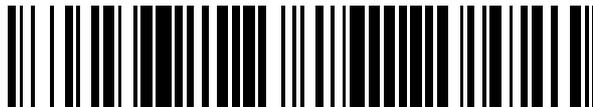


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 087**

51 Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06745904 .0**
96 Fecha de presentación: **28.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **2017333**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2009**

54 Título: **CÉLULA FELINA CAPAZ DE CULTIVARSE SIN PROTEÍNA DE ORIGEN ANIMAL, Y PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR UN VIRUS Y PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR UNA VACUNA USANDO EL MISMO.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.02.2012

73 Titular/es:
KYORITSU SEIYAKU CORPORATION
5-10, KUDANMINAMI 1-CHOME, CHIYODA-KU
TOKYO 102-0074, JP

72 Inventor/es:
MOCHIZUKI, Masami

74 Agente: **Fúster Olaguibel, Gustavo Nicolás**

ES 2 375 087 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

Célula felina capaz de cultivarse sin proteína de origen animal, y procedimiento para producir un virus y procedimiento para producir una vacuna usando el mismo

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención se refiere a una cepa de célula felina capaz de cultivarse sin proteínas de origen animal y un procedimiento para producir la misma. La presente invención también se refiere a un procedimiento para producir un virus usando la cepa celular.

TÉCNICA ANTECEDENTE

- 10 Ha pasado medio siglo o más desde la creación de una técnica de cultivo de de células animales y similar en un tubo de ensayo. Junto con el progreso de la ciencia y la tecnología se ha desarrollado significativamente una técnica de este tipo.

- 15 En general, cuando se usa directamente un animal vivo para estos experimentos, los resultados pueden entenderse fácilmente. Sin embargo, dicho examen directo de un animal vivo ha sido problemático tanto técnica como económicamente. Por lo tanto, se ha extirpado una parte del animal, y las células de la misma se han proliferado en un entorno artificial, tal como, en una placa de Petri o en un tubo de ensayo. Este procedimiento se denomina un procedimiento de cultivo tisular o un procedimiento de cultivo celular. Ya que no ha sido difícil una técnica de este tipo, se hace posible producir productos farmacéuticos, vacunas, antígenos de diagnóstico, etc., mediante este procedimiento. Sin embargo, para el cultivo de células animales *in vitro* se requiere cultivar las células casi en las mismas condiciones que en las condiciones *in vivo* originales. Por ejemplo, se aplican condiciones, tales como, un estado aséptico o un entorno de temperaturas que se ajuste a la misma temperatura que la del cuerpo vivo.

- 20 Además, incluso si las condiciones que se han mencionado anteriormente se satisfacen, se hace necesario para la división la proliferación celular y suministrar adicionalmente un "factor de crecimiento celular" como nutriente. Los ejemplos un factor de crecimiento celular de este tipo incluyen diversos tipos de hormonas, insulina, putrescina y un factor de crecimiento de fibroblastos. Sin embargo, dichos factores de crecimiento celular no se han diluido en todas las especies celulares.

- 25 Por consiguiente, se usan sueros de animales cuyo efecto puede ser inesperado específicamente y que contienen muchos componentes "desconocidos" en lugar de factores de crecimiento celular. Entre dichos sueros animales, se selecciona suero bovino debido a una gran población bobina y también debido a que puede suministrarse de forma estable. Se ha usado con frecuencia suero fetal de ternera ya que contiene sólo una pequeña cantidad de proteína toxica. En estudios científicos, hay casos en los que puede contenerse una proteína de origen bovino en un material de ensayo, aunque el ganado bovino no es una especie animal de interés. Sin embargo, el uso de una proteína de origen bovino de este tipo como un producto farmacéutico para un ser humano u otra especie animal puede causar un problema.

- 30 El primer problema está relacionado con alergias. Cuando una vacuna o fármaco que contiene suero bovino se inyecta por vía parenteral, en seres humanos o en animales no bovinos, una primera inyección puede no causar un problema en muchos casos. Sin embargo, una segunda inyección o inyecciones posteriores pueden causar un problema en relación a una reacción alérgica. Este fenómeno puede explicarse inmunológicamente. Es decir, un animal sólo reacciona ligeramente con una sustancia de alto contenido molecular (por ejemplo, una proteína que tiene un peso molecular de 10.000 daltons o más) cuando la sustancia se expone en el animal la primera vez, y por lo tanto la sustancia administrada se descompone *in vivo*. Sin embargo, una memoria en cuanto a la exposición permanece en el sistema inmune. Por consiguiente, cuando la misma sustancia (antígeno) se expone en el animal la segunda vez o posteriores, los inmunocitos que memorizan la primera exposición reaccionan directamente con la sustancia, y como resultado, se da una reacción vital que es más fuerte que la de primera exposición a corto plazo. Dependiendo de los tipos de seres humanos o animales, puede haber casos en los que puedan tener una reacción desfavorable con un antígeno que se expone desde el exterior. Una reacción de este tipo se denomina típicamente como una reacción alérgica. Una reacción alérgica de este tipo provoca fiebre o hinchazón en el sitio de inyección, y en el peor caso, los seres humanos o los animales mueren de disnea debido a la obstrucción respiratoria y colapso.

- 35 El segundo problema se refiere a la contaminación de patógenos o anticuerpos en el suero bovino contenidos en el suero bovino. Un famoso ejemplo es la contaminación con *Pestivirus*, *Retrovirus*, *Mycoplasma*, etc., de origen bovino. Recientemente, se ha convertido en problemático el príon que es un patógeno de la encefalopatía espongiiforme bobina (BSE) conocido como la enfermedad de las vacas locas.

- 40 Como se ha indicado anteriormente, aunque el uso del suero bovino puede causar la aparición de problemas, dicho suero bovino se ha usado comúnmente en todo el mundo para la producción de vacunas, particularmente para su uso en el campo veterinario dirigido a animales.

- 45 Sin embargo, actualmente se ha divulgado un intento de no usar suero bovino en el procedimiento de cultivo celular (un medio libre de suero (SFM) y un procedimiento de cultivo celular libre de suero) y la producción de una vacuna experimental para ganado bovino usando un medio libre de suero de este tipo y un procedimiento de cultivo celular libre de suero de este tipo (Makoschey y col., Serum-free produced bovine herpesvirus type 1 and bovine parainfluenza type 3 virus vaccines are efficacious and safe. Cytotechnology, 39: 139-145, 2002). En lugar del crecimiento de células en un medio de cultivo celular a partir del cual se eliminaron los componentes de suero, se describe el crecimiento de las células en un medio existente, o un medio previsto recientemente, al que se le añadieron diversas hormonas y factores de crecimiento celular en las siguientes referencias bibliográficas:

Froud, S. J. The development, benefits and disadvantages of serum-free media. Brown, F., Cartwright, T., Horaud, F., Spieser, J. M. (eds): Animal sera, animal sera derivatives and substitutes used in the manufacture of

pharmaceuticals; Viral safety and regulatory aspects. Dev. Biol. Stand., Basel, Karger, 1999, vol. 99, págs. 157-166;

Merten, O.-W. Safety issues of animal products used in serum-free media. Brown, F., Cartwright, T., Horaud, F., Spieser, J. M. (eds): Animal sera, animal sera derivatives and substitutes used in the manufacture of pharmaceuticals: Viral safety and regulatory aspects. Dev. Biol. Stand., Basel, Karger, 1999, vol. 99, págs. 167-180;

5 y
Merten, O.-W. Development of serum-free media for cell growth and production of viruses/viral vaccines - Safety issues of animal products used in serum-free media. Brown, F., Hendriksen, C, Sesardic, D., Cussler, K. (eds): Advancing science and elimination of the use of laboratory animals for development and control of vaccines and hormones. Dev. Biol. Stand., Basel, Karger, 2002, vol. 111, págs. 233-257.

10 Adicionalmente, se describe el uso de componentes de origen vegetal como aditivo del medio en las siguientes referencias bibliográficas.

Noe et al., Fed-batch strategies for mammalian cell cultures. In, Spier, R.E., Griffiths, J.B., Berthold, W. (eds): Animal Cell Technology: products of Today, prospects for tomorrow, Oxford, Butterworth-Heinemann, 1994, págs. 413-418.

15 Kazushi Shibuya y col.: Serum-free medium for animal cell culture, Traducción japonesa publicada de la publicación internacional PCT para la solicitud de patente (A), Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N° P2002-520014A (fecha de publicación: 9 de julio de 2002). Esta bibliografía describe que se cultivaron células de ovario de hámster Chino en un medio preparado añadiendo hidrolizados de proteína de semilla de soja, un extracto de levadura y opcionalmente hidrolizados de proteína de trigo a un medio preparado excepcionalmente. Al igual que los hidrolizados de proteína de soja, se describen diversos hidrolizados, tales como polipéptidos solubles obtenidos por hidrólisis parcial con una enzima digestiva.

20 Kwon, S.M. y col. Use of plant-derived protein hydrolysates for enhancing growth of *Bombyx mori* (silkworm) insect cells in suspension culture. Biotechnol. Appl. Biochem., 42: 1-7, 2005. Esta bibliografía describe que pueden usarse hidrolizados de proteína de origen vegetal (nombre comercial: HyPep 1510; Difco Co., Detroit, MI, Estados Unidos) como sustituto para el suero bovino convencional en el cultivo de células de insecto procedentes del gusano de seda, pero no describe la composición de un medio usado en el mismo.

25 Chun, B.-H. y col. Use of plant hydrolysates for varicella virus production in serum-free medium. Biotechnol. Letters 27: 243-248, 2005. Esta bibliografía describe que se cultivan células de pulmón fetal humano (MRC-5) en un medio preparado añadiendo hidrolizados de proteína de semilla de soja, etc., pero no suero bovino, a una mezcla 2:1 de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y mezcla de nutrientes (F-12 de Ham), y también que en este sistema de cultivo celular, se cultiva el virus de la varicela. Sin embargo, el medio usado en el mismo está compuesto con insulina humana recombinante, un factor de crecimiento epidérmico humano recombinante y un factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante, y contiene proteínas animales.

30 An animal protein-free medium for culturing cells (Baxter International Incorporated, Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N° P2005-532057A). Esta bibliografía describe un procedimiento de cultivo de células usando péptidos no animales obtenidos a partir de hidrolizados de semilla de soja e hidrolizados de levadura, en los que las células son células CRFK procedentes de gato. Sin embargo, no se describe la composición de un medio usado en este documento.

35 Como se ha descrito anteriormente, no se han descrito una cepa celular procedente de gato producida sin usar proteínas de origen animal, un medio usado para cultivar las mismas ni un procedimiento de multiplicación de un virus para su uso en vacunas felinas. Además, un virus que infecta a los gatos apenas se multiplicará en otra especie animal sin excepción, y por lo tanto, incluso si las células obtenidas a partir de otros animales pueden cultivarse sin proteínas de origen animal, una técnica de este tipo no puede aplicarse a las células procedentes de gato.

40 Por consiguiente, ha habido demanda de células procedentes de gato cultivadas en un medio que no contenga proteínas de origen animal, un medio libre de proteína de origen animal para cultivar las células, vacunas y reactivos de examen seguros para gatos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

45 Un aspecto de la invención se refiere a una cepa celular que se obtiene a partir de una célula fcwf-4 que es una célula obtenida a partir de un feto completo de gato y que es capaz de cultivarse sin proteínas de origen animal. Esta cepa celular es la cepa celular depositada internacionalmente FERM ABP-10594.

50 Un aspecto de referencia se refiere a un procedimiento para producir una cepa celular que comprende adaptar una célula fcwf-4 a un medio de cultivo que contiene un factor de crecimiento celular y suero, y cultivar la célula en un medio libre de proteína de origen animal que contiene una pluralidad de peptonas procedentes de semilla de soja en una mezcla 1:1 de un medio de Eagle modificado por Dulbecco y mezcla de nutrientes (F-12 de Ham), para producir una cepa celular capaz de cultivarse sin proteínas de origen animal. La peptona procedente de semilla de soja es preferiblemente una combinación de peptona de semilla de soja (Peptona procedente de semilla de soja, digerido enzimático, Catálogo N° 87972, fabricada por Fluka) y Polipeptona S (POLYPEPTON-S, Catálogo N° 391-00125, fabricada por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.).

55 Un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para cultivar un virus, que comprende infectar una cepa celular con un virus, y cultivar la cepa de celular infectada para multiplicar el virus. El medio en el cultivo de la cepa celular infectada puede ser un medio libre de proteína de origen animal que contiene una pluralidad de peptonas procedentes de semilla de soja en una mezcla 1:1 de un medio de Eagle modificado por Dulbecco y mezcla de nutrientes (F-12 de Ham). Las peptonas procedentes de semilla de soja son preferiblemente una combinación de

- peptona de semilla de soja (Peptona procedente de semilla de soja, digerido enzimático, Catálogo N° 87972, fabricada por Fluka) y Polipeptona S (POLYPEPTON-S, Catálogo N° 391-00125, fabricada por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.). Puede usarse un procedimiento de cultivo en suspensión en el cultivo de las cepas celulares infectadas. El virus puede ser un virus seleccionado entre el grupo viral que consiste en *Coronaviridae*, *Caliciviridae*, *Herpesviridae* y *Parvoviridae*. El virus puede ser un virus seleccionado entre calicivirus felino, herpesvirus-1 felino (virus de la rinotraqueítis viral felina), parvovirus felino, virus de la panleucopenia felina, parvovirus canino tipo 2, coronavirus felino, coronavirus entérico felino, virus de la peritonitis infecciosa felina, coronavirus canino, coronavirus respiratorio canino, virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo, virus de la diarrea epidémica porcina y coronavirus bovino.
- 5 Un aspecto de referencia se refiere a un procedimiento para producir un antígeno de diagnóstico que comprende el uso de un virus producido por el procedimiento que se ha descrito anteriormente.
- Un aspecto de referencia se refiere a un procedimiento para producir una vacuna, que comprende el uso de un virus producido por el método que se ha descrito anteriormente.
- 15 Un aspecto de referencia se refiere a un procedimiento de ensayo de diagnóstico que comprende el uso de un virus o un antígeno viral producido por el procedimiento que se ha descrito anteriormente.
- Un aspecto de referencia se refiere a un medio libre de proteína de origen animal que comprende varias peptonas procedentes de semilla de soja en una mezcla 1:1 de un medio de Eagle modificado por Dulbecco y mezcla de nutrientes (F-12 de Ham). Las peptonas procedentes de semilla de soja son preferiblemente una combinación de peptona de semilla de soja (Peptona procedente de semilla de soja, digerido enzimático, Catálogo N° 87972, fabricada por Fluka) y Polipeptona S (POLYPEPTON-S, Catálogo N° 391-00125, fabricada por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.).
- 20 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la cepa celular obtenida a partir de una célula de fcwf-4 como se ha definido anteriormente, se cultiva sin proteínas de origen animal, a fin de que cuando un virus producido usando la cepa celular se use como una vacuna y reactivo de examen, pueda proporcionarse una vacuna y un reactivo de examen seguros.
- 25 De acuerdo con un aspecto de la invención, un virus puede multiplicarse usando un medio comercial económico, para que cuando un virus producido usando el medio se use como una vacuna y un reactivo de examen, pueda proporcionarse una vacuna y un reactivo de examen económicos.
- 30 De acuerdo con un aspecto de la invención, el medio no contiene proteínas de origen animal, para que cuando las células infectadas con el virus se cultiven en este medio, pueda proporcionarse una vacuna y un reactivo de examen seguros.
- En esta memoria descriptiva, las expresiones "no contiene proteínas de origen animal" y "libre de proteína de origen animal" se refieren a que no se contienen componentes de proteínas de origen animal que pueden causar particularmente alergias. Las proteínas que pueden causar alergia incluyen, por ejemplo, suero de origen animal, y su porción, es decir, albúmina de suero, proteínas animales, tales como, factores de crecimiento celular, y una amplia diversidad de aditivos de origen animal (Bacto peptona, caldo triptosa fosfato, etc.).
- 35
- BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**
- La Figura 1 es una fotografía de las células fcwf-SF de la 30ª generación tomada el 4º día del cultivo (día después del reemplazo del medio 3 días después de que se iniciara el cultivo).
- 40 La Figura 2 muestra una curva de crecimiento de las células fcwf-SF de la 34ª-generación subcultivadas en un medio DFSP.
- La Figura 3 muestra las curvas de crecimiento del herpes virus-1 felino, cepa C7301, en células madre, (es decir, células fcwf-4) cultivadas en MEM al 7,5% (medio MEM de Eagle suplementado con suero fetal bovino al 7,5%) y en las células fcwf-SF cultivadas en un medio DFSP.
- 45 La Figura 4 muestra las curvas de crecimiento de la cepa F9 de calicivirus felino en células madre (es decir, células fcwf-4) cultivadas en MEM al 7,5% y en células fcwf-SF cultivadas en un medio DFSP.
- La Figura 5 es una fotografía que muestra el CPE mostrado que acompaña al crecimiento de la cepa Yayoi del virus de la peritonitis infecciosa felina (coronavirus felino de tipo 1) en las células fcwf-SF.
- 50 La Figura 6 es una fotografía que muestra el CPE mostrado que acompaña al crecimiento de la cepa M91-267 del virus de la peritonitis infecciosa felina (coronavirus felino de tipo 2) en las células fcwf-SF. Este CPE es un CPE citolítico similar al del coronavirus felino de tipo 1, y la formación de células gigantes multinucleares no fue significativa.
- La Figura 7 es una fotografía que muestra el CPE mostrado que acompaña al crecimiento de la cepa M91-267 del virus de la peritonitis infecciosa felina (coronavirus felino de tipo 2) en las células fcwf-4. Este CPE se caracteriza por la formación de células gigantes multinucleares.
- 55 La Figura 8 muestra curvas de crecimiento de la cepa M91-267 del virus de la peritonitis infecciosa felina en células madre (es decir, células fcwf-4) cultivadas en MEM al 7,5% y en células fcwf-SF cultivadas en un medio DFSP.
- La Figura 9 muestra las curvas de crecimiento de la cepa TU-1 del virus de la panleucopenia felina en células madre (es decir, células fcwf-4) cultivadas en MEM al 7,5% y en células fcwf-SF en un medio DFSP.

MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCION

- 5 Para el desarrollo de vacunas seguras y eficaces que puedan usarse en gatos, se seleccionó una célula fcwf-4 que es una célula procedente de un feto completo felino que tenía un espectro de infección del virus más amplio. La célula fcwf-4 es una célula "macrófaga" procedente de un feto felino que es una célula creada en 1979 por Niels C. Pedersen del Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad de California (Pedersen, N.C., J.F. Boyle y K. Floyd. 1981. Infection studies in kittens, using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. Am. J. Vet. Res. 42: 353-367). La célula fcwf-4 se ha registrado en la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo) por el mismo creador (Nº CRL-2787).
- 10 En un medio basal comercial libre de proteína obtenida de animal (por ejemplo, MEM de Eagle, medio RPMI 1640, medio 5A de McCoy, medio L-15 de Leiovitz, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y mezcla de nutrientes (F-12 de Ham)), las células fcwf-4 no crecen a menos que al medio se le añada suero bovino. Por consiguiente, las células fcwf-4 necesitan adaptarse y subcultivarse en serie.
- 15 Para la adaptación de las células fcwf-4, en primer lugar, las células pueden cultivarse en un medio que contiene suero fetal bovino mientras la concentración de suero fetal bovino se reduce gradualmente. El medio que puede usarse, pero sin limitación, un medio disponible en el mercado "VP-SFM" (Catálogo Nº 11681-020, fabricado por Invitrogen) que contiene 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante. La concentración de suero fetal bovino puede cambiarse del 0,25% al 0,1% y adicionalmente al 0,05%.
- 20 Después, las células pueden adaptarse a un medio preparado añadiendo peptona procedente de semilla de soja a un medio libre de suero. El medio libre de suero que puede usarse incluye, pero sin limitación, un medio mixto constituido por un medio DMEM (Catálogo Nº 11885-084, fabricado por Invitrogen) y mezcla de nutrientes (F-12 de Ham, Catálogo Nº 11765-054, fabricado por Invitrogen). Los ejemplos de la peptona procedente de semilla de soja incluyen, pero sin limitación, peptona de semilla de soja (peptona de soja, digerido enzimático, Catálogo Nº 87972, fabricado por Fluka). Cuando se usa un medio mixto (medio DF) constituido por un medio DMEM y un medio F-12 de Ham, al que se le añadió peptona de semilla de soja, la relación en peso de mezcla de los dos medios es preferiblemente de 3:1 a 1:3, más preferible 1:1. La concentración final de peptona de semilla de soja en el medio mixto es preferiblemente 250 µg/ml a 3.000 µg/ml, más preferiblemente aproximadamente 750 µg/ml.
- 25 Después, las células se adaptan a un medio (medio DFSP) preparado añadiendo varios tipos de peptonas procedentes de semilla de soja a una mezcla de un medio de Eagle modificado por Dulbecco (medio DMEM) y mezcla de nutrientes (F-12 de Ham), ambos de los cuales son medios libres de suero. La relación en peso de mezcla del medio DMEM y F-12 de Ham es preferiblemente de 3:1 a 1:3. Se usan varios tipos de peptonas procedentes de semilla de soja. Los ejemplos de las peptonas procedentes de semilla de soja incluyen, pero sin limitación, peptona de semilla de soja (peptona de soja, digerido enzimático, Catálogo Nº 87972, fabricada por Fluka), Polipeptona S (POLYPEPTON-S, Catálogo Nº 391-00125, fabricada por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.), Peptone Hy-Soy (nombre comercial, Producto Nº P6463-250G, fabricado por Sigma), Phytone (fabricado por BBL) y Soytone (fabricado por Difco). Entre los que se han mencionado anteriormente, es preferible una combinación de peptona de semilla de soja y polipeptona S. La cantidad total de peptonas de semilla de soja añadida es preferiblemente de 250 µg/ml a 3.000 µg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1.500 µg/ml, en base al medio.
- 30 El medio puede contener aditivos, tales como antibióticos siempre que no contengan proteínas de origen animal.
- 35 La composición del medio DFSP incluye, pero sin limitación, lo que se indica a continuación:
(Un ejemplo de preparación del medio DFSP)
- 40 1) Se prepara un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Catálogo Nº 11885, fabricado por Invitrogen).
- 45 2) Se prepara una mezcla de nutrientes F-12 (F-12 de Ham, Catálogo Nº 11765, fabricado por Invitrogen).
- 3) Se prepara una mezcla de cantidades iguales de DMEM y F-12 de Ham.
- 50 4) Se disuelven 15 g de peptona de semilla de soja (peptona procedente de semilla de soja, digerido enzimático, Catálogo Nº 87972, fabricada por Fluka) en 1.000 ml de agua destilada esterilizada, se filtra a través de un filtro 220 nm y el filtrado resultante se añade al medio del punto 3) anterior, en una cantidad de 5 ml por 100 ml del medio (concentración final: 750 µg/ml).
- 55 5) Se disuelven 15 g Polipeptona S de peptona de semilla de soja (POLYPEPTON-S, Catálogo Nº 391-00125, fabricada por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd. y vendida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en 1.000 ml de agua destilada esterilizada, se filtra a través de un filtro 220 nm y el filtrado resultante se añade al medio del punto 3) anterior, en una cantidad de 5 ml por 100 ml del medio (concentración final: 750 µg/ml).
- 6) Cuando no hay L-glutamina en el medio DMEM y F-12 de Ham, se añade L-glutamina a una concentración de 300 mg/l (concentración final: 300 µg/ml).
- 7) Como antibióticos, al medio se le añaden penicilina G potásica, sulfato de estreptomicina y anfotericina B a concentraciones de 100 U/ml, 100 µg/ml y 2,5 µg/ml, respectivamente (todas estas concentraciones son la concentración final).
- 60 Las células felinas capaces de cultivarse sin proteínas de origen animal pueden obtenerse de la siguiente manera. En primer lugar, se subcultivan células fcwf-4 en un medio VP-SFM que contiene suero fetal bovino a una

- concentración del 0,25% hasta que el número de pases alcanza 5, después las células se subcultivan adicionalmente en un medio VP-SFM que contiene suero fetal bovino a una concentración del 0,1% hasta que el número de pases alcanza 5, y después las células se subcultivan en un medio VP-SFM que contiene suero fetal bovino a una concentración del 0,05% hasta que el número de pases alcanza 9. Después, las células se subcultivan en un medio DF que contiene 750 µg/ml de peptona de semilla de soja y una mezcla de medio DMEM y medio F-12 de Ham en la proporción de 1:1, hasta que el número de pases alcanza 21. Después, las células se subcultivan en un medio DFSP que contiene 750 µg/ml de peptona de semilla de soja (Peptona procedente de semilla de soja) y 750 µg/ml de Polipeptona S y una mezcla de medio DMEM y medio F-12 de Ham en la proporción de 1:1, por lo que puede obtenerse una cepa celular recién inducida que se ha adaptado al medio DFSP. Estas células se subcultivan adicionalmente hasta que el número de pases alcanza 25. El Solicitante ha depositado internacionalmente la célula resultante, denominada cepa fcwf-SF, con el N° de acceso FERM ABP-10594 desde el 31 de marzo de 2006, con el Depositario del Organismo Internacional de Patentes (IPOD), Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (AIST), Higashi 1-1-1, Tsukuba City, Ibaraki Pref., Japón.
- La cepa celular fcwf-SF se infecta con un virus que es sensible a la cepa celular fcwf-4, y la cepa celular infectada de esta manera puede cultivarse y multiplicarse para producir el virus. El medio usado en el cultivo del virus es preferiblemente un medio que no contiene proteínas de origen animal, más preferiblemente el medio DFSP que se ha mencionado anteriormente.
- El recipiente de cultivo usado para el cultivo celular puede ser un recipiente de plástico o un recipiente de vidrio. Los ejemplos del recipiente del cultivo incluyen un recipiente no vítreo, por ejemplo un recipiente de plástico, tal como un matraz en T de 25 cm² o una placa de Petri con un diámetro de 6 cm y el recipiente regenerable correspondiente hecho de vidrio. Particularmente, es preferible un recipiente de cultivo de plástico desechable en el que puedan obtenerse fácilmente unas condiciones de cultivo uniformes.
- Pueden usarse procedimientos conocidos en el cultivo de la cepa celular infectada. Los ejemplos de dichos ejemplos conocidos incluyen un procedimiento de cultivo monocapa y un procedimiento de cultivo en suspensión.
- Por ejemplo, el procedimiento de cultivo monocapa comprende infectar las células que se han cultivado en monocapa en la superficie interna de un recipiente con un virus de interés y después someter las células infectadas a un cultivo estacional o un cultivo en rotación, con el fin de preparar el virus en el sobrenadante de cultivo. Como recipiente, puede usarse un recipiente de placas de cultivo o un matraz rotativo, por ejemplo. Los ejemplos específicos de un recipiente de este tipo incluyen una placa de Petri y un matraz en T. El material de un recipiente de este tipo es preferiblemente un material no vítreo, más preferiblemente un plástico.
- Un ejemplo del procedimiento de cultivo en suspensión es un procedimiento de microvehículo que usa perlas microtransportadoras. El procedimiento de microvehículo incluye, por ejemplo, permitir la proliferación de las células en forma de una monocapa sobre las superficies de las perlas microtransportadoras en un bioreactor (tanque de cultivo), y después infectar las células proliferadas en las perlas microtransportadoras con virus, seguido del cultivo de las células en agitación, preparando de esta manera los virus de interés en la solución de cultivo. Los ejemplos de materiales de dichas perlas microtransportadoras incluyen cerámica, dextrano, vidrio, silicio, plástico y poliácilamida. Los ejemplos de perlas disponibles en el mercado pueden incluir Cytodex (nombre comercial) 1 fabricado por Amersham Bioscience.
- El virus que es sensible a células fcwf-4 incluye, pero sin limitación, virus que infectan a muchos gatos (*Felis catus*) y animales de la familia de los gatos, incluyendo no sólo el virus de la panleucopenia felina, que es un virus de *Parvoviridae*, herpes virus-1 felino (también denominado virus de la rinotraqueitis viral felina) que es un virus de *Herpesviridae*, y calicivirus felino que es un virus de *Caliciviridae*, sino también una amplia diversidad de virus de *Coronaviridae*. Las células fcwf-4 también son sensibles a coronavirus particularmente que pertenecen a los coronavirus de grupo 1, tales como, coronavirus entérico felino, virus de peritonitis infecciosa felina, coronavirus canina, virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo, virus de la diarrea epidémica porcina y coronavirus de grupo 2, tales como, coronavirus bovino.
- Un virus producido mediante el procedimiento de la presente invención puede recuperarse y purificarse para su uso como una vacuna o una sustancia antigénica de diagnóstico. Para la recuperación y purificación del virus, pueden usarse procedimientos conocidos. Por ejemplo, las células se disuelven por congelación y descongelación, y después la solución descongelada resultante se centrifuga para eliminar las células o los desechos celulares disueltos, y el sobrenadante puede recuperarse en forma de una estirpe viral.
- Cuando se produce una vacuna a partir del virus anterior, la vacuna producida puede ser una vacuna inactivada o una vacuna viva. Cuando se produce una vacuna inactivada, el virus recuperado y purificado puede inactivarse con formalina o similar, y al virus inactivado se le puede añadir un adyuvante. Por otro lado, cuando se produce una vacuna viva, puede producirse un virus atenuado, y éste después puede recuperarse y purificarse. Después de esto, si es necesario, al virus resultante se le puede añadir un adyuvante. El contenido viral de una vacuna debe ser de un nivel suficiente para dotar a un gato, al que se le va a administrar la vacuna, de la inmunidad que es necesaria para la inhibición de la infección con el virus como una diana. En general, un nivel viral de este tipo está entre $1 \times 10^{3,5}$ de TCID₅₀/ml y $1 \times 10^{5,0}$ de TCID₅₀/ml, o más. Un ejemplo del adyuvante usado en este documento es un adyuvante capaz de inducir inmunidad protectora sistémica o inmunidad protectora local a un gato al que se le va a administrar la vacuna.
- Para la producción de un reactivo de diagnóstico para infecciones o para un procedimiento de examen de diagnóstico usando el mismo, se usa el virus inactivado como se ha indicado anteriormente se usa en forma de un antígeno, o se fija un antígeno aislado a partir del virus sobre un soporte, tal como una placa de ELISA o una membrana de nitrocelulosa, preparando de esta manera el reactivo de diagnóstico. El reactivo de diagnóstico se une a un anticuerpo existente en el suero de un gato, seguido de la reacción con un anticuerpo secundario que tiene peroxidasa de rábano rústico o fosfatasa alcalina unida al mismo, y después se somete a una reacción conocida,

tal como reacción a color para permitir la visualización del mismo. Por lo tanto, puede determinarse o confirmarse la presencia o ausencia de un anticuerpo en un gato infectado con diversos tipos de virus, concretamente, la presencia o ausencia de la infección.

5 Cuando las células se van a criopreservar, puede usarse un medio preparado añadiendo dimetilsulfóxido (DMSO) al medio DFSP en la presente invención. El DMSO está disponible en Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Catálogo N° 043-07216). La concentración de DMSO es preferiblemente del 7,5% al 20%, más preferiblemente del 10%, en el medio DFSP.

10 En lo sucesivo en este documento, la presente invención se describirá en más detalle por referencia en los Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de la presente invención. El término "%" usado en la presente memoria descriptiva se refiere al "%" en peso" al menos que se indique otra cosa.

Ejemplo 1. Creación de la cepa fcwf-SF usando un medio DFSP

15 En una primera etapa de adaptación, se subcultivaron células fcwf-4 en un medio disponible en el mercado que contenía suero fetal bovino, aunque la concentración de suero fetal bovino se redujo gradualmente. Es decir, las células se subcultivaron en un medio preparado añadiendo suero fetal bovino al 0,25% a un medio "VP-SFM" disponible en el mercado (Catálogo N° 11681-020, fabricado por Invitrogen) que contenía 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante durante 5 generaciones, después las células se subcultivaron en un medio VP-SFM que contenía suero fetal bovino a una concentración del 0,25% durante 5 generaciones, y a una concentración del 0,05% durante 9 generaciones. Cuando el medio VP-SFM se preparó completamente libre de suero, las células no pudieron subcultivarse en el medio.

20 Las células fcwf-4 usadas en este ejemplo son las usadas en los 90 por el presente inventor en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria, Departamento de Medicina Veterinaria, Facultad de Agricultura, Universidad de Kagoshima, y el presente inventor obtuvo las células fcwf-4 del profesor Hiroyuki Koyama, del Laboratorio de Enfermedades Veterinarias Infecciosas, Universidad de Kitasato, que adquirió las células con el permiso del profesor Niels C. Pedersen, del Laboratorio de Enfermedades Veterinarias Infecciosas, Universidad de California, Estados Unidos. Después de esto, las células fcwf-4 se transfirieron al Laboratorio de Microbiología Clínica, Kyoritsu Seiyaku Corp. En el Laboratorio de Microbiología Clínica como titular final, desde abril de 1995, las células se han cultivado en un medio (MEM al 7,5%) producido añadiendo suero fetal bovino al 7,5%, caldo triptosa fosfato al 10% y L-glutamina (0,292 g/l), y con el fin de evitar la contaminación de las bacterias añadiendo también penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (de 0,25 a 0,5 µg/ml), a un medio basal MEM de Eagle (medio MEM de Eagle "Nissui" (1), fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.).

30 Cuando las células madre (células fcwf-4), y las células fcwf-SF obtenidas a partir de las mismas y adaptadas a un medio libre de suero, se subcultivaron en este ejemplo, las superficies celulares se lavaron dos veces con una solución de tripsina al 0,25% + EDTA al 0,02% (ácido etilendiaminetetraacético), y después las células se dejaron en un incubadora a 37 °C, para que las células se dispersaran. La tripsina usada era DIFCO TRIPSIN 250 procedente de páncreas de cerdo (Difco Co. Ltd.). La tripsina anterior se disolvió en PBS esterilizado y después se filtró a través de un filtro 220 nm para su esterilización.

35 Después, las células fcwf-4 que se habían adaptado al medio VP-SFM que contenía suero fetal bovino al 0,05% se usaron en la adaptación a un medio disponible en el mercado. Es decir, las células fcwf-4 se subcultivaron hasta que el número de pases alcanzó 21 en un medio preparado añadiendo peptona de semilla de soja (peptona procedente de semilla de soja, digerido enzimático, Catálogo N° 87972, fabricada por Fluka) a una mezcla de medio DMEM (Catálogo N° 11885-084, fabricado por Invitrogen) y una mezcla de nutrientes (F-12 de Ham, Catálogo N° 11765-054, fabricado por Invitrogen) (medio DF). La proporción en peso del medio DMEM y F-12 de Ham era 1:1. La concentración final de peptona de semilla de soja en el medio fue 750 µg/ml.

45 Aunque las células se subcultivaron hasta que el número de pases alcanzó 21, las células se trataron básicamente en las mismas condiciones de subcultivo que las de las células madre. Es decir, las células originales se subcultivaron en cantidades que eran 3 ó 4 veces las cantidades iniciales en intervalos de aproximadamente 4 ó 5 días. Como se observó a menudo en el proceso de la adaptación celular, el crecimiento celular se retrasó en el tiempo. Por lo tanto, durante dicho retraso, el medio se intercambiaba con un medio recién hecho una o dos veces, o el factor de expansión se redujo a 2 ó 3 veces, para no interrumpir el crecimiento celular.

50 El crecimiento de las células fcwf-4 pudo no promoverse lo suficiente cuando se usó sólo MEM de Eagle, medio RPMI 1640, medio 5A de McCoy, medio L-15 de Leiovitz, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o mezcla de nutrientes (F-12 de Ham), y por lo tanto el crecimiento de las células terminó cuando el número de pases alcanzó 2 ó 3.

55 Incluso cuando la proporción en peso del medio DMEM y F-12 de Ham cambió en el intervalo de 1:3 a 3:1 las células fcwf-4 crecieron de una forma similar.

60 Después, las células fcwf-4 que se habían adaptado al medio DF se subcultivaron hasta que el número de pases alcanzó 9 en un medio (medio DFSP) preparado añadiendo polipeptona S (POLYPEPTON-S, Catálogo N° 391-00125, fabricada por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.) al medio DF. La polipeptona S es un polvo producido degradando enzimáticamente semillas de soja desgrasadas, y después purificando el producto y secándolo. La polipeptona S se añadió a una concentración final de 750 µg/ml al medio. La composición del medio DFSP usado en este documento se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Un Ejemplo de Composición del Medio DFSP

- 1) Un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Catálogo N° 11885, fabricado por Invitrogen).
- 2) Mezcla de nutrientes F-12 (F-12 de Ham, Catálogo N° 11765, fabricado por Invitrogen).
- 3) Se prepara una mezcla de cantidades iguales de DMEM y F-12 de Ham.
- 4) Se disuelven 15 g de peptona de semilla de soja (peptona procedente de semilla de soja, digerido enzimático, Catálogo N° 87972, fabricada por Fluka) en 1.000 ml de agua destilada esterilizada, se filtra a través de un filtro 220 nm y el filtrado resultante se añade al medio del punto 3) anterior, en una cantidad de 5 ml por 100 ml del medio (concentración final: 750 µg/ml).
- 5) Se disuelven 15 g Polipeptona S de peptona de semilla de soja (POLYPEPTON-S, Catálogo N° 391-00125, fabricada por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd. y vendida por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en 1.000 ml de agua destilada esterilizada, se filtra a través de un filtro 220 nm y el filtrado resultante se añade al medio del punto 3) anterior, en una cantidad de 5 ml por 100 ml del medio (concentración final: 750 µg/ml).
- 6) Cuando no hay L-glutamina en el medio DMEM y F-12 de Ham, se añade L-glutamina a una concentración de 300 mg/l (concentración final: 300 µg/ml).
- 7) Como antibióticos, al medio se le añaden penicilina G potásica, sulfato de estreptomicina y anfotericina B a concentraciones de 100 U/ml, 100 µg/ml y 2,5 µg/ml, respectivamente (todas estas concentraciones son la concentración final).

5 Cuando las células anteriores se subcultivaron en el medio DFSP hasta que el número de pases alcanzó 9 (o en un estado libre de suero, el número de pases alcanzó 30 en total), esto confirmó que las células se adaptaron claramente al medio anterior, y que el crecimiento celular podía estabilizarse. Es decir, el tiempo requerido para la formación de capas celulares y los intervalos de los pases se volvieron constantes en los últimos pases, y las células se subcultivaron en cantidades que fueron 3 ó 4 veces la cantidad inicial a los intervalos de 5 a 7 días. Dos o tres días después del cultivo, el medio se intercambió una vez con uno recién preparado, y cuando las células se cultivaron en el mismo durante 2 a 3 días, las células pudieron subcultivarse después de esto. En este intervalo de tiempo, las células se habían adaptado al medio DFSP (es decir, un medio libre de suero), y la cepa celular recién inducida de esta manera de denominó "cepa fcwf-SF".

10 Las células de 31ª generación se usaron para examinar sus características. La Figura 1 muestra una fotografía de una capa celular tomada el 4º día del cultivo de las células fcwf-SF de 30ª generación (día después del reemplazo del medio 3 días después del cultivo). La fotografía se tomó en un microscopio invertido, aunque las células no se fijaron ni se tiñeron. En comparación con las células madre cultivadas en el medio MEM al 7,5% al que se le había añadido suero fetal bovino, las células fcwf-SF, como se registraron en la ATCC, tenían una característica más cercana a una característica morfológica ("fusiformes o de estrella") de las células originales.

15 La Figura 2 muestra una curva de crecimiento de las células fcwf-SF de 34ª generación. Una suspensión celular a una densidad de $4,5 \times 10^5$ células/ml se sometió a un cultivo estacional en un matraz en T de 25 cm² en un sistema abierto, y el número de células se midió cada 24 horas. Como se muestra en la Figura 2, el número de células fcwf-SF se elevó aproximadamente 4 veces después de 6 días.

20 A continuación, se muestran otras características de las células fcwf-SF y el sistema de cultivo.

En este ejemplo, se usó un recipiente de cultivo de plástico desechable en el que podían obtenerse fácilmente condiciones de cultivo uniformes.

25 Aunque el cultivo puede realizarse tanto en un sistema cerrado como en un sistema abierto (en una incubadora de CO₂ al 5%), el cultivo en el medio DF se realizó en un sistema cerrado, mientras que en el medio DFSP se realizó en un sistema abierto en el que el pH del medio puede controlarse fácilmente para recoger datos.

Las células no crecieron en el medio DFSP del que se había eliminado la peptona de semilla de soja.

Incluso cuando las cantidades de los 2 tipos de peptonas procedentes de semilla de soja en el medio DFSP se hicieron dos veces (1,5 mg/ml) respectivamente, no cambio la potencia de proliferación celular.

30 Las células no crecieron lo suficiente cuando se usó el medio RPMI 1640 al que se le habían añadido los 2 tipos de peptonas procedentes de semilla de soja en lugar del medio mixto de DMEM y F-12 de Ham.

No se observaron cambios particularmente incluso cuando se añadieron adicionalmente hidrolizados de semilla de soja (P6463 Peptone Hy-Soy T, Sigma-Aldrich) o extracto de malta (Extracto de Malta Bacto (marca comercial), Catálogo N° 218630, Becton, Dickinson and Company) al medio DFSP.

35 No hubo un buen efecto sobre el crecimiento o forma de las células, incluso cuando se añadieron adicionalmente un extracto de levadura (Extracto de Levadura Bacto (marca comercial), Catálogo N° 212750, Becton, Dickinson and Company) y un extracto de trigo (Hidrolizado de proteína de gluten de trigo HyPep 4601 (nombre comercial), Sigma-Aldrich) al medio de DFSP. Dicha adicción pareció por el contrario afectar más bien negativamente a la velocidad de crecimiento y morfología de las células.

40 El Solicitante ha depositado internacionalmente las células de la cepa fcwf-SF (las células que se obtuvieron por cultivo continuo hasta que el número de pases alcanzó 46 (es decir, el número de pases en el medio DF y el medio

DFSP fueron 21 y 25, respectivamente)) con el N° de acceso FERM ABP-10594 desde el 31 de marzo de 2006, con el Depositario del Organismo de Patentes Internacional (IPOD), Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (AIST), Higashi 1-1-1, Tsukuba City, Ibaraki Pref., Japón.

Ejemplo 2. Criopreservación de las células fcwf-SF

5 Se preparó un medio usado en la congelación celular añadiendo DMSO al 10% (Catálogo N° 043-07216, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a un medio DFSP. Las células fcwf-SF se suspendieron a una densidad de más de 10^6 células/ml en el medio preparado. Después, la suspensión resultante se dispensó en viales de criopreservación a un volumen de 1,8 ml por vial. Cada vial se colocó en un congelador celular simple "BICELL (nombre comercial)" (Nihon Freezer Co., Ltd.) que se había enfriado en un frigorífico, y después el vial se congeló en un congelador a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ durante una noche. Después de esto, las células congeladas se transfirieron a nitrógeno líquido (fase líquida) en el que las células pudieron crioconservarse.

10 48 horas después, para confirmar un estado de criopreservación, las células congeladas se retiraron del nitrógeno líquido de acuerdo con procedimientos de rutina, y después las células se descongelaron inmediatamente en agua caliente a aproximadamente $40\text{ }^\circ\text{C}$. Después de esto, las células descongeladas se diluyeron y se suspendieron en 10 ml de medio DFSP, y después las células recuperaron mediante centrifugación a velocidad lenta. Se suspendió de nuevo un sedimento celular en 7,5 ml de medio DFSP, y después la suspensión se colocó en un matraz en T de 25 cm^2 . El matraz se cultivó a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

15 El día 3 del cultivo, se formó una capa celular. El día 5, las células se subcultivaron en un nuevo medio que tenía un volumen 4 veces el volumen del medio anterior. Tres días después del subcultivo, las células subcultivadas de esta manera también formaron una capa celular. No se encontraron efectos adversos de este procedimiento de congelación en cuanto que las células se observaron al menos en un microscopio. Después, el subcultivo puede realizarse como en el caso de las células no congeladas. A partir de dichos resultados, se confirmó que podía usarse de forma eficaz un medio DFSP con DMSO al 10% añadido en la congelación de las células fcwf-SF de la presente invención.

25 Ejemplo 3. Producción de estirpe viral de siembra libre de suero

Los virus que actualmente constituyen las vacunas núcleo usadas para gatos domésticos en todo el mundo son tres tipos de virus, es decir, herpes virus-1 felino, calicivirus felino y virus de la panleucopenia felina. Existe además una vacuna contra el virus de la peritonitis infecciosa felina que es un coronavirus felino que infecta a un gato causando una peritonitis infecciosa felina mortal. Hasta la fecha, dichas estirpes virales se han multiplicado en un sistema de cultivo celular, tal como MEM de Eagle al que se le ha añadido suero fetal bovino o caldo triptosa fosfato. Por lo tanto, para cultivar virus en un medio libre de suero como un sistema de cultivo celular, deben eliminarse las proteínas animales, tales como un ingrediente de suero bovino. Por lo tanto, se produjo una estirpe viral de siembra libre de suero de la siguiente manera. La Tabla 2 muestra los nombres de las cepas de los virus usados en la actualidad, entre las especies de virus que se han mencionado anteriormente, y las titulaciones de virus de las estirpes virales de siembra producidos usando dichas cepas virales.

Tabla 2. Virus y Titulaciones de Infectividad de Estirpes Virales de Siembra

Virus	Nombre de la cepa	Titulación de la Infectividad (TCID ₅₀ /0,1 ml)	
		Medio MEM al 7,5%	Medio DFSP
Herpesvirus-1 felino	C7301	$10^{5,0}$	$10^{7,5}$
Calicivirus felino	F9	$10^{6,0}$	$10^{8,7}$
Virus de la panleucopenia felina	TU-1	$10^{5,7}$ (256)*	$10^{4,5}$ (32)*
Virus de la peritonitis infecciosa felina (tipo 2)	M91-267	$10^{7,5}$	$10^{4,5}$

*: La titulación de hemaglutinación se muestra entre paréntesis.

Con respecto a las estirpes virales iniciales del herpesvirus-1 felino, calicivirus felino y virus de la peritonitis infecciosa felina, las células fcwf-4 como las células madre después de la inoculación con los virus se cultivaron en un medio al que se le había añadido suero fetal bovino al 2% y caldo triptosa fosfato al 10%, para promover la multiplicación de los virus. Por lo tanto, ya que había suero bovino al 2% y caldo triptosa fosfato al 10% en el sobrenadante de cultivo, se hizo el siguiente intento de eliminar la influencia de dichos ingredientes. Se inoculó una estirpe viral en células fcwf-SF que se habían cultivado en un matraz de sistema cerrado y habían formado una capa celular, después y los virus se adsorbieron en el mismo durante una hora. Después de esto, el virus no adsorbido se eliminó por aspiración, y después las superficies celulares se lavaron dos veces con un medio DFSP. Después de esto, al mismo se le añadió un medio DFSP, y después se sometió a cultivo estacional en una incubadora a $37\text{ }^\circ\text{C}$, con el fin de promover la multiplicación de los virus. Con respecto al virus de la panleucopenia felina, el virus se inoculó en las células cuando las células se suspendieron en el medio. La estirpe viral inicial contenía suero fetal bovino al 7,5%, y por lo tanto la influencia del suero fetal bovino en la estirpe viral inicial era mayor que en otras estirpes virales. Por lo tanto, cuando las células fcwf-SF se suspendieron en el medio DFSP, a la suspensión se le añadió una estirpe viral en una cantidad de aproximadamente el 5% de la solución de cultivo, y después la solución mixta se sometió a cultivo estacional en una incubadora a $37\text{ }^\circ\text{C}$. Veinticuatro horas después de la adhesión de las

5 células a la pared, la solución de cultivo se eliminó por aspiración, y las superficies celulares se lavaron una vez con un medio DFSP. Después de esto, se añadió un nuevo medio DFSP a la incubadora para promover la multiplicación del virus. Varios de siete días después, el cultivo en un matraz se congeló una vez y se descongeló. La solución congelada se sometió a centrifugación a velocidad lenta para eliminar las células y los desechos celulares. El sobrenadante se definió como una estirpe viral de 2ª generación. Esta operación se repitió dos veces en total, y el sobrenadante de cultivo de 3ª generación obtenido se definió como una estirpe viral libre de suero, se vertió en un congelador a -80 °C y se conservó.

10 Con fines comparativos, se prepararon estirpe virales y se almacenaron de la misma manera que anteriormente excepto que se usó un medio MEM que contenía suero fetal bovino al 7,5% en lugar del medio DFSP, y se usaron células fcwf-4 en lugar de las células fcwf-SF.

15 Las titulaciones del virus obtenidas para cada virus se muestran en la Tabla 2. Con respecto a las titulaciones de infectividad de las especies de virus producidas en las células fcwf-SF cultivadas en el medio DFSP, las titulaciones de infectividad del virus de la panleucopenia felina y el virus de la peritonitis infecciosa felina también eran similares a las de los virus replicados en las células fcwf-4 como células madre, y particularmente las estirpe virales del herpesvirus-1 felino y el calicivirus felino producidas en las células fcwf-SF poseían titulaciones de infectividad que eran de 300 a 5.000 veces superiores que las de los virus en las células madre de fcwf-4.

Ejemplo 4. Herpesvirus-1 felino

20 1) Las células fcwf-4 usadas como células madre en un medio MEM al 7,5% (Ejemplo Comparativo) y las células fcwf-SF en un medio DFSP (Ejemplo) se cultivaron respectivamente en un matraz en T de 25 cm² en una incubadora de CO₂ al 5%. Cinco días después del inicio del cultivo, se formó una capa. En este momento, se contó el número de células.

25 2) Se diluyó una cepa C7301 del herpesvirus-1 felino, de las estirpe virales como se muestra en la Tabla 2, y después se inoculó en los dos tipos anteriores de células, de tal forma que los dos tipos de células puedan tener la misma m.d.i. (multiplicidad de infección; la relación del número de partículas virales infecciosas y un número conocido de células cultivadas), que fue 0,01.

3) Después de que el virus se adsorbiera a 37 °C durante 1 hora, los virus no adsorbidos se eliminaron por aspiración.

Después de esto, al matraz se le añadió MEM al 7,5% o un medio DFSP seguido de cultivo estacional.

30 4) Posteriormente, después de la inoculación en intervalos de 24 horas, el cultivo contenido en el matraz se criopreservó en un congelador a -80 °C el 1^{er}, 2^o, 3^{er}, 4^o y 6^o día.

5) Antes de la medición de las titulaciones de infectividad del virus, el matraz congelado se descongeló a temperatura ambiente, y después se usó un sobrenadante obtenido eliminando los componentes celulares por centrifugación a 2.500 rpm durante 10 minutos en la medición de una titulación de infectividad.

35 6) Una titulación de infectividad de este tipo se midió mediante un procedimiento de micro-titulación usando una microplaca de 96 pocillos. Es decir, la estirpe de los virus que se ha obtenido en el punto 5) anterior se diluyó 10 veces con medio MEM al 7,5% por dilución en serie, y se añadieron 100 µl de cada dilución a 4 pocillos. Después de esto, se añadieron 100 µl más de una suspensión celular a cada pocillo, y la mezcla obtenida se mezcló ligeramente seguida de cultivo estacional en una incubadora de CO₂ al 5% a 37 °C.

40 7) Al igual que una suspensión celular de este tipo, las células fcwf-4 se suspendieron a una densidad de 1 x 10⁵ células/ml en medio MEM al 7,5%.

8) Siete días después de la inoculación del virus, el criterio de referencia de una valoración de la infectividad se calculó en base a la presencia o ausencia de un efecto citopático (CPE) causado por el virus.

45 La Figura 3 muestra las curvas de crecimiento de las cepas C7301 del herpesvirus-1 felino en las células fcwf-4 al igual que las células madre cultivadas en MEM al 7,5% y en las células fcwf-SF cultivadas en el medio de la presente invención que no contenían proteínas de origen animal. Desde el día después de la inoculación del virus, se inició la producción del virus tanto en las células madre de fcwf-4 como las células fcwf-SF, y después de esto, el número de virus aumentó. En todos los intervalos de tiempo, las células fcwf-SF mostraron titulaciones de infectividad del virus que eran de 25 a 100 veces mayores que las de las células fcwf-4.

Ejemplo 5. Calicivirus felino

50 La titulación de la infectividad se examinó de la misma manera que en el Ejemplo 4 con la excepción de que:

1) la cepa viral usada fue una cepa F9 de calicivirus felino.

55 Los resultados se muestran en la Figura 4. En ambas células cultivadas, el virus se multiplicó casi de la misma manera, para mostrar una excelente titulación de la infectividad similar a la del procedimiento de cultivo viral anterior usando suero bovino. Específicamente, el tiempo requerido para alcanzar el pico de multiplicación del virus fue 1 día más tarde en las células fcwf-SF, pero la titulación viral fue ligeramente mayor (10^{0,4}) mayor.

Ejemplo 6. Virus de la peritonitis infecciosa felina

Se aplicó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 4 en este documento con las dos excepciones siguientes:

1) La cepa viral usada en la preparación de una curva de crecimiento viral era una cepa M91-267 del virus de la peritonitis infecciosa felina que es coronavirus felino de tipo 2;

5 2) Inmediatamente después de la inoculación del virus, las células experimentaron un efecto citopático para separarse de una pared de matraz, y de esta manera el cultivo contenido en un matraz se criopreservó en un congelador a -80 °C el 1^{er}, 2^o, 3^o y 4^o días después de la inoculación, y

3) También se usó la cepa Yayoi del virus de la peritonitis infecciosa felina, es decir, coronavirus felino de tipo 1 en el examen de la sensibilidad del virus de las células fcwf-SF.

10 La Figura 5 muestra el CPE mostrado que acompaña al crecimiento de la cepa Yayoi del virus de la peritonitis infecciosa felina (es decir, coronavirus felino de tipo 1) en las células fcwf-SF, y la Figura 6 muestra el CPE mostrado que acompaña al crecimiento de la cepa M91-267 del virus de la peritonitis infecciosa felina (es decir, coronavirus felino de tipo 2) en las células fcwf-SF.

15 El coronavirus felino de tipo 1 se caracteriza porque le resulta difícil crecer en un cultivo celular, pero la cepa Yayoi se multiplicó para mostrar el CPE en las células fcwf-SF cultivadas en un medio DFSP, como se muestra en la Figura 5. Aunque el grado de multiplicación no se expresó numéricamente, el grado era casi el mismo que en las células fcwf-4 como células madre.

20 Por otro lado, es bien conocido que la potencia de proliferación del coronavirus felino de tipo 2 generalmente también es buena en las células fcwf-4, y como se muestra en la Figura 6, este virus creció con CPE incluso también en células fcwf-SF. Sin embargo, el CPE en un cultivo de células fcwf-4 se caracteriza por la formación de células gigantes multinucleares (Figura 7), mientras que el CPE en un cultivo de células fcwf-SF es un CPE citolítico similar al del coronavirus felino de tipo 1, y la formación de células gigantes multinucleares no fue evidente.

25 La Figura 8 muestra las curvas de crecimiento de la cepa M91-267 del virus de la peritonitis infecciosa felina (coronavirus felino de tipo 2) en las células madre (es decir, células fcwf-4) y en las células fcwf-SF recientemente inventadas cultivadas en el medio DFSP libre de proteínas de origen animal en la invención. En ambos casos, la titulación del virus alcanzó un pico dos días después de la inoculación y después disminuyó. En el cultivo de células fcwf-SF, se mostró una replicación viral suficiente.

Ejemplo 7. Virus de la panleucopenia felina

Se aplicó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 4 en este documento con las 4 excepciones siguientes:

30 1. La cepa viral usada era una cepa TU-1 del virus de la panleucopenia felina;
2. Cuando las células se suspendieron en un medio, se realizó la inoculación viral antes de que se iniciara el cultivo estacional;

35 3. Después de esto, las células se sometieron a un cultivo estacional en una incubadora a 37 °C, y 24 horas después de la adhesión de las células a la pared, la solución de cultivo se eliminó por aspiración, la superficies celulares se lavaron una vez con el nuevo medio, y a las células se les añadió otra vez un nuevo medio para reducir la influencia del virus restante, cuyo intervalo de tiempo se estimó el día 0; y

40 4. Se determinó una titulación de infectividad mediante el procedimiento de microtitulación de acuerdo con la presencia de una hemaglutinina generada en un sobrenadante contenido en cada pocillo. Es decir, se recogieron de cada pocillo 50 µl de sobrenadante y después se transfirieron a una microplaca que se había preparado por separado para la reacción de hemaglutinación. Después de esto, a cada pocillo se le añadió una cantidad igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 6,8 y una cantidad igual de una suspensión celular de sangre rhesus. La suspensión celular de sangre rhesus se preparó suspendiendo eritrocitos sanguíneos al 0,75% en el mismo tipo de PBS. La mezcla obtenida se agitó completamente, después se dejó a 4 °C, y la titulación de infectividad se calculó en base a la presencia o ausencia de hemaglutinación.

45 Los resultados se muestran en la Figura 9. Se muestra una excelente fase de crecimiento de forma similar por la cepa TU-1 del virus de la panleucopenia felina no sólo en las células madre (es decir, células fcwf-4) sino también en las células fcwf-SF cultivadas en el medio DFSP libre de proteínas de origen animal.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

50 Las células fcwf-SF de la presente invención no requieren suero fetal bovino u otros aditivos de proteínas de origen natural, y crecen en un medio DFSP preparado mezclando solamente un medio basal fácilmente disponible, económico y existente (medio de Eagle modificado por Dulbecco) y Mezcla de Nutrientes (F-12 de Ham)) con un producto descompuesto (peptona de semilla de soja) de proteína de origen vegetal. Cuando también es necesaria la eliminación del producto después de proteínas de origen vegetal, puede reemplazarse un medio de cultivo para células inoculadas con un virus por un medio que no contenga el mismo. Los virus vacuna o antígenos de proteínas virales usados en diversas pruebas pueden producirse de esta manera de forma económica y segura.

55 Particularmente, los gatitos todavía conservan anticuerpos transferidos por la reina, y por lo tanto, deben inocularse con frecuencia con vacunas en un corto periodo de tiempo para conferirles suficiente inmunización sobre ellos. Por ejemplo, pueden mencionarse las siguientes circunstancias. Se produce una inoculación preventiva inicial contra virus núcleo felinos, es decir, herpesvirus-1 felino, calicivirus felino y el virus de la panleucopenia felina, así como una inoculación preventiva anual de gatos con alto riesgo de infección. La seguridad de las vacunas no puede garantizarse a menos que se evite en la medida de lo posible la contaminación con componentes proteicos distintos del componente de la vacuna. Además, la contaminación de las vacunas y productos farmacéuticos con un patógeno desconocido para la "enfermedad de las vacas locas" atribuible a un prión que ha sido problemática en los

60

últimos años, es un problema extremadamente expectante de resolución. Particularmente, los gatos son muy sensibles al prión de la enfermedad de las vacas locas. El establecimiento de una cepa celular fcwf-SF por el medio de cultivo DFSP libre de proteínas de origen animal de la presente invención proporciona un medio extremadamente útil en el desarrollo y la producción de productos farmacéuticos que usan estas células cultivadas.

5

REIVINDICACIONES

1. Una cepa celular depositada con el N° de Acceso FERM ABP-10594.
2. Un procedimiento para producir un virus, que comprende:
infectar la cepa celular de la reivindicación 1 con un virus, y
- 5 cultivar la cepa celular infectada para multiplicar el virus.
3. El procedimiento para producir un virus de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el medio en el cultivo de la cepa celular infectada es un medio libre de proteína de origen animal que contiene una pluralidad de peptonas procedentes de semilla de soja en una mezcla 1:1 de un medio de Eagle modificado por Dulbecco y mezcla de nutrientes (F-12 de Ham).
- 10 4. El procedimiento para producir un virus de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en el que se usa un procedimiento de cultivo en suspensión en el cultivo de la cepa celular infectada.
5. El procedimiento para producir un virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el virus se selecciona entre el grupo viral que constituido por *Coronaviridae*, *Caliciviridae*, *Herpesviridae* y *Parvoviridae*.
- 15 6. El procedimiento para producir un virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el virus se selecciona entre calicivirus felino, coronavirus entérico felino, herpesvirus-1 felino, parvovirus felino, parvovirus canino tipo 2, coronavirus felino, virus de la peritonitis infecciosa felina, coronavirus canino, coronavirus respiratorio canino, virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo, virus de la diarrea epidémica porcina y coronavirus bovino.

FIG. 1

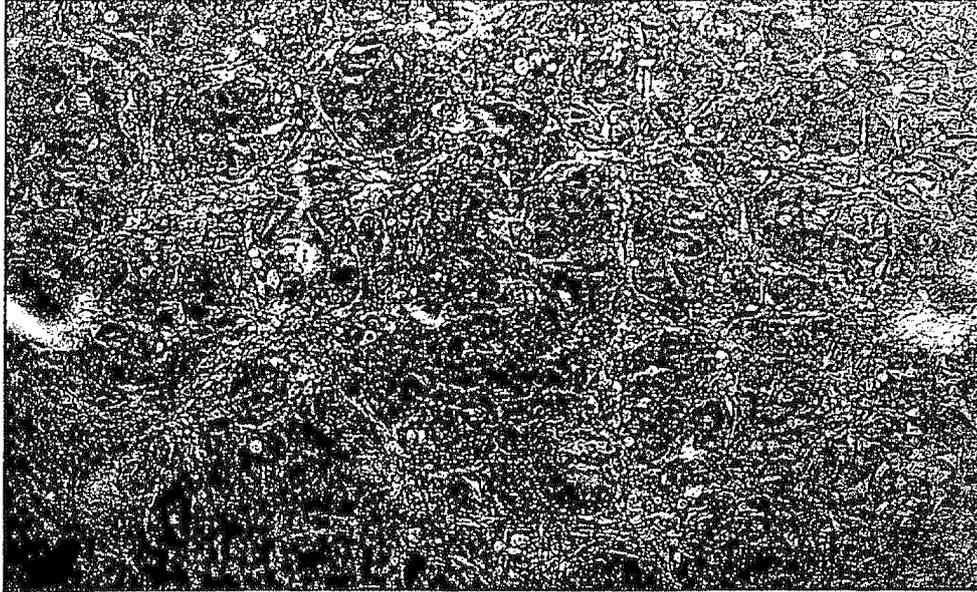


FIG. 2

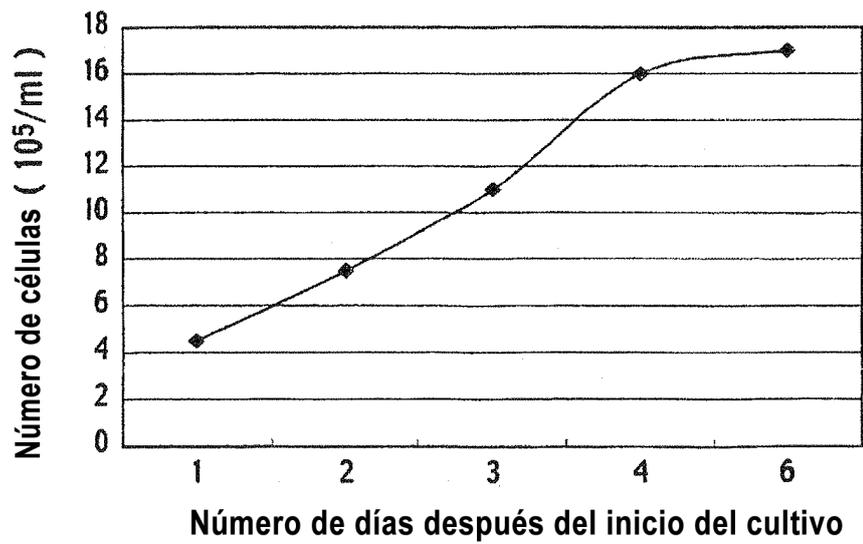


FIG. 3

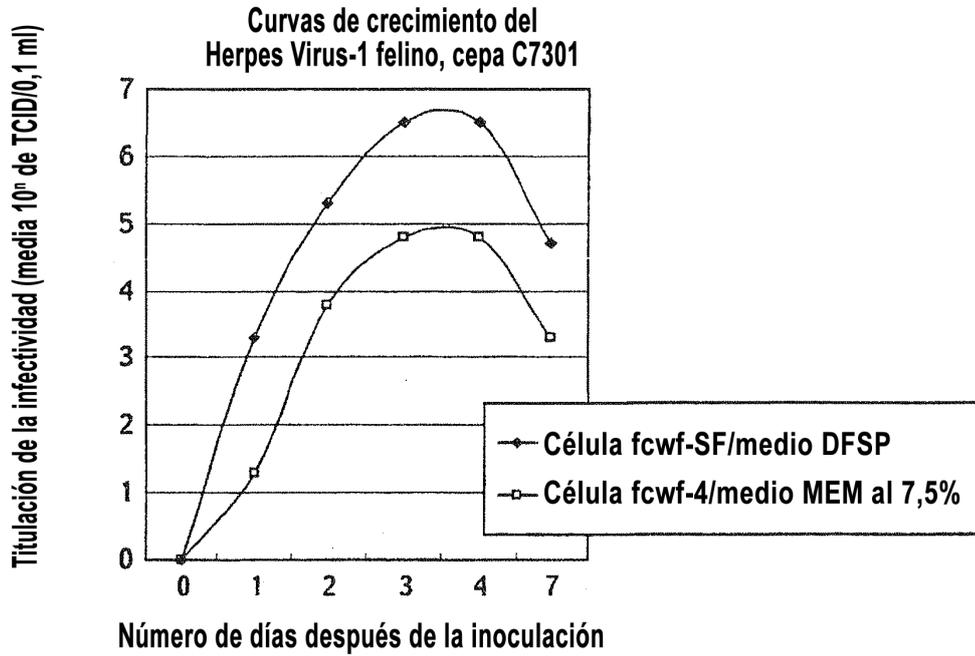


FIG. 4

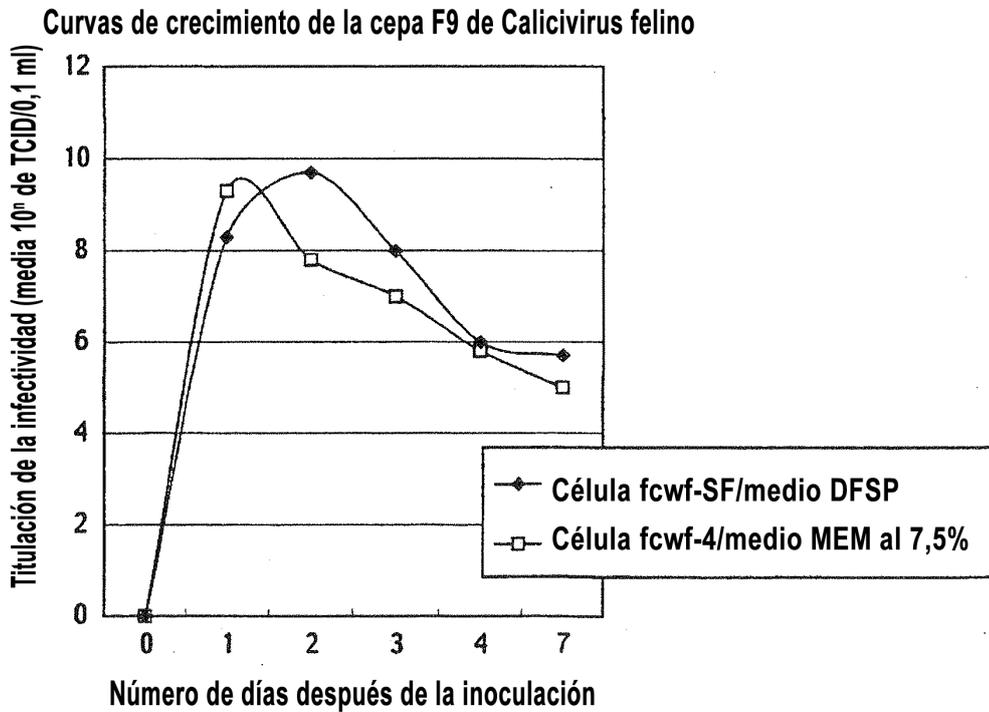


FIG. 5

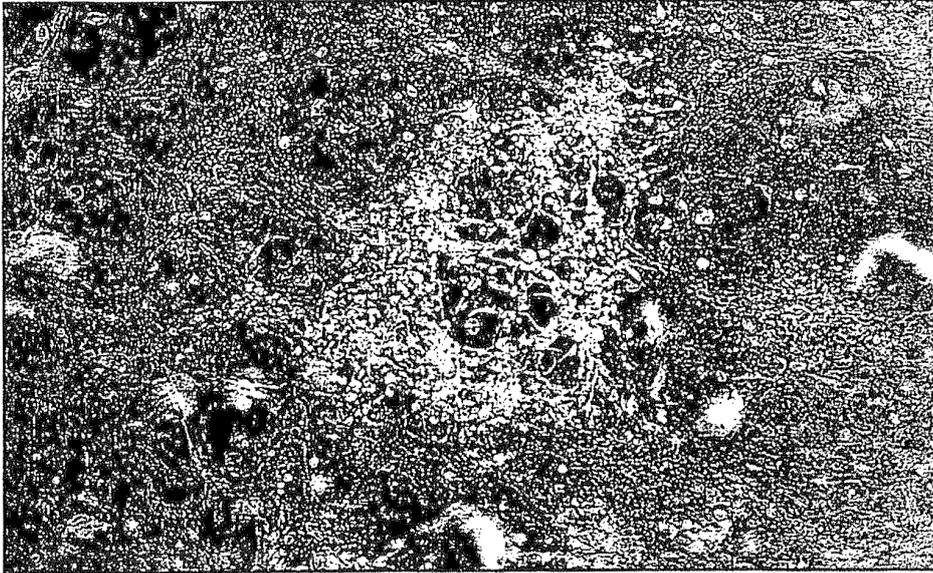


FIG. 6

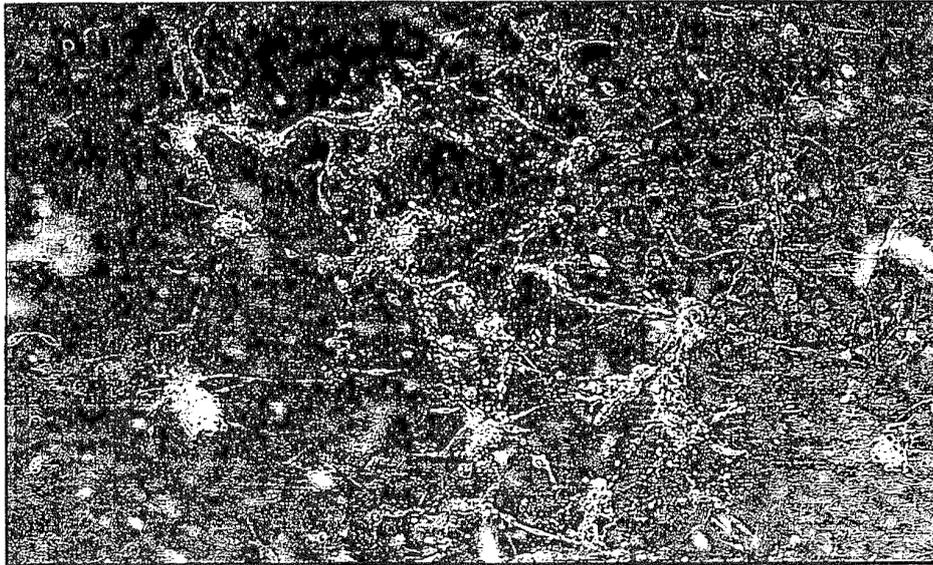


FIG. 7

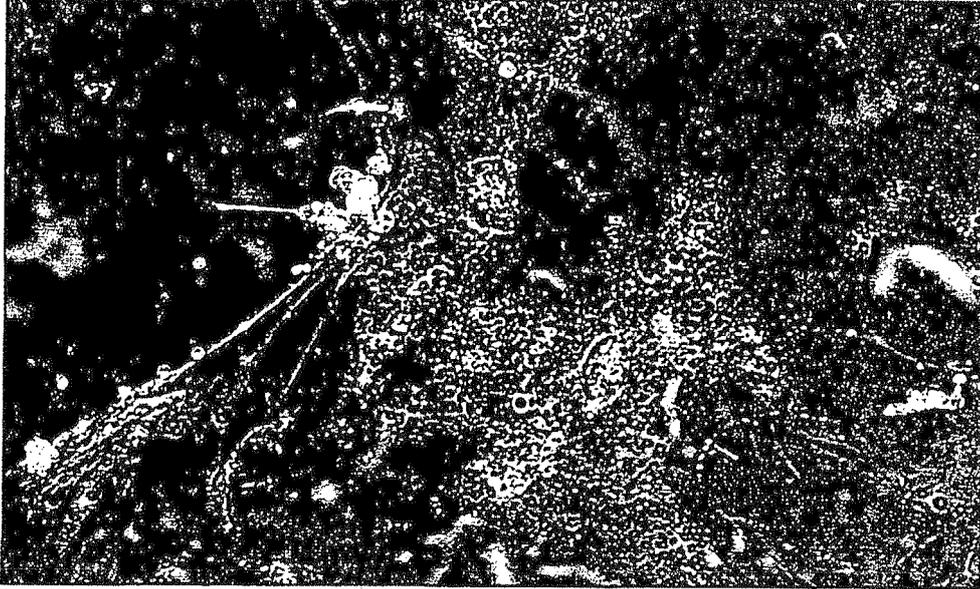


FIG. 8

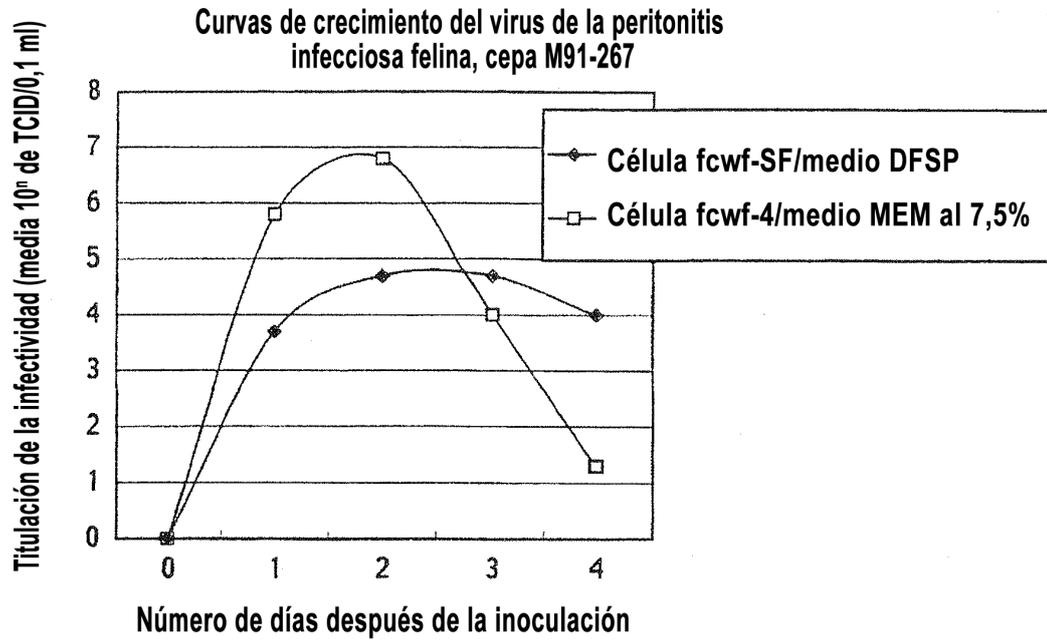


FIG. 9

