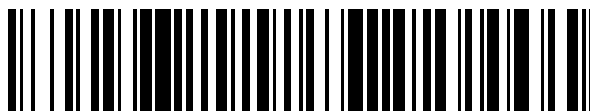


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 365**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2005** **E 05720511 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013** **EP 1862537**

54 Título: **Cepa de células que pueden cultivarse sin componentes de origen animal, procedimiento para su producción, procedimiento de producción de virus usando dicha cepa y procedimiento de producción de una vacuna**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2013

73 Titular/es:

KYORITSU SEIYAKU CORPORATION (100.0%)
5-10, KUDANMINAMI 1-CHOME, CHIYODA-KU
TOKYO 102-0074, JP

72 Inventor/es:

MOCHIZUKI, MASAMI

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 424 365 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

Cepa de células que puede cultivarse sin componentes de origen animal, procedimiento para su producción, procedimiento de producción de virus usando dicha cepa y procedimiento de producción de una vacuna

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una cepa de células que puede cultivarse sin componentes de origen animal y un procedimiento para su producción. Además, la presente invención también se refiere a un procedimiento para producir un virus usando la cepa de células anterior.

Antecedentes de la técnica

- 10 Ha pasado más de medio siglo desde la creación de una técnica para el cultivo de células animales y similares en un tubo de ensayo. Esta técnica se ha desarrollado significativamente junto con la progresión de la ciencia y la tecnología

- 15 En general, cuando se usa directamente un animal vivo para experimentación, los resultados pueden entenderse fácilmente. Sin embargo, esta exploración directa de un animal vivo ha sido problemática tanto técnica como económicamente. Por tanto, se ha escindido una porción del animal y se han replicado las células de dicha porción en un entorno artificial, como una placa de Petri o un tubo de ensayo. Este procedimiento se denomina procedimiento de cultivo tisular o procedimiento de cultivo celular. Puesto que esta técnica no ha resultado difícil, ha sido posible producir productos farmacéuticos, vacunas, antígenos de diagnóstico, etc., mediante este procedimiento. Sin embargo, para cultivar células animales *in vitro*, es necesario cultivar las células prácticamente en las mismas condiciones que las condiciones originales *in vivo*. Por ejemplo, se aplican condiciones, tales como un lugar 20 aséptico o un entorno de temperatura que se establece a la misma temperatura de un organismo vivo.

- Además, incluso si se han satisfecho las condiciones mencionadas anteriormente, ha sido necesario para la división celular y la replicación suministrar adicionalmente un «factor de crecimiento celular» como nutriente. Entre los ejemplos de estos factores de crecimiento celular se incluyen diversos tipos de hormonas, insulina, putrescina y un factor de crecimiento de fibroblasto. Sin embargo, estos factores de crecimiento celular no se han aclarado 25 todavía en todas las especies celulares y se incluyen, en muchos casos, componentes desconocidos.

- Por tanto, en lugar de factores de crecimiento celular, pueden usarse sueros de animales. Los efectos de estos no pueden preverse de forma específica. Entre estos sueros de animales se selecciona normalmente un suero bovino debido a la gran población bovina y también porque puede suministrarse de forma estable. Especialmente, se ha usado con frecuencia suero fetal bovino porque contiene sólo una pequeña cantidad de proteína tóxica. En estudios científicos se dan casos en los que un material de ensayo puede contener una proteína de origen bovino, aunque ésta no sea la especie animal de interés. Sin embargo, el uso de esta proteína de origen bovino como producto farmacéutico para humanos u otras especies animales puede producir problemas.

- El primer problema está relacionado con la alergia. Cuando se inyecta por vía parenteral una vacuna o un fármaco que contiene suero bovino a un humano, o a animales, puede que la primera inyección no cause problemas en muchos casos. Sin embargo, una segunda inyección o inyecciones posteriores pueden causar un problema referente a una reacción alérgica. Este fenómeno puede explicarse desde un punto de vista inmunológico. Es decir, un animal sólo reacciona ligeramente con una sustancia de alto peso molecular (p. ej., una proteína que tiene un peso molecular de 10.000 daltons o superior) cuando el animal se ve expuesto a la sustancia por primera vez y, por tanto, la sustancia administrada se metaboliza *in vivo*. Sin embargo, permanece en el sistema inmune una memoria referente a la exposición. Por tanto, cuando el animal se expone a la sustancia (antígeno) por segunda vez o posterior, las células del sistema inmune que memorizaron la primera exposición reaccionan directamente con la sustancia y, como resultado, se produce una reacción vital que es más fuerte que la de la primera exposición en menos tiempo. Dependiendo de los tipos de seres humanos o animales, pueden darse casos en los que se produzca una reacción desfavorable con un antígeno al que se ve expuesto desde el exterior. Típicamente, esta reacción se denomina reacción alérgica. Esta reacción alérgica produce fiebre o hinchazón en el sitio de inyección y, en el peor de los casos, los seres humanos o animales mueren por disnea debido a obstrucción respiratoria, colapso y similares.

- El segundo problema se refiere a la contaminación de patógenos o anticuerpos de suero bovino en dicho suero bovino. Un ejemplo famoso es la contaminación con pestivirus, retrovirus, micoplasma, etc., de origen bovino. Recientemente, el prión, que es el patógeno de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) conocida como la enfermedad de las vacas locas, se ha convertido en un posible problema.

- Como se estableció anteriormente, aunque el uso de suero bovino puede dar lugar ocasionalmente a la aparición de problemas, dicho suero bovino se ha usado frecuentemente para la producción de vacunas utilizadas especialmente en el campo veterinario dirigidas a animales en todo el mundo.

- 55 Sin embargo, se han divulgado una tentativa de no usar suero bovino en el procedimiento de cultivo celular (un medio sin suero (MSS) y un procedimiento de cultivo celular sin suero) y la producción de una vacuna experimental para bóvidos usando dicho medio sin suero y dicho procedimiento de cultivo celular sin suero (Makoschey y col., Serum-free produced bovine herpesvirus type 1 an bovine parainfluenza type 3 virus vaccines are efficacious and safe. Cytotechnology, 39: 139-145, 2002). Sin embargo, en la publicación no se describen vacunas utilizadas para animales distintos a bóvidos. Además, tampoco se describen en absoluto vacunas utilizadas en 60 perros.

Además, se ha publicado que las células MDCK han sido cultivadas en un medio sin suero y que, a continuación, se ha replicado el virus de la gripe (Kessler y col., Suitability of MDCK cells grown in a serum-free

medium for influenza virus production. En Brown y col., ed., Inactivated influenza vaccines prepared in cell culture. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger, 1999, vol. 98, pag., 13-21: Merten y col., Production of influenza virus in serum-free mammalian cell cultures. En Brown y col., ed., Inactivated influenza vaccines prepared in cell culture. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger, 1999, vol. 98, pag. 27-37: Voten y col., Generation and characterization of reassortant influenza A viruses propagated in serum-free cultured MDCK-SF1 cells. En Brown y col., ed., Inactivated influenza vaccines prepared in cell culture. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger, 1999, vol. 98; pag. 77-87: Voeten y col., Characterization of high-grown reassortant influenza A viruses generated in MDCK cells cultured in serum-free medium. Vaccine 17:1942-1950, 1999. Keiichi Makisumi y col., Cells that can be used in serum free culture and suspension culture and method of producing viruses used for vaccines using such cells; publicación local de la publicación internacional PCT para solicitud de patente (A1), publicación internacional WO01/064846; fecha de publicación internacional: 07/09/2001). Sin embargo, los medios descritos en estas publicaciones comprendían componentes desconocidos o, aunque no contenían suero, comprendían componentes de origen animal.

Se han divulgado un procedimiento de crioconservación sencillo de cultivos celulares en un medio sin suero, un procedimiento que comprende añadir dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 % al medio MDSS2 (AXCELL Biotechnologies, F-69610 Saint Genis l'Arentiere) que es un tipo de MSS y, a continuación, se crioconservan células Vero como células derivadas de riñón de mono y células BHK-21 como células derivadas de riñón de hámster usando el medio producido (Merten y col., A simple serum-free freezing medium for serum-free cultured cells. Biologicals, 23: 185-189, 1995). Sin embargo, dicho medio MDSS2 contiene peptona al 0,3 % derivada de caseína como proteína animal. Además, también se ha publicado que un medio producido por la adición del 10 % de DMSO a un medio sin suero para producción de virus (MSS-PV) puede aplicarse a la crioconservación de células que se ha cultivado en un medio sin suero (Price y Evege, Serum-free medium without animal components for virus production. Focus, 19: 67-69, 1997). Sin embargo, la composición del MSS-PV en sí sigue siendo desconocida.

Por tanto, ha sido deseable el desarrollo de un medio que no contenga componentes de origen animal, células cultivadas en un medio que no contenga componentes de origen animal, vacunas seguras, reactivos analíticos y similares.

Descripción de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a una cepa de células inducida a partir de células MDCK como células derivadas de riñón de perro, que pueden cultivarse sin componentes de origen animal. Esta cepa de células es una cepa de células depositada con el número de acceso FERM BP-10225.

Además, un aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento de producción de una cepa de células, que comprende una etapa de adaptación de las células MDCK a un medio que no contiene suero pero sí un factor de crecimiento celular y una etapa de cultivo de las células en un medio que contiene medio RPMI 1640 y peptona derivada de soja pero no contiene componentes de origen animal, de modo que se produce una cepa de células que puede cultivarse sin componentes de origen animal.

Adicionalmente, un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un virus que comprende una etapa de infección de la cepa de células de la presente invención con un virus y una etapa de cultivo de la cepa de células infectada para replicar el virus. El medio utilizado para el cultivo de la cepa de células infectada puede ser un medio que contenga medio RPMI 1640 y peptona derivada de soja pero no contenga componentes de origen animal. Puede usarse un procedimiento de cultivo en suspensión para el cultivo de la cepa de células infectada. El virus utilizado en este documento puede ser uno seleccionado entre el grupo compuesto por las familias *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Flaviviridae*, *Caliciviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae* y *Parvoviridae*. Además, el virus utilizado en esta patente puede también ser uno seleccionado entre el grupo compuesto por el virus del moquillo canino, virus del sarampión, virus de la parainfluenza canina, virus SV5, virus de la gripe, virus de la rabia, virus de la encefalitis japonesa, calicivirus canino, adenovirus caninos de tipo 1 y de tipo 2, adenovirus humano, herpesvirus canino y parvovirus caninos de tipo 1 y de tipo 2.

Adicionalmente, un aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento para la producción de un antígeno de diagnóstico usando un virus producido según el procedimiento mencionado anteriormente.

Todavía adicionalmente, un aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento de producción de una vacuna usando un virus producido por el procedimiento mencionado anteriormente.

Todavía adicionalmente, un aspecto de la presente descripción se refiere a un medio que contiene medio RPMI 1640 y una peptona derivada de soja pero no contiene componentes de origen animal

Todavía adicionalmente, un aspecto de la presente descripción se refiere a un medio utilizado para la crioconservación de células que se produce mediante la adición del 10 % en peso de dimetilsulfóxido al medio anterior.

Todavía adicionalmente, un aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento de crioconservación que comprende una etapa de crioconservación de una cepa de células inducida a partir de células MDCK como células derivadas de riñón de perro, que pueden cultivarse sin componentes de origen animal, usando el medio mencionado anteriormente utilizado para la crioconservación de células.

Según un aspecto de la presente descripción, puesto que se cultiva una cepa de células inducida a partir de células MDCK sin componentes de origen animal, cuando se usa como vacuna o reactivo analítico un virus producido usando esta cepa de células, es posible proporcionar una vacuna o reactivo analítico seguro.

Además, según un aspecto de la presente descripción, puesto que un virus puede replicarse usando un medio económico disponible en el mercado, cuando se produce un virus usando dicho medio, es posible

proporcionar una vacuna o reactivo analítico económico.

Más aún, según un aspecto de la presente descripción, puesto que el medio no contiene componentes de origen animal cuando se cultivan las células infectadas con virus en el medio anterior, es posible proporcionar una vacuna o reactivo analítico seguro.

- 5 Adicionalmente, según un aspecto de la presente descripción, puesto que las células pueden congelarse usando un medio que no contiene componentes de origen animal, es posible proporcionar una vacuna o reactivo analítico seguro.

- 10 Se apreciará que las expresiones «no contiene componentes de origen animal» y «sin componentes de origen animal» se usan en la presente descripción especialmente con el significado de que el medio no contiene un componente proteico de origen animal que pueda producir alergia. Entre los ejemplos de componentes que pueden ser causa de alergia se incluyen un suero de origen animal, albúmina sérica como porción del suero anterior, una proteína animal como un factor de crecimiento celular y diversos tipos de aditivos de origen animal (bacto peptona, medio de cultivo triptosa fosfato, etc.).

Breve descripción de la figuras

- 15 La figura 1 es una fotografía en la que se muestran las células de una cepa de MDCK-PS;

En la figura 2 se muestran las curvas de crecimiento de las células MDCK-PS cultivadas en un medio RPMI/PS y células MDCK cultivadas en medio MEM al 7,5 %;

La figura 3 es una fotografía en la que se muestran las células MDCK-PS que se han sometido a un cultivo celular en suspensión usando medio RPMI/PS y perlas microportadoras;

- 20 En la figura 4 se muestran las curvas de crecimiento de cepas Snyder Hill del virus del moquillo canino en células MDCK cultivadas en medio MEM al 7,5 % y en células MDCK-PS cultivadas en medio RPMI/PS.

En la figura 5 se muestran las curvas de crecimiento de las cepas RP109 de tipo 1 y Manhattan de tipo 2 del adenovirus canino en células MDCK cultivadas en medio MEM al 7,5 % y en células MDCK-PS en un medio RPMI/PS;

- 25 En la figura 6 se muestran las curvas de crecimiento de las cepas Tsukuba del virus de la parainfluenza canina en células MDCK cultivadas en medio MEM al 7,5 % y en células MDCK-PS cultivadas en medio RPMI/PS y

En la figura 7 se muestran las curvas de crecimiento de un parvovirus canino de tipo 2, de las cepas MD 97-037 de tipo 2b antigénicas en células MDCK cultivadas en medio MEM al 7,5 % y en células MDCK-PS cultivadas en medio RPMI/PS.

- 30 Mejor modo de realizar la invención

Para desarrollar una vacuna segura y eficaz que pueda usarse en perros, se selecciona en primer lugar una línea celular MDCK que es un sistema celular de riñón de perro con un espectro de infección por virus más amplio. Si se usa un medio de cultivo base disponible en el mercado que no contenga componentes de origen animal, como MEM de Eagle, medio RPMI 1640 o medio L-15 de Leiovitz, estas células MDCK no se replican a no ser que se añada suero bovino al medio. Por consiguiente, las células MDCK se adaptan y subcultivan en serie.

- 35 En primer lugar, las células MDCK se adaptan a un medio sin suero que contiene un factor de crecimiento celular. Como factor de crecimiento celular se prefiere un factor de crecimiento epidérmico. También puede usarse un factor de crecimiento epidérmico recombinante. Entre los ejemplos específicos de estos medios se incluyen «Opti-Pro SFM» como nombre de producto (Invitrogen; n.º de catálogo 12309-019) y «Opti-MEM I Reduced-Serum Medium» como nombre de producto (Invitrogen; n.º de catálogo 31985) que es un medio MEM de Eagle modificado, aunque los ejemplos no se limitan a estos. La adaptación de las células MDCK se realiza hasta que se estabiliza la replicación de las células.

- 40 Tras completar la adaptación mencionada anteriormente, las células MDCK se adaptan a continuación a un medio que contiene medio RPMI 1460 y peptona derivada de soja pero no contiene componentes de origen animal (denominado a partir de aquí en este documento «medio RPMI/PS»). Dicha peptona derivada de soja es una peptona no animal y actúa como fuente de proteínas. El contenido de esta peptona derivada de soja en el medio es, preferiblemente, de entre 250 µg/ml y 3.000 µg/ml, más preferiblemente entre 500 µg/ml y 1.000 µg/ml y, especialmente preferible, de aproximadamente 750 µg/ml.

- 50 El contenido de proteína en el medio es preferiblemente de 20 µg/ml o menos, más preferiblemente de 10 µg/ml o menos y, especialmente preferible de 5 µg/ml o menos.

A continuación se muestra un ejemplo de la composición de un medio RPMI/PS, que contiene 750 µg/ml de peptona de soja, aunque los ejemplos no se limitan a este.

(Ejemplo de medio RPMI/PS)

- Medio RPMI 1640 (GIBCO; n.º de catálogo 21870)
- Se disolvieron 15 g de peptona de soja (peptona de soja, digerido enzimático, Fluka, n.º de catálogo 87972) en 1.000 ml de agua destilada esterilizada y, a continuación, la solución obtenida se filtro a través de un filtro de 220 nm. Posteriormente se añadieron 5 ml de la solución resultante a 100 ml del medio RPMI 1640.

- Se añadió L-glutamina al medio RPMI 1640, que resultó en una concentración de 300 mg/l (concentración final: 300 µg/ml).

- Se añadieron como antibióticos penicilina G potásica, sulfato de estreptomicina y anfotericina B al medio RPMI 1460 a concentraciones de 100 U/ml, 100 µg/ml y 2,5 µg/ml, respectivamente (Las concentraciones mencionadas anteriormente son todas las concentraciones finales).

Las células MDCK se subcultivaron en el medio «Opti-Pro-SFM» hasta que se alcanzó el segundo pase y, a continuación, las células se subcultivaron en el medio «Opti-MEM I Reduced-Serum Medium» hasta que se alcanzó el pase 33. A continuación, las células se subcultivaron en un medio RPMI-PS hasta que se alcanzó el pase 28. Por tanto, las células se adaptaron favorablemente al medio RPMI-PS, de modo que pudo estabilizarse el crecimiento de las células. El tiempo necesario para la formación de capas de células y los intervalos entre pases se hicieron constantes durante los últimos pases y las células se subcultivaron hasta cantidades 4 veces la cantidad inicial en intervalos de 5 a 7 días. Esta nueva cepa de células se denominó «cepa MDCK-PS». Adicionalmente, esta cepa de células se subcultivó en medio RPMI/PS hasta que se alcanzaron 45 pases, de modo que las células MDCK pudieran estar completamente adaptadas al medio RPMI/PS como medio sin suero. Por tanto, se ha establecido una cepa de células, que se indujo a partir de células MDCK como células derivadas de riñón de perro y pudieron cultivarse sin componentes de origen animal. La cepa de células MDCK-PS (que se subcultivó en medio RPMI/PS hasta que se alcanzaron 45 pases y entonces se subcultivó en un medio sin suero hasta un total de 80 pases) se depositó en el Instituto Nacional de Ciencia Industrial y Tecnología Avanzada, una institución administrativa independiente del Ministerio de Economía, Comercio e Industria (Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japón) el 16 de diciembre de 2004 (n.º de acceso: FERM P-20329). A continuación se transfirió a un banco internacional con n.º de acceso FERM BP-10225 el 4 de febrero de 2005.

La cepa de células MDCK-PS se infecta con un virus al que dicha cepa es sensible y la cepa de células infectada de este modo se cultiva y replica, de modo que pueda producirse el virus. Como medio utilizado para el cultivo de dicho virus, es preferible un medio que no contengan componentes de origen animal y es más preferible el medio RPMI/PS mencionado anteriormente.

Pueden utilizarse procedimientos conocidos para el cultivo de cepas de células infectadas. Entre los ejemplos de dichos procedimientos conocidos se incluyen un procedimiento de cultivo en monocapa y un procedimiento de cultivo en suspensión.

Por ejemplo, dicho procedimiento de cultivo en monocapa comprende infectar las células cultivadas en monocapa en la superficie interna de un recipiente con el virus de interés y someter a continuación a las células infectadas a cultivos continuos o a un cultivo por rodamiento, de modo que pueda prepararse el virus a partir del sobrenadante del cultivo. Como recipiente puede utilizarse, por ejemplo, una placa de cultivo o una botella de cultivo por rodamiento. Entre los ejemplos específicos de dichos recipientes se incluyen las placas de Petri y las botellas de cultivo celular. Como material para dichos recipientes se prefieren materiales que no sean vidrio, y es más preferible el plástico.

Un ejemplo de procedimiento de cultivo en suspensión es un procedimiento de microportadores usando perlas microportadoras. Por ejemplo, dicho procedimiento de microportadores comprende permitir que las células se repliquen en forma de monocapa sobre las superficies de perlas microportadoras en un biorreactor (tanque de cultivo) y, a continuación, infectar las células replicadas sobre las perlas microportadoras con virus, seguido del cultivo con agitación, para preparar de este modo los virus de interés en la solución de cultivo. Entre los ejemplos de materiales para dichas perlas microportadoras se incluyen cerámica, dextrano, vidrio, sílica, plástico y poliacrilamida. Entre las perlas disponibles en el mercado pueden usarse, por ejemplo, Cytodex (marca comercial) 1 fabricado por Amersham Bioscience.

Entre los ejemplos de virus a los que son sensibles las células MDCK-PS se incluyen, entre otros, virus de las familias *Rhabdoviridae*, *Poxviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Adenoviridae*, *Caliciviridae*, *Adenoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae* y *Parvoviridae*. Entre estos, los virus preferidos que son capaces de adaptarse fácilmente son virus pertenecientes a las familias *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Flaviviridae*, *Caliciviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae* y *Parvoviridae*. Entre los virus preferidos se incluyen además el virus del moquillo canino, virus del sarampión, virus de la parainfluenza canina, virus S5, virus de la gripe, virus de la rabia, virus de la encefalitis japonesa, calicivirus canino, adenovirus caninos de tipo 1 y tipo 2, adenovirus humano, herpesvirus canino y parvovirus caninos de tipo 1 y tipo 2. Si se utiliza una técnica de aclimatación de los virus a las células cultivadas, conocidos como «adaptación», podría ampliarse el espectro de sensibilidad de las células MDCK-PS.

Los virus producidos según el procedimiento de la presente invención se recuperan y purifican, de modo que puedan utilizarse para preparar una vacuna o una sustancia antigénica de diagnóstico. Para dicha recuperación y purificación de los virus pueden utilizarse procedimientos conocidos. Por ejemplo, las células se congelan y, a continuación, se descongelan para su fragmentación, la solución descongelada se centrifuga posteriormente para eliminar las células o los restos celulares, de modo que pueda obtenerse del sobrenadante una solución madre de virus.

Cuando se produce una vacuna a partir de los virus anteriores, la vacuna producida puede ser una vacuna inactivada o de microorganismos vivos. Cuando se produce una vacuna inactivada, los virus recuperados y purificados pueden inactivarse con formalina o componentes similares, y puede añadirse un adyuvante a los virus inactivados de este modo. Por otro lado, cuando se fabrica una vacuna con microorganismos vivos, puede producirse un virus atenuado y, a continuación, puede recuperarse y purificarse. Por tanto, puede añadirse un adyuvante al virus resultante. El nivel vírico en una vacuna debería ser suficiente para impartir al perro al que se va a administrar dicha vacuna la inmunidad necesaria para inhibir la infección con el virus como diana. En general, este nivel vírico está entre $1 \times 10^{3,5}$ TCID₅₀/ml y $1 \times 10^{5,0}$ TCID₅₀/ml o superior. Un ejemplo de adyuvante utilizado en este

documento es un adyuvante que es capaz de impartir inmunidad protectora a la infección sistémica o inmunidad protectora a la infección local al perro al que se le va a administrar.

Cuando se produce un agente diagnóstico para infecciones, el virus inactivado según se establece anteriormente se utiliza como antígeno, o un antígeno aislado del virus se fija sobre un medio soporte, como una placa de ELISA o una membrana de nitrocelulosa, preparándose de este modo el agente diagnóstico. Se deja que el agente diagnóstico se una a un anticuerpo existente en el suero del perro. A continuación, se permiten que reaccione con un anticuerpo secundario al que se ha unido peroxidada de rábano picante o fosfatasa alcalina y, después, se somete a una reacción conocida, como una reacción colorimétrica, de manera que pueda visualizarse. Por consiguiente, puede detectarse y confirmarse la presencia o ausencia de un anticuerpo en circulación existente en un perro infectado con diversos tipos de virus, concretamente, la presencia o ausencia de infección.

Cuando las células se conservan a baja temperatura, puede usarse un medio producido mediante la adición de dimetilsulfóxido (DMSO) al medio RPMI/PS de la presente descripción. La cantidad de DMSO contenida en el medio RPMI/PS está preferiblemente entre el 10 y el 20 % en peso y, más preferiblemente, es de aproximadamente el 10 % en peso, en función del peso del medio anterior. Cuando las células se han conservado a baja temperatura, por ejemplo, usando un congelador eléctrico a -80 °C o nitrógeno líquido a -196 °C, convencionalmente se ha usado un medio que contenía suero fetal bovino y DMSO para evitar a las células el daño fisicoquímico producido durante la congelación. Por el contrario, puesto que el medio de la presente descripción que se usa en la crioconservación de células no contiene ni suero ni ningún otro componente de origen animal, se usa de forma apropiada en la conservación a baja temperatura de células adaptadas a un medio sin suero. En particular, el medio de la presente descripción es preferible como medio utilizado en la crioconservación de las células MDCK-PS.

La invención de la presente solicitud se describirá más en detalle en los ejemplos siguientes. Sin embargo, no se pretende que estos ejemplos limiten el alcance de la presente invención. Debe apreciarse que el término « % » se usa en la presente descripción específica en sentido de « % en peso » a no ser que se especifique otra cosa.

(Ejemplo 1: Producción de la cepa MDCK-PS usando medio RPMI/PS)

Las células MDCK utilizadas como células derivadas de riñón de perro en el ejemplo presente se refieren a un sistema celular obtenido a partir del riñón de un cocker spaniel hembra sano por Madin y Darby en septiembre de 1958. Se considera que este sistema celular deriva de células (ATCC n.º CCL-34) registradas en la ATCC (American Type Culture Collection). En 1970, el inventor de la presente solicitud utilizó estas células para estudios realizados en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria, Departamento de Medicina Veterinaria, Facultad de Agricultura de la Universidad de Tokio. A continuación, las mismas células anteriores se transfirieron al Lab. de Microbiología Veterinaria, Departamento de Medicina Veterinaria, Facultad de Agricultura de la Universidad de Kagoshima y después se transfirieron al Lab. de Microbiología Clínica de Kyoritsu Seiyaku Corp. En el laboratorio de Microbiología Clínica como titular final desde abril de 1995, las células se subcultivaron en un medio (MEM al 7,5 %) producido añadiendo suero fetal bovino al 7,5 %, medio de triptosa fosfato al 10 % y L-glutamina (0,292 g/l) y con la finalidad de evitar la contaminación por microorganismos, también se añadió penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (0,25 a 0,5 µg/ml) a medio base MEM de Eagle (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.; medio MEM de Eagle (Nissui (1)). Estas se definieron como células parentales.

Como primera etapa de adaptación, las células se subcultivaron en un medio sin suero que contenía un factor de crecimiento epidérmico recombinante, cuyo nombre de producto era «Opti-Pro SFM» (Invitrogen; n.º de catálogo 12309-019), hasta el pase 2. A continuación, la solución de cultivo se cambió por un medio MEM de Eagle modificado cuyo nombre de producto era «Opti-MEM I Reduced-Serum Medium» (Invitrogen; n.º de catálogo 31985). En este medio, las células se subcultivaron sin adición de suero fetal bovino, hasta 33 pases. Básicamente, las células se trataron en las mismas condiciones de subcultivo que las de las células parentales. Es decir, las células originales se subcultivaron hasta cantidades 4 veces las cantidades iniciales en intervalos de aproximadamente 7 días. En el caso del subcultivo tanto de las células parentales como de las células MDCK-PS inducidas a partir de las células parentales anteriores y adaptadas a un medio sin suero, las superficies celulares se lavaron dos veces con una solución de tripsina al 0,25 % + EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) al 0,02 % y, a continuación, las células se dejaron en reposo en un incubador a 37 °C, de modo que dichas células se dispersasen. La tripsina utilizada fue TRIPSINA 250 de DIFCO derivada de páncreas de cerdo (Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.). La solución de tripsina anterior se disolvió en PBS esterilizado y se filtró a continuación a través de un filtro de 220 nm para su esterilización.

Como se observó a menudo durante el proceso de adaptación celular, el crecimiento celular se retrasó en ocasiones. Por tanto, durante este retraso, el medio se cambió por medio recién preparado una o dos veces, o el factor de expansión se redujo de 2 a 3 veces, de modo que no se interrumpió el crecimiento celular.

Por consiguiente, se obtuvo un efecto claro de subcultivo de las células en los medios «Opti-Pro SFM» y «Opti-MEM I Reduced-Serum Medium» hasta que se alcanzó el número total de 35 pases de expansión. Es decir, se estabilizó el crecimiento celular.

Posteriormente, el inventor ha intentado cultivar células de la 33.^a generación, las cuales se habían adaptado prácticamente al medio «Opti-MEM I Reduced-Serum Medium» en MEM de Eagle, medio RPMI 1640, medio L-15 de Leiovitz o medio 5A de McCoy. Como resultado, las células se replicaron favorablemente en medio 5A de McCoy (modificado) (n.º de catálogo básico de GIBCO 12330 y 16600). Sin embargo, en el caso de utilizar otro medio, el crecimiento celular terminaba a mitad del cultivo a pesar de que las células se adherían a la pared del recipiente de incubación. Por tanto, no se formaba la capa de células.

Una clara diferencia obtenida mediante la comparación entre los componentes del medio 5A de McCoy (modificado) (n.º del catálogo básico de GIBCO 12330 y 16600) y de los demás medios base era la adición o no de Bacto-peptona. Esta Bacto-peptona era un «nutriente» obtenido mediante digestión enzimática de varios tipos de

proteínas bovinas. Por tanto, puesto que la Bacto-peptona no coincidía con la intención de la presente invención, se usó el medio 5A de McCoy's como ejemplo comparativo. Se considera que las células se replican favorablemente en medio 5A de McCoy's debido a la influencia de Bacto-peptona como digerido enzimático derivado de proteínas bovinas, que se había añadido sólo al medio 5A de McCoy's. Por tanto, se examinaron diversos tipos de peptonas no animales que actúan también como fuente de proteínas. Como resultado, el inventor ha encontrado una peptona derivada de soja.

Entre los medios base mencionados anteriormente, en concreto, medio MEM de Eagle, medio RPMI 1640 y medio L-15 de Leiovitz, el crecimiento celular en medio RPMI 1640 era el mejor. Por tanto, se eligió el medio RPMI 1640 y se añadió peptona de soja al medio para obtener un medio que no contuviera proteínas de origen animal (denominado «medio RPMI/PS»). Este medio RPMI/PS se muestra en la tabla 1. El medio y los aditivos mostrados en la tabla se proporcionan como ejemplo, y en este documento se muestran ejemplos de productos disponibles en el mercado. Por consiguiente, el medio RPMI/PS de la presente descripción no se limita a este ejemplo.

[Tabla 1]

Tabla 1. Ejemplo específico de medio RPMI/PS

1) Medio RPMI 1640 (GIBCO, n.º de catálogo 21870)

2) Se disolvieron 15 g de peptona de soja (peptona de soja, digerido enzimático, Fluka, n.º de catálogo 87972) en 1.000 ml de agua destilada esterilizada y la solución obtenida se filtró a continuación a través de un filtro de 220 nm. A continuación, se añadieron 5 ml del filtrado a 100 ml del medio 1) (concentración final: 750 µg/ml).

3) Se añadió L-glutamina a la mezcla anterior a una concentración de 300 mg/l (concentración final: 300 µg/ml).

4) Como antibióticos, se añadieron penicilina G potásica, sulfato de estreptomycin y anfotericina B a la mezcla obtenida a concentraciones de 100 U/ml, 100 µg/ml y 2,5 µg/ml, respectivamente. (Las concentraciones mencionadas anteriormente son todas las concentraciones finales).

El recipiente de cultivo utilizado para el cultivo fue un recipiente no de vidrio, por ejemplo, un recipiente de plástico como una botella de cultivo de 25 cm² o una placa de Petri de plástico con un diámetro de 6 cm. Usando estos recipientes de cultivo, se inició el cultivo en un medio de cultivo sin suero. Como resultado, se atenuó la propiedad de adherencia a la pared original de las células MDCK. Las células se adherían a la pared de vidrio, pero no se observó ni extensión ni replicación de las células. Por tanto, las células no formaban ni una masa ni una capa de células. Por consiguiente, se usó un recipiente de cultivo de plástico en todos los procesos de la presente invención.

Las células MDCK, que han sido subcultivadas en los medios «Opti-Pro SFM» y «Opti-MEM I Reduced-Serum Medium» hasta un total de 35 pases, se adaptaron posteriormente y se subcultivaron en el medio mostrado en la tabla 1. Cuando las células anteriores se subcultivaron en el medio RPMI/PS hasta 28 pases, se confirmó que las células se habían adaptado 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 entre pases se hacían constantes a lo largo de varios de los últimos pases y las células se cultivaron hasta cantidades que eran 4 veces la cantidad inicial en intervalos de 5 a 7 días. Las células se subcultivaron adicionalmente y cuando se alcanzaron 45 pases, las células pueden estar completamente adaptadas al medio RPMI/PS como medio sin suero. Por tanto, la cepa de células de 45.^a generación se definió como una cepa de células recientemente inducida y se depositó en las instituciones internacionales mencionadas anteriormente, como se indicó previamente (cepa MDCK-PS).

En la figura 1 se muestra una fotografía de una capa de células tomada el 3.^{er} día de cultivo de la cepa de células MDCK-PS de 40.^a generación. La fotografía se tomó con un microscopio invertido, aunque las células no se inmovilizaron ni se tiñeron. A continuación, el número de células aumentó adicionalmente, y la capa se hizo de este modo más espesa.

En la figura 2 se muestra la curva de crecimiento de las células MDCK-PS de 41.^a generación cultivadas en medio RPMI/PS. El cultivo de las células parentales usadas como control se inició en MEM al 7,5 %. En el caso de ambos tipos de células, se colocan 7,5 ml de la suspensión de células con una concentración de células controlada a $5,0 \times 10^5$ /ml en una botella de cultivo de 25 cm² y se sometió a continuación a un cultivo continuo en un sistema cerrado. El número de células se contó cada 24 horas. Como se muestra en la figura 2, siete días después la cantidad de células MDCK-PS aumentó aproximadamente 4 veces con respecto a la cantidad original de las mismas y la cantidad de las células parentales aumentó aproximadamente 5,5 veces con respecto a la cantidad original de las mismas. A partir de estos resultados, se encuentra que las células MDCK-PS eran excelentes en términos de replicación así como las células MDCK como células parentales.

Además de la propiedad mencionada anteriormente, las células MDCK-PS tenían las siguientes

propiedades.

Se realizó un intento por cultivar las células MDCK-PS de 44.^a generación en medio RPMI 1640, al que no se le había añadido peptona de soja. Cuatro días después, la generación inicial formaba una capa de células. Sin embargo, después de haber subcultivado las células, se replicaron en forma de nido y no formaron la capa de células. A partir de estos resultados, se confirmó de nuevo que la cepa de células de MDCK-PS inducida necesita que el medio RPMI/PS contenga peptona de soja para su replicación.

Con respecto a la influencia de las células MDCK-PS sobre la replicación cuando se aumentó la cantidad de peptonas de soja contenida en el medio RPMI/PS a 2 veces y 4 veces, en concreto, a 1,5 mg/ml y 3 mg/ml, se examinaron las células MDCK/PS de 47.^a generación. Como resultado se encontró que las células MDCK-PS se replicaron al mismo nivel aunque disminuyó la cantidad de peptona de soja.

(Ejemplo 2: cultivo en suspensión de células usando perlas microportadoras)

Las células MDCK-PS se sometieron a un cultivo en suspensión usando perlas microportadoras disponibles en el mercado.

Se usó Cytodex (marca comercial) 1 de Amersham Bioscience como perlas microportadoras disponibles en el mercado. Esta es una esfera compuesta por dextrano que se utiliza específicamente en cultivo celular.

Se pesaron 0,3 g de perlas microportadoras y, a continuación se activaron con solución salina tamponada con fosfato que no contenía ni Ca^{++} ni Mg^{++} según las instrucciones. A continuación, se esterilizaron por calor en un autoclave, seguido de la sustitución del medio por RPMI/PS. Esta suspensión de perlas microportadoras se transfirió a una botella de cultivo de agitación (Wheaton Science Products, NJ, EE. UU.). A continuación, el total de 10^7 células MDCK-PS (la 56.^a generación) se resuspendieron en 50 ml de medio RPMI/PS y, después, la suspensión se colocó en la botella de cultivo de modo que las células se adsorbieron a 37 °C. Durante aproximadamente 3 horas, la suspensión se rotó ocasionalmente a 40 rpm durante unos 2 minutos, de modo que las células se mezclaran y se permitió que entraran en contacto con la esfera. Posteriormente se añadieron 50 ml de medio RPMI/PS más a la suspensión y, mientras se rotaba en el agitador rotatorio a 60 rpm, se inició el cultivo.

Tras el inicio del cultivo, se cambió la mitad del medio por medio recién preparado a intervalos de 3 días. Veinte días después del inicio del cultivo se observó que varias células se adsorbieron a parte de la esfera y que el color del medio había cambiado a amarillo, lo que sugería crecimiento celular. Cuatro días después de la anterior observación de adhesión celular, se confirmó que aumentaba el número de células adheridas. En la figura 3 aparece una fotografía al microscopio tomada 27 días después del inicio del cultivo.

En la figura 3 se observa que la superficie de la esfera estaba cubierta por las células. Fue posible recuperar dichas células adheridas con la solución de tripsina/EDTA mencionada anteriormente y se subcultivaron después en perlas microportadoras y medio nuevos. Es decir, la combinación de las células MDCK-PS con el medio RPMI/PS permite el cultivo en suspensión de células usando perlas microportadoras.

El procedimiento de cultivo en suspensión usando perlas microportadoras es una técnica utilizada para aumentar el número de células generadas por unidad de volumen. Mediante este procedimiento de cultivo, puede replicarse un parvovirus canino usando las células MDCK/PS. Este procedimiento de cultivo es extremadamente útil para la generación de un virus cuyo nivel de replicación depende de la capacidad de replicación de las células hospedadoras para infectarse con el virus, como un parvovirus canino. Se anticipó que el nivel de virus generado aumentará significativamente. Por ejemplo, puesto que el nivel de parvovirus canino contenido en 1 vial (1 ml de volumen) de vacuna para perros, que actualmente se comercializa, está entre TCID_{50} de $10^{5,0}$ a $10^{7,0}$, puede alcanzarse suficientemente el objetivo incluso mediante un procedimiento de cultivo que suponga usar los valores de infectividad de las soluciones madre de inoculación vírica mostrados en la tabla 2 a continuación. El procedimiento de cultivo en suspensión usando perlas microportadoras se aplica para resolver este problema específico de virus que dependen de la función celular.

(Ejemplo 3: producción de solución madre de inoculación vírica sin suero)

En el ejemplo 3, se usaron 5 tipos de virus, que actualmente constituyen vacunas esenciales utilizadas en la inoculación preventiva de perros mascota en todo el mundo, como el virus del moquillo canino, adenovirus caninos de tipo 1 y tipo 2, virus de la parainfluenza canina y parvovirus canino de tipo 2. Hasta la fecha, estas soluciones madre de virus se han replicado en un sistema de cultivo celular como MEM de Eagle al que se ha añadido suero fetal bovino o medio de cultivo triptosa fosfato. Por tanto, para replicar los virus en un medio sin suero como un sistema de cultivo celular, deberían eliminarse las proteínas animales, como el componente del suero bovino. Por tanto, se produjo una solución madre de inoculación vírica sin suero en el presente ejemplo. En la tabla 2 se muestran los nombres de las cepas de virus utilizadas en realidad, entre las especies de virus mencionadas anteriormente y los valores de virus en las soluciones madre de inoculación vírica producidas usando estas cepas víricas. [Tabla 2]

Tabla 2 Virus de solución madre de inoculación vírica y valores de infectividad

Virus	Nombre de la cepa	Especies de células	Valor de infectividad (TCID ₅₀ /0,1ml)	
			Medio MEM al 7,5 %	Medio RPMI/PS
Virus del moquillo canino	Snyder-Hill	MDCK	10 ^{4,7}	10 ^{5,3}
Adenovirus canino de tipo 1	PR109	MDCK	10 ^{5,3}	10 ⁹
Adenovirus canino de tipo 2	Manhattan	MDCK	10 ^{5,7}	10 ^{5,3}
Parvovirus canino de tipo 2	MD97-037	MDCK	10 ^{5,3}	10 ^{4,3}
Virus de la parainfluenza canina	Tsukuba	MDCK	10 ^{7,7}	10 ^{8,3}

Con respecto a las soluciones madre iniciales de virus del moquillo canino, adenovirus caninos de tipo 1 y tipo 2 y el virus de la parainfluenza canina, tras la inoculación de los virus, las células MDCK como células parentales se cultivaron en un medio, al cual se había añadido suero fetal bovino al 2 %, para promover así la replicación de los virus. Por tanto, puesto que el sobrenadante del cultivo contenía tanto suero fetal bovino al 2 % como triptosa fosfato al 10 %, se realizó la tentativa descrita a continuación para eliminar la influencia de dichos componentes. Se inoculó una solución madre de virus en las células MDCK-PS, que se habían cultivado en una botella de cultivo en un sistema cerrado y habían formado una capa de células y, después los virus se adsorbieron acto seguido durante 1 hora. A continuación, la solución madre de virus se eliminó mediante aspiración, y las superficies celulares se lavaron dos veces con medio RPMI/PS. Posteriormente, se añadió a las mismas medio RPMI/PS y la mezcla obtenida se sometió después a cultivo continuo en un incubador a 37 °C, de modo que se promovió la replicación de los virus. Poco después de los 7 días posteriores, cuando los virus se habían replicado suficientemente, la botella de cultivo que contenía el cultivo se congeló una vez y, a continuación, se descongeló. La solución descongelada se sometió a una centrifugación a baja velocidad para eliminar las células y los restos celulares. El sobrenadante se definió como solución madre de virus de 2.^a generación. Esta operación se repitió dos veces en total y el sobrenadante de cultivo de 3.^a generación se definió como solución madre de virus, y se colocó en un congelador a -80 °C para su conservación.

Con respecto al parvovirus canino de tipo 2, el virus se inoculó en las células MDCK-PS, cuando las células se resuspendieron en medio RPMI/PS. La solución madre de virus inicial contenía suero fetal bovino al 7,5 % y, por tanto, la influencia del suero bovino en la solución madre de virus inicial era superior que en otras soluciones madre de virus. Por tanto, cuando las células MDCK-PS se resuspendieron en el medio RPMI/PS, se añadió a la suspensión una solución madre de virus en una cantidad de aproximadamente el 5 % de la solución de cultivo y, a continuación, la solución mezcla se sometió a cultivo continuo en un incubador a 37 °C. Veinticuatro horas después de la adhesión de las células a la pared, se eliminó la solución de cultivo mediante aspiración y las superficies celulares se lavaron una vez con medio RPMI/PS. A continuación, se añadió nuevo medio RPMI/PS al incubador para promover la replicación del virus. Después de 6 días, las células infectadas se subcultivaron en la misma operación de subcultivo que el subcultivo de las células MDCK-PS normales mediante digestión con tripsina. Esta operación se repitió dos veces en total y el cultivo de 3.^a generación contenido en una botella de cultivo se congeló una vez y se descongeló. La solución descongelada se sometió a una centrifugación a baja velocidad para eliminar las células y los restos celulares. El sobrenadante se definió como una solución madre de inoculación vírica.

También se muestran en la tabla 2 los valores de infectividad de las especies víricas producidas en las células MDCK-PS cultivadas en el medio RPMI/PS. A partir de los valores de la tabla 2, se encontró que estos valores de infectividad son equivalentes a los de los virus replicados en células MDCK como células parentales.

[Ejemplo 4: crecimiento del virus del moquillo canino]

1) Las células MDCK utilizadas como células parentales se cultivaron en medio MEM al 7,5 % colocado en botellas de cultivo de 25 cm². Las células MDCK-PS se cultivaron en medio RPMI/PS colocado en el mismo tipo de botella. Tres días después del inicio del cultivo, se formó una capa de células. En este momento, se contó el número de células.

2) El virus del moquillo canino de la cepa Snyder Hill, de entre las soluciones madre de virus que se muestran en la tabla 2, se diluyó y, a continuación, se inoculó en los dos tipos de células mencionadas anteriormente, de modo que los dos tipos de células pudieran tener la misma m.i. (multiplicidad de infección; la proporción del número de partículas víricas infecciosas y un número conocidos de células cultivadas), que era de 0,01.

3) Después de que los virus se hayan adsorbido a 37 °C durante 1 hora, los virus no adsorbidos se eliminaron por aspiración. A continuación, se añadió MEM al 7,5 % o medio RPMI/PS a la botella de cultivo, seguido de un cultivo continuo.

4) Posteriormente, tras la inoculación a intervalos de 24 horas, el cultivo contenido en la botella de cultivo se

crioconservó en un congelador de -80 °C los días 1.º, 2.º, 3.º, 4.º y 7.º.

5) Antes de medir los valores de infectividad del virus, la botella congelada se descongeló a temperatura ambiente y, a continuación, el sobrenadante obtenido por eliminación de los componentes celulares mediante centrifugación a 2.500 rpm durante 10 minutos se utilizó en la medición del valor de infectividad.

5 6) Este valor de infectividad se midió mediante un procedimiento de microvaloración usando una microplaca de 96 pocillos. Es decir, la solución madre de virus obtenida en el punto 5) anterior se diluyó 10 veces con medio MEM al 7,5 % mediante dilución seriada, y se añadieron 100 µl de cada diluido a 4 pocillos. A continuación se añadieron 100 µl más de suspensión celular a todos los pocillos y la mezcla obtenida se mezcló ligeramente, seguido de un cultivo continuo en un incubador con dióxido de carbono al 5 % a 37 °C.

10 7) Como suspensión celular, se usaron células Vero (vero SLAM), que expresan SLAM canino (CD150) como receptor lateral celular para el virus del moquillo canino a una concentración de 1×10^5 /ml en MEM al 7,5 % (Seki y col., Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. J. Virol., 77:9943-9950, 2003).

15 8) Siete días después de la inoculación del virus, se calculó el punto final del valor de infectividad en función de la presencia o ausencia de efecto citopático (EC).

20 Los resultados se muestran en la figura 4. En la figura 4 se muestran curvas de crecimiento de las cepas Snyder Hill del virus del moquillo canino en células MDCK como células parentales cultivadas en MEM al 7,5 % y en células MDCK-PS cultivadas en el medio de la presente descripción que no contenía proteínas de origen animal. Desde el día posterior a la inoculación del virus, tanto en células MDCK parentales como en las células MDCK-PS, la generación de virus se inició 24 horas después de la infección y, a continuación, aumentó el número de virus. En todos los puntos temporales, las células MDCK-PS mostraron valores de infectividad vírica que eran de 32 a 100 veces superiores a los de las células MDCK.

(Ejemplo 5: adenovirus caninos de tipo 1 y de tipo 2)

Se aplicó aquí el mismo método que se describe en el ejemplo 4 con las siguientes dos excepciones

25 1) Las cepas víricas utilizadas fueron la cepa PR109 en el caso del adenovirus canino de tipo 1 (CAV-1) y la cepa Manhattan en el caso del adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2) y

8) Las células utilizadas en el procedimiento de microvaloración para la valoración de la infectividad fueron las células MDCK.

30 Los resultados se muestran en la figura 5. A partir de la figura 5 se encuentra que los dos tipos de cepas víricas se replican prácticamente de la misma manera en los dos tipos de células cultivadas. Además, no se observaron diferencias entre el procedimiento de cultivo vírico convencional usando suero bovino y el procedimiento de cultivo vírico de la presente invención usando células MDCK-PS en medio que no contiene proteínas de origen animal. En los dos tipos de procedimientos anteriores se obtuvieron valores de infectividad excelentes.

(Ejemplo 6: virus de la parainfluenza canina)

35 Se aplicó aquí el mismo procedimiento que se describe en el ejemplo 4 con las siguientes tres excepciones:

1) La cepa vírica utilizada fue una cepa Tsukuba;

2) Las células usadas en el procedimiento de microvaloración para la medida de los valores de infectividad fueron las células MDCK y

40 3) Según la presencia o ausencia de una hemaglutinina generada en el sobrenadante contenido en cada pocillo de dilución, se determinó el punto final del título de infectividad usado en el procedimiento de microvaloración para la medición de los valores de infectividad. Es decir, se recogieron 50 µl del sobrenadante de cada pocillo y, a continuación, se transfirieron a una microplaca que se había preparado de forma independiente para una reacción de hemaglutinación. A continuación, a cada uno de los pocillos se le añadió una cantidad igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7,0) y una cantidad igual de suspensión de células sanguíneas rhesus. Esta suspensión de células sanguíneas rhesus se preparó mediante suspensión de eritrocitos sanguíneos al 0,75 % en el mismo tipo de PBS. La mezcla obtenida se agitó por completo y, a continuación, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, se calculó el valor de infectividad en función de la presencia o ausencia de hemaglutinación.

50 Los resultados se muestran en la figura 6. Según la figura 6, el tiempo requerido para alcanzar el pico de replicación del virus en el procedimiento de cultivo vírico convencional usando suero bovino era aproximadamente 24 horas más rápido que en el procedimiento de la presente invención usando células MDCK-PS cultivadas en un medio que no contenía proteínas de origen animal. Sin embargo, no se observaron diferencias en términos de los valores de virus alcanzados entre el procedimiento de cultivo vírico máximo convencional usando suero bovino y el procedimiento de la presente invención usando células MDCK-PS cultivadas en un medio que no contenía proteínas de origen animal.

55

(Ejemplo 7: parvovirus canino de tipo 2)

Se aplicó aquí el mismo procedimiento que se describe en el ejemplo 4 con las siguientes cinco excepciones:

1) La cepa vírica usada fue una cepa antigénica MD 97-037 de tipo 2b;

2) Se diluyó una solución madre de virus de modo que la m.i. era de 0,05 y el virus se inoculó cuando las células se resuspendieron en el medio, como se describe en el ejemplo 3;

3) Las células usadas en el procedimiento de microvaloración para la medición de los valores de infectividad fueron células MDCK.

4) Según la presencia o ausencia de hemaglutinina generada en el sobrenadante contenido en cada pocillo de dilución, se determinó el punto final del valor de infectividad, como se describe en el ejemplo 6 y

5) El pH del PBS usado en la operación fue de pH 6,8 y la reacción se realizó a 4 °C.

Los resultados se muestran en la figura 7. A diferencia de las especies víricas de los ejemplos 4 a 7, el procedimiento de cultivo vírico convencional usando suero bovino llevó a un nivel superior de virus que el obtenido mediante el procedimiento de cultivo vírico usando células MDCK-PS cultivadas en un medio que no contenía proteínas de origen animal. Sin embargo, según la figura 7, un procedimiento de cultivo vírico usando células MDCK-PS cultivadas en medio que no contenía proteínas de origen animal también mostró valores de infectividad vírica para su uso práctico.

En general, es sabido con respecto a parvovirus que, cuando las células hospedadoras se dividen y crecen activamente, también aumenta el nivel de virus generado. Esto es porque el parvovirus no tiene ácido nucleico sintetas necesaria para la replicación del ADN vírico y este virus utiliza la ADN polimerasa de las células hospedadoras infectadas por este. En el caso de parvovirus, cuando las células hospedadoras se dividen y crecen activamente, la cantidad de ADN polimerasa también aumenta y se promueve de ese modo la replicación. En el procedimiento de digestión y dispersión de las células infectadas por el virus con tripsina y después el subcultivo de las células en medio nuevo, como se realizó en el ejemplo 3, la proporción de células infectadas por virus aumenta en cada pase. Por tanto, mediante este subcultivo de las células, las células hospedadoras también se dividen y, preferiblemente, el entorno cambia a otro de replicación vírica más eficaz. Como resultado, se considera que se genera un nivel de virus más alto a una determinada cantidad de medio. Por otro lado, como en el ejemplo actual, en caso de que el crecimiento celular tenga un determinado límite en un incubador (en concreto, el área al que está limitada la adherencia y el crecimiento de las células) después de que se haya permitido el contacto con el virus y se hayan infectado con el mismo, se considera que la generación de virus está directamente limitada, dependiendo de la velocidad de crecimiento o de la densidad de las células hospedadoras. Para potenciar la capacidad de replicación celular (valor de infectividad), puede modificarse el procedimiento de crecimiento del virus alterando la densidad celular, el nivel de virus infectante, el pase de las células infectadas, etc.

(Ejemplo 8: procedimiento de crioconservación simple de células cultivadas en medio sin suero)

Se preparó un medio utilizado en la congelación de células añadiendo DMSO al 10 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; n.º de catálogo 043-07216) al medio RPMI/PS. Las células MDCK-PS, que se habían subcultivado en medio RPMI/PS hasta alcanzar el pase 44, se resuspendieron en el medio preparado, dando lugar a una concentración de 10^6 /ml o superior. A continuación, se dispensaron 1,8 ml de la suspensión en un vial de crioconservación. Se encontró que el número exacto de células era de $6,5 \times 10^6$ /vial. Este vial se colocó en un congelador de células simple «BICELL (nombre comercial)» (Nihon Freezer Co., Ltd.) que se había enfriado y, a continuación, se congelaron en un congelador de -80 °C durante la noche. Posteriormente las células congeladas se transfirieron a nitrógeno líquido (fase líquida).

Cuarenta y ocho horas después, para confirmar el estado de crioconservación, se retiraron las células congeladas del nitrógeno líquido según los procedimientos habituales y las células se descongelaron inmediatamente en agua caliente a aproximadamente 40 °C. Posteriormente, las células descongeladas se diluyeron y resuspendieron en 10 ml de medio RPMI/PS y las células se recuperaron mediante centrifugación a baja velocidad. El sedimento celular se resuspendió en 7,5 ml de medio RPMI/PS y, a continuación la suspensión se colocó en una botella de cultivo de 25 cm². El cultivo se inició a 37 °C.

A día 3 de cultivo se había formado una capa de células. A día 5, las células se subcultivaron con un volumen de medio nuevo 4 veces el volumen previo de medio. Después de tres días de subcultivo, las células subcultivadas también formaban una capa de células. Hasta donde se observó al menos al microscopio, no se observaron efectos adversos derivados de este procedimiento de congelación. A continuación, podría llevarse a cabo el subcultivo como en el caso de células no congeladas. A partir de estos resultados se confirmó que el medio RPMI/PS con DMSO al 10 % podría ser eficaz si se usaba en la congelación de las células MDCK-PS de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de células, en la que la cepa incluye una cepa de células depositada con el número de acceso FERM BP-10225.
- 5 2. Un procedimiento *in vitro* de producción de un virus, que comprende: infectar la cepa de células según la reivindicación 1 con un virus y cultivar la cepa de células infectada para que el virus se replique.
3. El procedimiento de producción de un virus según la reivindicación 2, en el que el medio utilizado para el cultivo de la cepa de células infectada comprende medio RPMI 1640 y una peptona derivada de soja pero no comprende componentes de origen animal.
- 10 4. El procedimiento de producción de un virus según la reivindicación 2, en el que el cultivo de la cepa de células infectada se realiza mediante un procedimiento de cultivo en suspensión.
5. El procedimiento de producción de un virus según la reivindicación 2, en el que el virus se selecciona entre el grupo compuesto por *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Flaviviridae*, *Caliciviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae* y *Parvoviridae*.
- 15 6. El procedimiento de producción de un virus según la reivindicación 2, en el que el virus se selecciona entre el grupo compuesto por el virus del moquillo canino, virus del sarampión, virus de la parainfluenza canina, virus SV5, virus de la gripe, virus de la rabia, virus de la encefalitis japonesa, calicivirus canino, adenovirus caninos de tipo 1 y tipo 2, adenovirus humano, herpesvirus canino y parvovirus caninos de tipo 1 y tipo 2.

FIG. 1

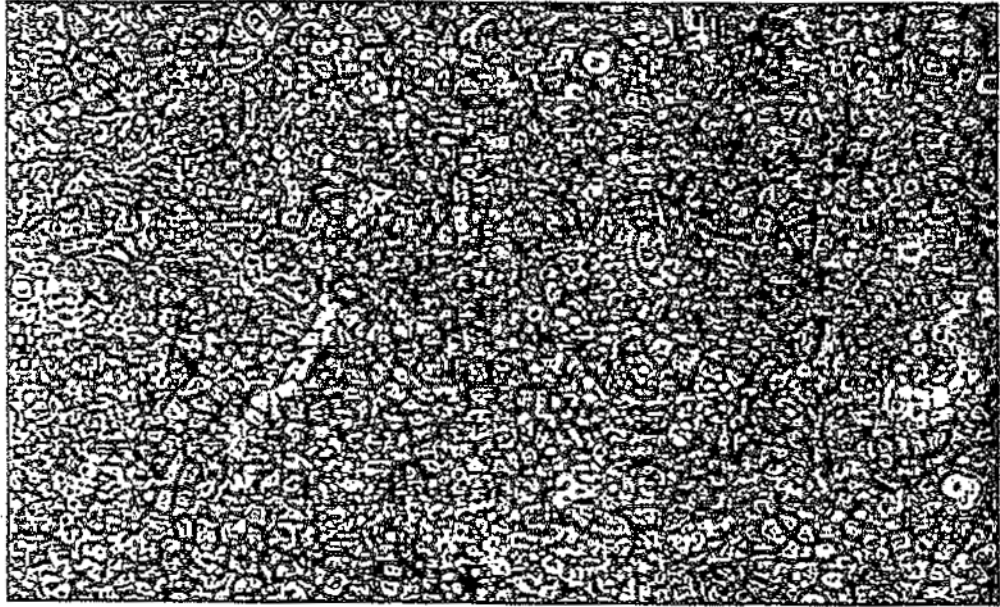


FIG. 2

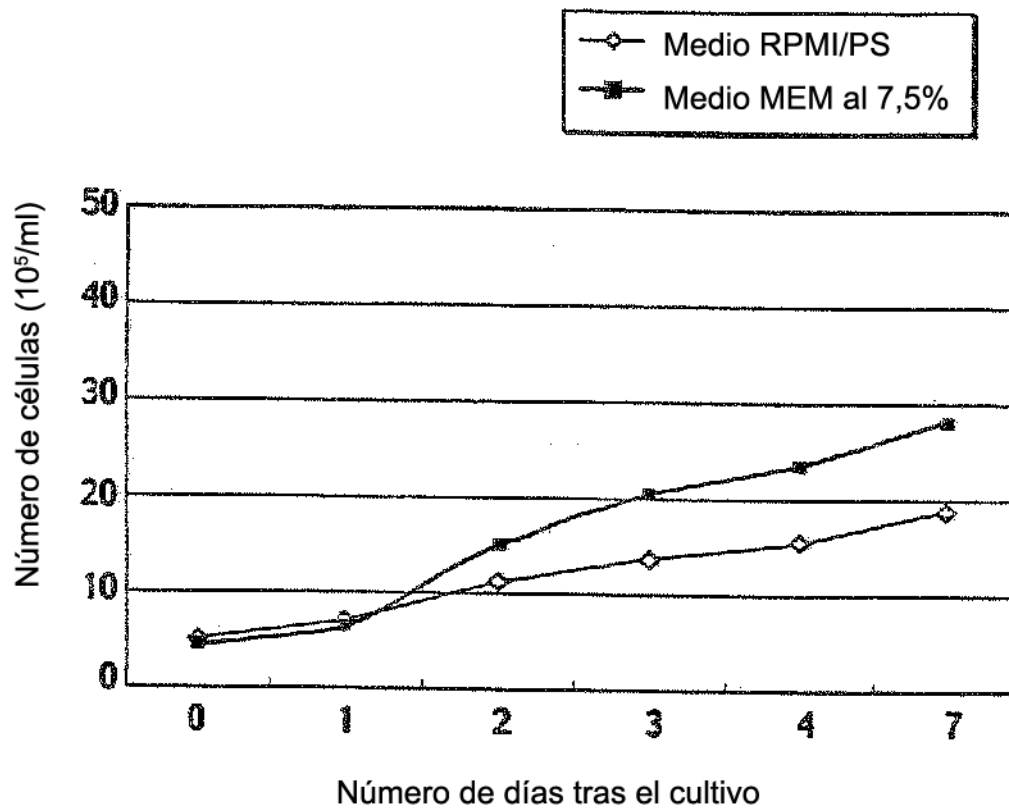


FIG. 3

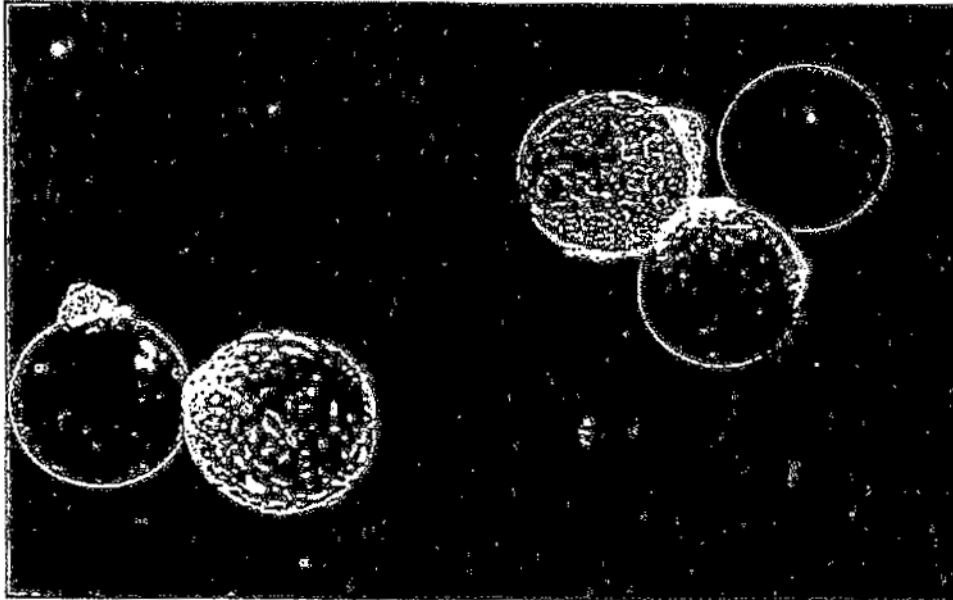


FIG. 4

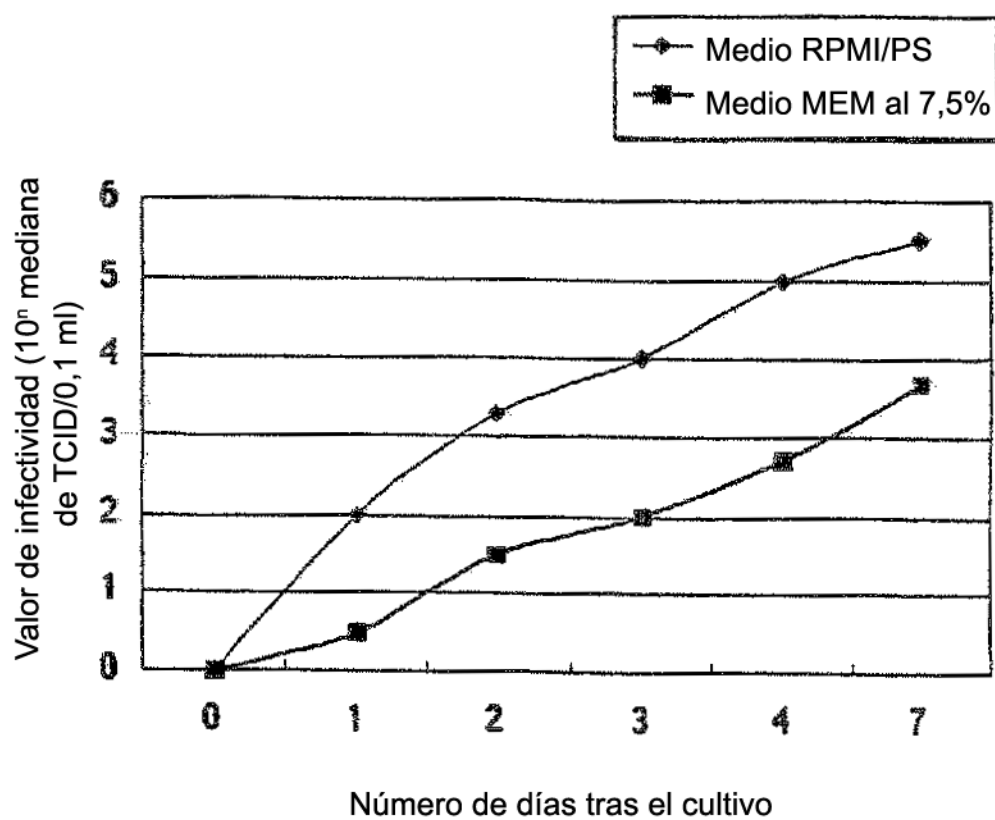


FIG. 5

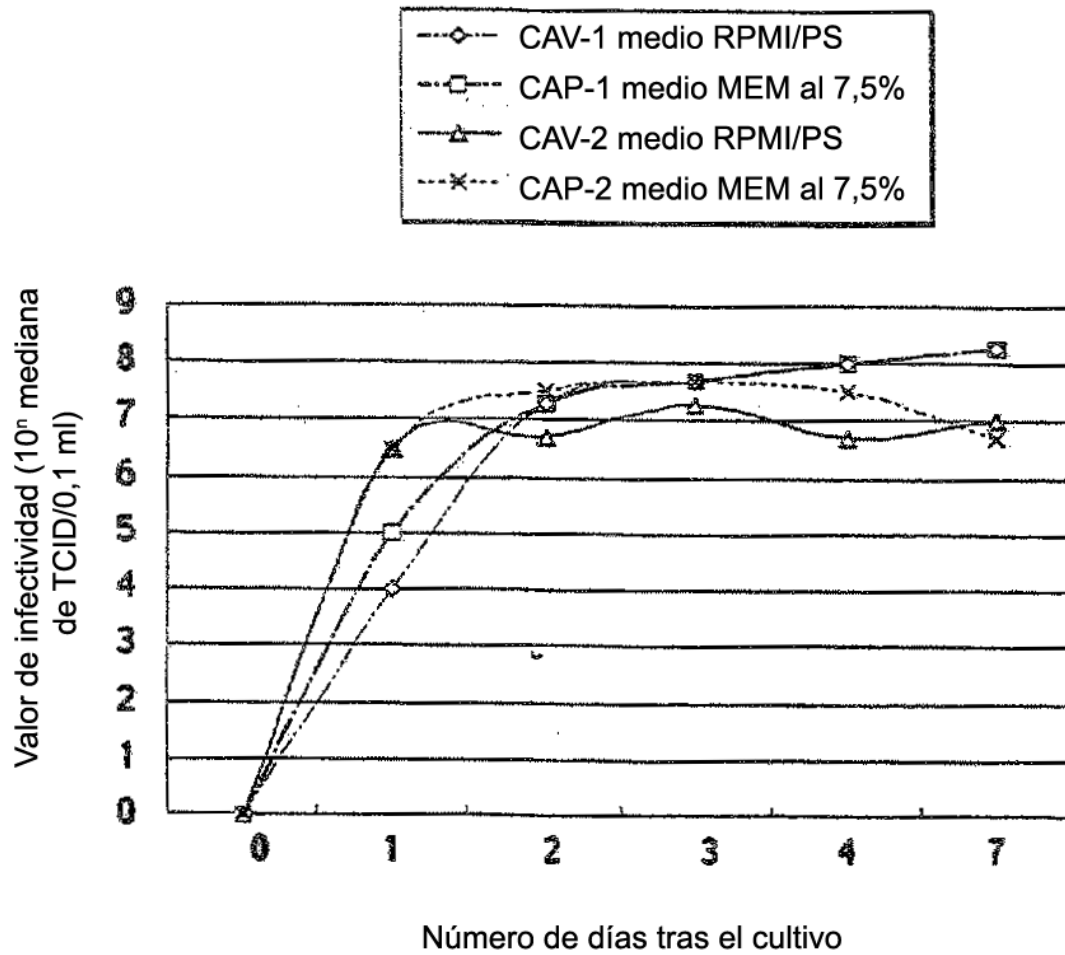


FIG. 6

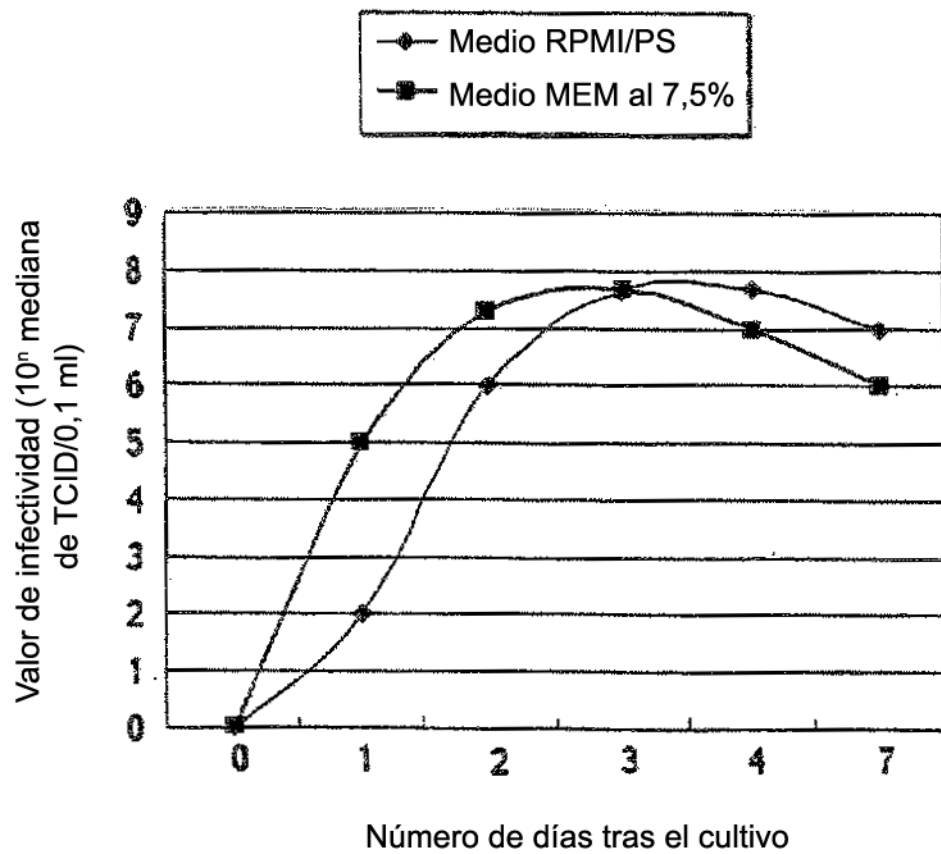


FIG. 7

