetos de vidrio y cubreobjetos, y se cuentan bajo el microscopio. Las células LDV/7 a las que se han unido más de 3 SRBC se consideran células "formadoras de rosetones".

Las células LDV/7, inducidas con I-RNA de oveja inmunizada con KLH, muestran un número significativamente mayor de células "formadoras de rosetones", cuando se incuban con KLH, que las células inducidas con RNA obtenido de animales no inmunizados, o con I-RNA de oveja inmunizada con un antígeno diferente del usado para recubrir los SRBC, por ej. FCA. El número medio de células formadoras de rosetones observado para un cultivo inducido es del or

1 den de 10%.

(b) Inmunofluorescencia

5 Se usa KLH marcada con isotiocianato de tetrametilrodamina, isómero G(Sigma) (RITC) para localizar los receptores de membrana de KLH por inmunofluorescencia directa. 200 microg./ml de RITC marcado con KLH se incuban con -- 6×10^5 células LDV/7 durante 30 minutos.

10 Se incuban también células en las mismas condiciones con KLH no marcada. Esta última se revela sobre la superficie de las células por medio de antisuero anti-KLH de conejo conjugado para isotiocianato de fluoresceína, isómero I (Sigma) (FITC). Se preparan sueros anti-KLH de conejo por medio de tres inyecciones bisemanales de 1 mg de KLH.

15 Se usa un antisuero de cabra anti-conejo marcado con FITC en la técnica indirecta para desarrollar anticuerpos anti-KLH de conejo no marcados fijados sobre la superficie de células LDV/7 incubadas con KLH.

20 Las células LDV/7 inducidas con i-RNA-KLH de oveja e incubadas con KLH muestran coloración fluorescente en el ensayo directo (usando KLH marcada) o indirecto (usando antisuero anti-KLH de conejo fluorescente o antisuero anti-KLH de conejo no marcado y un antisuero de cabra anti-conejo fluorescente). (Véase Tabla 2). Las células inducidas con i-RNA-FCA de oveja o i-RNA de oveja no inmunizada no muestran receptores de antígeno para KLH sobre su superficie, permaneciendo por lo tanto no fluorescentes. El bloqueo inmunológico específico (IB) confirmó la especificidad de la coloración. Se encontró que aproximadamente 30 el 30% de las células de los cultivos inducidos eran fluo

1 - rescentes.

TABLA 2

5

10

15

20

25

30

04018

	Células no inducidas	Células inducidas con i-RNA-KLH
Coloración directa con KLH marcada con FITC	-	+
I.B.: preincubación con KLH seguida de KLH marcada con FITC	-	-
Coloración indirecta: incubación con KLH seguida de antisuero anti-KLH de conejo marcado con FITC	-	++
I.B.: preincubación con KLH, después antisuero anti-KLH de conejo no marcado, seguido de antisuero anti-KLH de conejo marcado con FITC	-	-
Coloración indirecta: incubación con KLH, seguida de antisuero anti-KLH de conejo, y seguida de un antisuero de gamma-globulina anticonejo de cabra marcado con FITC	-	+++

1 El grado de coloración fluorescente se expresa como tanto por ciento de células fluorescentes como sigue:

+ más de 30%

++ más de 40%

5 +++ más de 50%

FITC: Isotiocianato de fluoresceína, Isómero I

RITC: Isotiocianato de tetrametilrodamina, Isómero G.

(c) Peroxidasa-diaminobencidina (PO-DAB) (véase R.C. --- Graham y M. J. Karnovsky: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new - technique. J. Histochem. Cytochem., 14, 291, 1966.

10 10^6 células LDV/7, incubadas con 1 ml de una disolución de KLH (200 microg./ml), después de un completo lavado, se fijan con fijante de Karnovsky durante 5 minutos, y después se exponen a un antisuero anti-KLH de conejo. - Después de un nuevo lavado completo, las células se exponen a un antisuero anticonejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Instituto Pasteur). La preparación se expone a una disolución saturada de base libre de 3,3'-diaminobencidina (DAB) (Sigma) durante 15 minutos a 20°C, y después se fija en fijativo de Karnovsky durante 30 minutos. El nódulo se deshidrata después y se embebe en Epon 812. Se obtienen cortes finos usando un microtomo Reichert, y se examinan sin coloración o con contrastes de plomo en un microscopio electrónico Philips 300.

15
20
25
30 Las células inducidas con i-RNA-KLH, incubadas con - KLH, y coloreadas con PO-DAB, muestran, en el microscopio electrónico, una línea oscura gruesa sobre la superficie exterior de sus membranas, correspondiente a la reacción

1 con peroxidasa, y mostrando con ello la fijación de KLH --
sobre los receptores de antígeno de las membranas. Se en-
contró que alrededor del 30% de las células KLH-I-RNA da-
ban reacción positiva con peroxidasa.

5 Se deduce por lo tanto que éste i-RNA (procedente de
ovejas) transfiere información a células linfoblastoides
xenógenas en cultivo. Estas últimas son capaces de ex-
presar de nuevo esta información. Los resultados muestran
que el I-RNA xenógeno no se incorpora sólo pasivamente y
10 se reproduce por las células LDV/7 linfoblastoides, sino
que se hace funcional porque su información se expresa --
tan pronto como se incorpora en la célula portadora. Na-
turalmente, esto induce cambios superficiales en la célu-
la, la aparición de receptores de antígenos específicos,
15 y además la secreción de gamma-globulinas específicas, --
aunque este último punto no se demuestra en este Ejemplo.

EJEMPLO 5

Se extrae I-RNA del modo usual de tejidos linfoides
de conejos inmunizados con bacterias brucella. Las prepa-
20 raciones de i-RNA así obtenidas se usaron para inducir la
línea de células LDV/7 usando las técnicas descritas en --
el Ejemplo 3. El líquido que sobrenadaba obtenido del me-
dio de cultivo se analizó para determinar la presencia de
gamma-globulinas específicas para las bacterias brucella,
25 que se usaron como antígeno sensibilizante original. La
presencia de tales gamma-globulinas específicas se indicó
por técnicas de inmunofluorescencia, y por aglutinación --
cuando se reunieron muestras del líquido que sobrenadaba
con bacterias brucella.

30

04018

1

EJEMPLO 6

Siguiendo el método del Ejemplo 5, se produjeron --
gamma-globulinas específicas para la coccidioidina usando
la línea de células LDV/7. El i-RNA usado para inducir --
5 el sistema de cultivo de las células se obtuvo de los te-
jidos linfoides de conejos que se habían sensibilizado --
previamente a la coccidioidina.

10

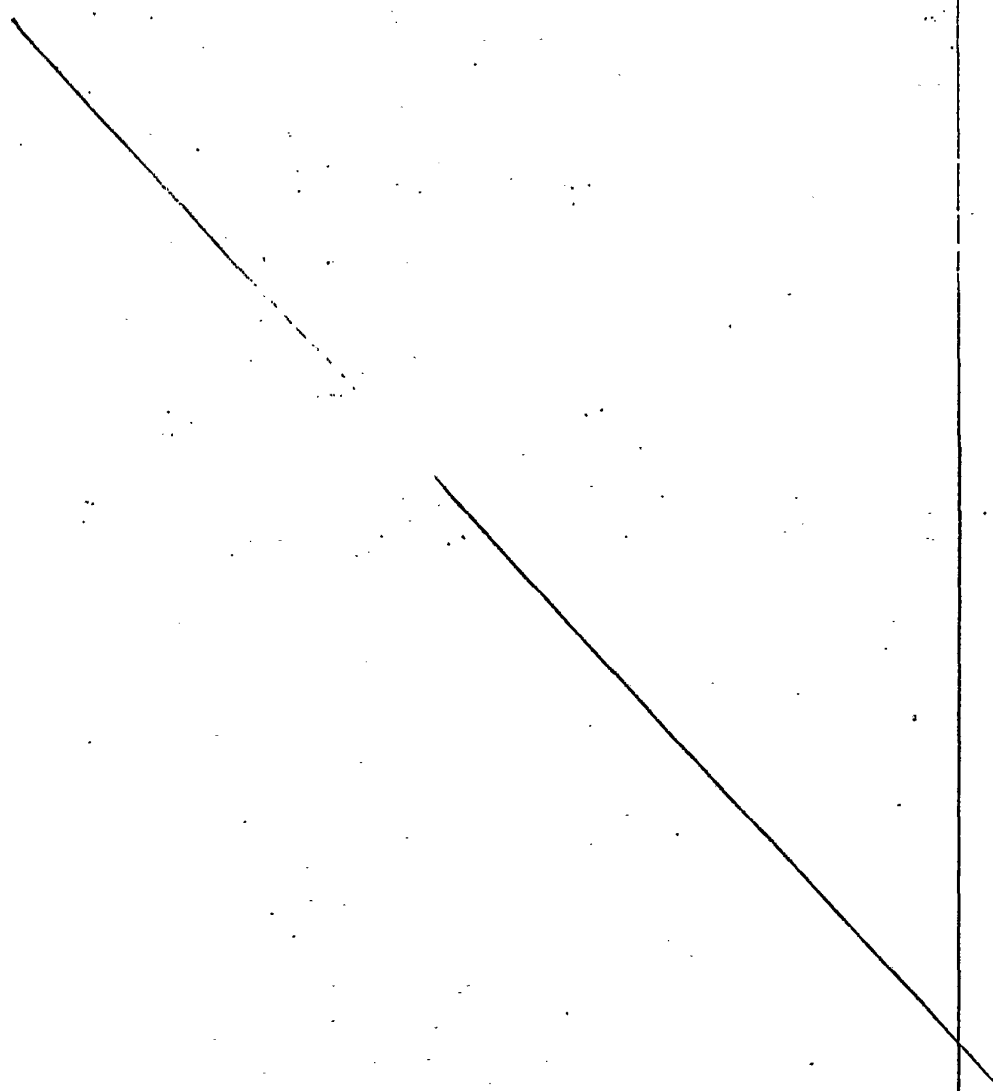
15

20

25

30

04018



REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Un procedimiento de producción de gamma-globulinas y ácidos inmunonucleicos (tal como se han definido anteriormente), ambos específicos para un antígeno dado, caracterizado por (i) cultivar una línea de células inducibles, in vitro, en presencia de ácidos inmunonucleicos específicos o productos de inmunodiálisis específicos, obtenidos, o bien de células linfoides donadoras humanas o -- animales sensibilizadas para dicho antígeno específico, o a partir de células de una línea de células previamente inducidas sensibilizadas para dicho antígeno específico, o en presencia de la fase líquida de un cultivo de una línea de células previamente inducidas sensibilizadas para dicho antígeno específico, y (ii) extraer gamma-globulinas de la fase líquida del cultivo de células así inducidas, y/o extraer los ácidos inmunonucleicos de las células así cultivadas.

2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado por emplear, en la operación (i), i-RNA obtenido de células linfoides de un donador animal sensibili-

04018

1 zado.

3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª, --
caracterizado porque el donador animal sensibilizado es --
una oveja, un conejo, un cobaya o una rata.

5 4ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, ca
racterizado por emplear, en la operación (i), i-RNA ó --
i-DNA obtenidos de células de una célula LDV/7 previamen-
te inducida.

10 5ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivin
dicaciones anteriores, caracterizado porque, en la opera-
ción (i), las células linfoides donadoras o la línea de --
células previamente inducidas están sensibilizadas para --
hemocianina Keyhole-limpet, coccidioidina, histoplasmina,
bacterias brucella o células de melanoma o carcinoma de --
15 colon.

20 6ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivin
dicaciones anteriores, caracterizado por cultivar, en la
operación (i), una línea de células de origen linfoide,
que, antes de la inducción, produce gamma-globulinas es-
pontáneamente.

7ª.- Un procedimiento según la reivindicación 6ª, ca
racterizado por emplear una línea de células de mieloma.

25 8ª.- Un procedimiento según la reivindicación 6ª, ca
racterizado por emplear la línea de células BRI 8 ó BEC
11.

9ª.- Un procedimiento según la reivindicación 6ª, ca
racterizado por emplear la línea de células LDV/7.

30 10ª.- Un procedimiento de producción de productos de
inmunodiálisis (como se ha definido anteriormente) especí
ficos para un antígeno dado; caracterizado por (i) culti-

1 var in vitro una línea de células inducibles, en presencia
de ácidos inmunonucleicos específicos obtenidos, bien a -
partir de células linfoides donadoras humanas o animales
sensibilizadas para dicho antígeno específico, o de célu-
5 las de una línea de células previamente inducidas sensibi-
lizadas para dicho antígeno específico, o en presencia de
la fase líquida de un cultivo de una línea de células pre-
viamente inducidas sensibilizadas para dicho antígeno es-
pecífico, y (ii) obtener el producto de inmunodiálisis de
10 las células así cultivadas.

11ª.- Un procedimiento según la reivindicación 10ª,
caracterizado por emplear, en la operación (i), i-RNA ob-
tenido de las células linfoides de un donador animal sen-
sibilizado.

15 12ª.- Un procedimiento según la reivindicación 11ª,
caracterizado porque el donador animal sensibilizado es -
una oveja, un conejo, un cobaya o una rata.

20 13ª.- Un procedimiento según la reivindicación 10ª,
caracterizado por emplear, en la operación (i), i-RNA ó -
i-DNA obtenidos de células de una célula LDV/7 previamen-
te inducida.

25 14ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivin-
dicaciones 10ª a 13ª, caracterizado porque, en la opera--
ción (i), las células linfoides donadoras o la línea de -
células previamente inducidas están sensibilizadas a la -
hemocianina Keyhole-limpet, coccidioina, histoplasmina, -
bacteria brucella o células de melanoma o carcinoma de co
lon.

30 15ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivin-
dicaciones 10ª a 14ª, caracterizado por cultivar, en la -

1 -operación (i), una línea de células de origen linfoide, -
que, antes de la inducción, produce espontáneamente gamma-
-globulinas.

5 16ª.- Un procedimiento según la reivindicación 15ª,-
caracterizado por emplear la línea de células BRI 8 ó BEC
11.

17ª.- Un procedimiento según la reivindicación 15ª,
caracterizado por emplear la línea de células LDV/7.

10 18ª.- "UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE GAMMA-GLOBU
LINAS Y ACIDOS INMUNONUCLEICOS".

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

Esta Memoria consta de treinta y dos hojas escritas
a máquina por una sola cara.

15

Madrid, 12.ENE.1978

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder,



20

25

30

04018

ARS/.