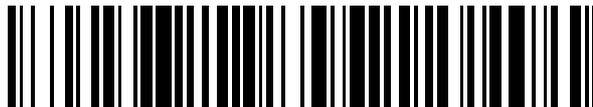


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 846**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/12** (2006.01)  
**C12Q 1/70** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02769679 .8**  
96 Fecha de presentación: **03.05.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1385540**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2004**

54 Título: **COMPOSICIÓN Y PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA DENSIDAD CELULAR EN CULTIVOS CELULARES INFECTADOS CON LENTIVIRUS.**

30 Prioridad:  
**10.05.2001 US 290096 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.12.2011**

73 Titular/es:  
**WYETH LLC  
FIVE GIRALDA FARMS  
MADISON, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:  
**THOMAS, Anne Christine y  
NG, Terry, Kaleung**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 846 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición y procedimiento para aumentar la densidad celular en cultivos celulares infectados con lentivirus.

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos cultivos celulares. En particular, la invención se refiere a nuevos cultivos celulares infectados con el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), que contienen un antibiótico adecuado para aumentar la densidad celular y potenciar el crecimiento del cultivo. La invención también se refiere a nuevos procedimientos para aumentar la densidad de los cultivos celulares usando ciertos antibióticos.

### Antecedentes de la invención

10 Los lentivirus constituyen una clase de virus que pueden conducir a una diversidad de enfermedades tanto en seres humanos como en animales. Estas enfermedades a menudo están precedidas por varios meses o incluso años de incubación. Por ejemplo, las patologías asociadas con el SIDA están causadas por los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y son el resultado de un progreso crónico de la enfermedad, algunas veces causando caquexia y muerte en el paciente varios años después de la infección.

15 Los lentivirus también se han asociado con diversas patologías en especies tales como simios y monos, así como animales domesticados tales como caballos, burros, ganado vacuno, cabras, y ovejas. Entre éstas, la anemia infecciosa equina (AIE) se ha caracterizado como la enfermedad infecciosa más importante de los caballos, existente en todo el mundo. Los lentivirus de las ovejas son patógenos relativamente comunes en la mayoría de las partes del mundo, e incluyen el virus Maedi-visna y el virus de la neumonía progresiva como dos tipos predominantes. El virus de la inmunodeficiencia bovina es una causa importante de enfermedad en el ganado vacuno.

Otros lentivirus son indicadores vitales de patología en animales tales como los gatos. El virus de la inmunodeficiencia felina, estructuralmente similar al VIH, puede causar la muerte en gatos caseros. De forma creciente, los doctores, veterinarios, e investigadores están dedicando un tiempo y recursos considerables para prevenir y tratar las enfermedades causadas por estos virus.

25 Parte de la investigación implica cultivar cultivos tisulares que contienen células, por ejemplo linfocitos, que se han infectado con VIF. Los cultivos celulares con linfocitos pueden cultivarse en matraces T, frascos rotatorios, matraces de centrifugación y biorreactores usando medios tales como medio esencial mínimo (MEM), medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI), MEM de Dulbecco (DMEM), y AIM V (Gibco/LTI, Grand Island, NY) suplementado con suero bovino hasta aproximadamente el 20% y hasta aproximadamente el 5% de albúmina sérica bovina (BSA). Los cultivos a gran escala pueden cultivarse en agitadores grandes, fermentadores, y biorreactores en presencia de agentes químicos de protección contra cizalla, espesantes, emulsionantes o compuestos tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa, y tensioactivos tales como la serie Pluronic, por ejemplo PLURONIC® F-68, fabricado por BASF Corporation of Wyandotte, Michigan.

35 En el mantenimiento de cultivos tisulares que contienen virus, los investigadores buscan destruir las bacterias dañinas dentro del cultivo de modo que las células que contienen el virus pueden crecer y propagarse. Al mismo tiempo, un objetivo concomitante es maximizar el crecimiento del cultivo celular. Para facilitar el cultivo y la destrucción de las bacterias, se ha aceptado la práctica de añadir antibióticos, habitualmente una combinación de los mismos, al cultivo celular. Por ejemplo, el documento U.S. 5.958.423 expone un cultivo celular de células renales bovinas Madin-Darby (MDBK) en el que se utiliza hasta 30 µg/ml de polimixina B y neomicina, y hasta 2,5 µg/ml de anfotericina B.

45 Lo que ahora se necesita en la técnica son nuevas composiciones de cultivo celular que contengan células infectadas con VIF. Especialmente se necesitan nuevos cultivos celulares en los que el crecimiento celular pueda maximizarse y pueda minimizarse simultáneamente la presencia de organismos dañinos tales como bacterias. También se necesitan nuevos procedimientos para cultivar cultivos celulares en los que pueda aumentarse la densidad de los mismos a través de la promoción del crecimiento tisular. Adicionalmente se necesitan nuevos aditivos que puedan optimizar la densidad de cultivos celulares posibilitando y potenciando el crecimiento de las células que componen el cultivo.

### Sumario de la invención

50 En una realización, la presente invención se refiere a un cultivo celular que comprende al menos una célula huésped infectada con VIF y una cantidad promotora del crecimiento de un antibiótico que consta esencialmente de neomicina o una sal biológicamente compatible de la misma.

55 La invención también se refiere a un cultivo celular que contiene al menos una célula huésped infectada con VIF y neomicina o una sal biológicamente compatible de la misma, de modo que la neomicina esté presente sustancialmente sin otro antibiótico en una cantidad que sea eficaz para inhibir el crecimiento bacteriano y para aumentar la densidad del cultivo celular.

También se proporciona como parte de la invención un procedimiento para aumentar la densidad de un cultivo celular en el que las células del mismo se han infectado con VIF, que implica añadir un antibiótico que consta esencialmente de neomicina o una sal biológicamente aceptable de la misma al cultivo celular.

5 La divulgación también proporciona una composición adecuada para su adición a un cultivo celular infectado con VIF. La composición contiene una cantidad potenciadora de la densidad celular de un antibiótico que consta esencialmente de neomicina o una sal biológica de la misma, junto con al menos un suplemento de cultivo celular. El suplemento de cultivo celular es deseablemente suero derivado bovino.

Las características y ventajas anteriores y otras de la invención llegarán a ser más evidentes a partir de la descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención dada a continuación.

#### 10 **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

La presente invención se refiere a cultivos celulares. Aquellos contemplados para su uso en este documento son aquellos adecuados para investigación y estudio que son capaces de albergar VIF y permitir el crecimiento del mismo. Dichos cultivos celulares incluirían por lo tanto linfocitos que pueden llegar a infectarse con uno o más lentivirus. Los cultivos celulares adecuados incluirían linfocitos felinos. Pueden preferirse linfocitos de células T para su uso en este documento, así como FetJ independiente de IL-2 y linfocitos FL6.

20 El término "lentivirus" se usa en este documento para abarcar todos los lentivirus conocidos y aún por descubrir, incluyendo, sin limitación, el virus de la anemia infecciosa equina, el virus Maedi-visna, el virus de la neumonía progresiva, el virus de la artritis-encefalitis caprina, el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la inmunodeficiencia de simios que infectan especies tales como el macaco, y monos africanos y babuinos, y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) Tipos I y II. El término "lentivirus" también incluye análogos, derivados y secuencias peptídicas de cualquiera de los anteriores. Para su uso en este documento 15 se prefiere el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF).

25 Los cultivos celulares de la invención pueden cultivarse usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células huésped tales como linfocitos pueden infectarse de forma crónica con VIF usando procedimientos aceptados, y después cultivarse en medios adecuados. Preferiblemente, los medios son medios sustancialmente líquidos. Incluso más preferiblemente, los medios se proporcionan inicialmente en forma de medios sustancialmente libres de suero. Las células huésped pueden suspenderse en los medios líquidos, por ejemplo. La densidad celular del cultivo celular cultivado puede variar de acuerdo con las células huésped particulares, los medios, y la cámara de cultivo, pero puede estar dentro del intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^4$  a aproximadamente  $1 \times 10^6$  células adecuadas por mililitro (ml) de cultivo celular (incluyendo el medio). Más preferiblemente, la densidad celular es de aproximadamente  $2 \times 10^5$  a aproximadamente  $5 \times 10^5$  células por mililitro.

30 Como parte adicional de la invención, los cultivos celulares contienen un antibiótico adecuado que es eficaz en la inhibición del crecimiento de bacterias dentro del cultivo, aumentando al mismo tiempo el crecimiento de las células y aumentando de este modo la densidad del cultivo celular. Para su uso en este documento se prefiere el antibiótico neomicina, que incluiría todas las sales biológicamente compatibles y derivados de la misma, tales como sulfato de neomicina. Por "biológicamente compatible" se entiende que la sal o derivado del mismo sustancialmente no tiene efectos biológicos adversos sobre la célula.

35 La cantidad de neomicina incluida en el cultivo celular puede variar de acuerdo con las necesidades de los especialistas en la técnica, pero típicamente se incluye en una cantidad que aumentará la densidad del cultivo celular. Habitualmente se prefiere una cantidad de neomicina dentro del intervalo de aproximadamente 20 microgramos/ml de cultivo celular a aproximadamente 60 microgramos/ml de cultivo celular (incluyendo el medio). En una realización más preferida, la cantidad de neomicina será de aproximadamente 30 microgramos/ml a aproximadamente 60 microgramos/ml.

45 Se prefiere utilizar neomicina para potenciar el crecimiento y la densidad del cultivo celular sin la inclusión de otros antibióticos tales como polimixina B y gentamicina, por ejemplo. La polimixina B puede obtenerse de la polimixina B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> que se producen por el cultivo de *Bacillus polymyxa* (Prazmowski) Migula (Fam. Bacillaceae). Ahora se ha descubierto que incluir tanto neomicina como polimixina B en el cultivo celular puede, en muchos casos, provocar un aumento significativamente menor en la densidad celular en comparación con el uso de neomicina sola.

50 Otros componentes del cultivo celular de la invención típicamente incluirían al menos un suplemento de cultivo. El suplemento de cultivo puede ser derivado bovino, tal como de suero bovino, y puede incluir suero bovino y albúmina sérica bovina (BSA). El suplemento de cultivo puede incluirse en cantidades de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10% en volumen del cultivo celular final.

55 El uso de neomicina como se describe en este documento puede aumentar la densidad celular en al menos aproximadamente el 20%, y más preferiblemente en al menos aproximadamente el 33 1/3% sobre un cultivo celular idéntico de células huésped infectadas con VIF que no contiene ningún antibiótico. La densidad celular puede evaluarse por procedimientos aceptables, incluyendo el uso de exclusión de azul de tripano en hemacitómetro.

El siguiente ejemplo se proporciona para ilustrar un aspecto preferido de la invención, pero no debe entenderse como limitante del alcance de la misma.

**Ejemplo**

5 En este ejemplo, se cultivaron células Fet-J infectadas de forma crónica con virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) en medio sin suero tal como medio DMEM:F12 modificado o medio AIM V, suplementado con 2,5 mg/ml de ALBUMAX®, que se obtiene de BSA. Las células se cultivaron en suspensión en matraces Erlenmeyer en un agitador rotatorio a 150 rpm a 37°C. Las células se sembraron en placas a una densidad celular de  $3 \times 10^5$  células viables/ml. Las densidades celulares se determinaron por exclusión de azul de tripano en hemacitómetro. La determinación de la expresión de Gp 120 se consiguió por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando anticuerpos monoclonales anti-Gp 120 de VIF. Los antibióticos evaluados para la suplementación de VIF 10 incluyeron gentamicina, neomicina y polimixina B. A los medios se les añadieron los antibióticos respectivos a una concentración de 30 microgramos/ml. Las densidades celulares se determinaron en una base de 24 horas por el procedimiento descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la TABLA 1.

**Tabla 1**

Grupo Experimental	Concentración de antibiótico (microgramos/ml)	Día 0 (células/ml)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Control	N/A	$3,0 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^8$	1,2x'
Gentamicina	30 µg/ml	$3,0 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	1,1x'
Neomicina	30 µg/ml	$3,0 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^6$	1,8x'
Polimixina B	30 µg/ml	$3,0 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$	$6,6 \times 10^5$	6,6x'
Polimixina B + Neomicina	30 µg/ml + 30 µg/ml	$3,0 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$7,7 \times 10^5$	7,8x'

15 Los resultados de la Tabla 1 muestran que las suspensiones de cultivo celular suplementadas con neomicina tenían mejor crecimiento global y un aumento en las densidades celulares. La gentamicina no tuvo efecto significativo, siendo las densidades celulares diarias sustancialmente iguales a los controles. Los cultivos suplementados con polimixina B, o neomicina junto con polimixina B realmente suprimían la densidad celular en comparación con los cultivos en los que no se utilizó antibiótico y por tanto son mucho menos densos que aquellos en los que se usó 20 neomicina por sí misma.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un cultivo celular de virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), que comprende al menos una célula huésped infectada con VIF y una cantidad promotora del crecimiento de un antibiótico que consiste esencialmente en neomicina, presente en una cantidad de 20 microgramos/ml a 60 microgramos/ml de dicho cultivo, o una sal o derivado biológicamente compatible de la misma, y en el que el antibiótico aumenta la densidad del cultivo celular en al menos aproximadamente el 20% sobre un cultivo celular de células huésped infectadas con lentivirus que no contiene nada de dicho antibiótico.
- 2.- El cultivo celular de la reivindicación 1, en el que dicha célula huésped es al menos un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en linfocitos.
- 3.- El cultivo celular de la reivindicación 2, en el que dichos linfocitos son linfocitos de células T.
- 4.- El cultivo celular de la reivindicación 3, en el que dichos linfocitos se seleccionan entre el grupo que consiste en FetJ independiente de IL-2 y linfocitos FL6.
- 5.- El cultivo celular de la reivindicación 4, en el que dicha cantidad de neomicina es eficaz para inhibir el crecimiento bacteriano en dicho cultivo celular.
- 6.- El cultivo celular de la reivindicación 5, en el que dicha neomicina está presente en una cantidad de al menos 30 microgramos/ml.
- 7.- El cultivo celular de la reivindicación 1, en el que dicho cultivo celular está presente en medio sin suero.
- 8.- El cultivo celular de la reivindicación 5, en el que las células de dicho cultivo celular se siembran en placas a una densidad dentro del intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $5 \times 10^5$  células viables/ml de cultivo celular.
- 9.- El cultivo celular de la reivindicación 10, en el que las células de dicho cultivo celular se siembran en placas a una densidad de aproximadamente  $3 \times 10^5$  células viables/ml.
- 10.- Un cultivo celular de virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos una célula huésped infectada con VIF y neomicina, en el que dicha neomicina está presente en una cantidad de 20 microgramos/ml a 60 microgramos/ml sustancialmente sin otro antibiótico en una cantidad que es eficaz para inhibir el crecimiento bacteriano y aumentar la densidad de dicho cultivo celular en al menos aproximadamente el 20% sobre un cultivo celular de células huésped infectadas con lentivirus que no contiene nada de dicho antibiótico.
- 11.- El cultivo celular de la reivindicación 10, en el que dicho cultivo celular no contienen sustancialmente nada de gentamicina o polimixina B.
- 12.- El cultivo celular de la reivindicación 11, en el que dicha neomicina está presente en dicho cultivo celular en una cantidad de al menos 30 microgramos/ml.
- 13.- El cultivo celular de la reivindicación 11, en el que dicha célula huésped es al menos un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en linfocitos.
- 14.- El cultivo celular de la reivindicación 13, en el que dicha célula huésped es un linfocito T.
- 15.- El cultivo celular de la reivindicación 14, en el que dicha célula huésped es al menos un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en FetJ independiente de IL-2 y linfocitos T FL6.
- 16.- El cultivo celular de la reivindicación 11, en el que las células de dicho cultivo celular se siembran en placas a una densidad dentro del intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $5 \times 10^5$  células viables/ml.
- 17.- El cultivo celular de la reivindicación 15, en el que las células de dicho cultivo celular se siembran en placas a una densidad de aproximadamente  $3 \times 10^5$  células viables/ml.
- 18.- Un procedimiento para aumentar la densidad de un cultivo celular de virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), en el que las células del mismo se han infectado con un VIF, que comprende añadir un antibiótico que consta esencialmente de neomicina en una cantidad de 20 microgramos/ml a 60 microgramos/ml a dicho cultivo celular.
- 19.- El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicha neomicina se añade en una cantidad que es eficaz para inhibir el crecimiento bacteriano en dicho cultivo celular.
- 20.- El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicha neomicina se añade en una cantidad de al menos 30 microgramos/ml.
- 21.- El procedimiento de la reivindicación 18, que comprende adicionalmente sembrar en placa dicho cultivo celular

## ES 2 369 846 T3

a una densidad dentro del intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $5 \times 10^5$  células viables/ml.

22.- El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dicho cultivo celular se siembra en placas a una densidad de aproximadamente  $3 \times 10^5$  células viables/ml.

5 23.- El procedimiento de la reivindicación 18, que comprende adicionalmente añadir al menos un suplemento de cultivo a dicho cultivo celular.

24.- El procedimiento de la reivindicación 23, en el que dicho suplemento de cultivo es albúmina sérica bovina (BSA).

25.- El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicha neomicina es eficaz para aumentar la densidad celular en al menos aproximadamente el 20%.

10 26.- El procedimiento de la reivindicación 25, en el que dicha neomicina es eficaz para aumentar la densidad celular en al menos aproximadamente el 33 1/3%.

27.- El procedimiento de la reivindicación 26, en el que dicha neomicina es eficaz para aumentar la densidad celular en al menos aproximadamente el 50%.

15 28.- Un procedimiento para cultivar un cultivo celular de células infectadas con virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), que comprende añadir neomicina presente en una cantidad de 20 microgramos/ml a 60 microgramos/ml de dicho cultivo, sustancialmente sin polimixina B o gentamicina a dicho cultivo.

29.- El procedimiento de la reivindicación 28, en el que dicha cantidad de neomicina es eficaz para inhibir el crecimiento bacteriano en dicho cultivo celular.

20 30.- El procedimiento de la reivindicación 28, en el que dicha cantidad de neomicina es de al menos 30 microgramos/ml de cultivo celular.

31.- El procedimiento de la reivindicación 28, que comprende adicionalmente añadir una cantidad eficaz de al menos un suplemento de cultivo celular a dicho cultivo.

32.- El procedimiento de la reivindicación 30, en el que dicho suplemento de cultivo celular es albúmina sérica bovina (BSA).

25 33.- Una composición de cultivo celular, que comprende:

a) de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $5 \times 10^5$  células viables/ml de células Fet-J infectadas de forma crónica con virus de la inmunodeficiencia felina;

30 b) un antibiótico que consiste esencialmente en neomicina presente en una cantidad de 20 microgramos/ml a 60 microgramos/ml o una sal o derivado biológicamente compatible de la misma, en la que el antibiótico aumenta la densidad del cultivo celular en al menos aproximadamente el 20% sobre un cultivo celular de células Fet-J infectadas con virus de la inmunodeficiencia felina que no contiene nada de dicho antibiótico.