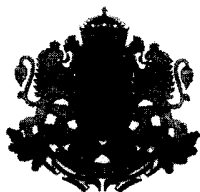


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 108315A

(51) C12N 5/00

C12Q 1/70

A61K 39/12

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 108315

(22) Заявено на 05.11.2003

(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 290096 (32) 10.05.2001 (33) US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 3 | 31.03.2005

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №
на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):

WYETH LLC , . , 07940 MADISON , FIVE
GIRALDA FARMS NEW JERSEY (US) ;

(72) Изобретател(и):

THOMAS , Anne C . , 03867 Rochester
NEW HAMPSHIRE (US) ; NG , Terry K . ,
50501 Fort Dodge IOWA (US) ;

(74) Представител по индустриална
собственост:

Румяна Стефанова Слабова , 1124 София ,
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № на РСТ заявка:

PCT/ US2002 / 014271 , 03.05.2002

(87) № и дата на РСТ публикация:

WO2002 / 091994 , 21.11.2002

**(54) СЪСТАВ И МЕТОД ЗА ПОВИШАВАНЕ НА КЛЕТЪЧНАТА ГЪСТОТА В
КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ, ИНФЕКТИРАНИ С LENTIVIRUS**

(57) Изобретението се отнася до състав и метод за усилване на клетъчния растеж и повишаване гъстотата на клетъчни култури, съдържащи инфектирани с лентивирус клетки гостоприемници. Към културата се добавя подходящо количество антибиотик за разрушаване на вредни бактерии. A composition and method for enhancing cell growth and increasing the density of cell cultures containing lentivirus-infected host cells comprises adding a suitable quantity of an antibiotic to the culture to destroy harmful bacteria.

55 претенции , 0

BG 108315A

СЪСТАВ И МЕТОД ЗА ПОВИШЕНИЕ НА КЛЕТЪЧНАТА ГЪСТОТА В КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ ИНФЕКТИРАНИ С LENTIVIRUS

2675/03-PC

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Настоящото изобретение се отнася за нови клетъчни култури. По-специално, изобретението е насочено към нови клетъчни култури, инфектирани с лентивируси, като feline immunodeficiency virus (FIV) (котешки вирус на имунна недостатъчност), който съдържа един подходящ антибиотик, за увеличаване на клетъчната гъстота и повишаване растежа на културата. Изобретението се отнася също за нови методи за повишение гъстотата на клетъчни култури, като се използват някои антибиотици.

ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Лентивирусите съставляват един клас вируси, които могат да причиняват различни заболявания както у човека, така и у животни. Тези заболявания често се предшествуват от няколко месеца или дори години на инкубационен период. Например, патологичните промени свързани със СПИН са предизвикани от човешки вируси на имунна недостатъчност (human immunodeficiency viruses- HIV) и са резултат от хронично прогресиране на заболяването, често предизвиквайки кахексия и смърт на пациента, няколко години след заразяването.

Лентивирусите също са свързани с различни патологии при такива видове като човекоподобни маймуни и маймуни, както и домашни животни, като коне, магарета, говеда, кози и овце. Измежду тях, equine infectious anemia (EIA) (конска инфекциозна анемия) е характеризирана като най-важното инфекциозно

заболяване при конете, което се появява навсякъде по света. Лентивируси при овцете са относително обичайни патогени в повечето части на света и включват Maedi-visna вирус и вируса на прогресираща пневмония, като два преобладаващи типа. Говеждият вирус на имунна недостатъчност е важен причинител на заболявания у говедата.

Други вируси са витални индикатори за патология у животни, като при котките. Котешкият вирус на имунна недостатъчност, структурно сходен с HIV, може да предизвика смърт у домашни котки. Лекари, ветеринарни лекари и изследователи посвещават все повече време и ресурси за профилактика и лечение на заболявания, предизвикани от тези вируси.

Част от проучването включва растящи тъканни култури, съдържащи клетки, например лимфоцити, които са инфектирани с един или повече от известните лентивируси. Лимфоцитни култури или адхерентни епитело-подобни клетки като котешки бъбречни клетъчни култури, могат да бъдат развивани в Т-съдчета, ролерни шишета, спинер шишета и биореактори, използвайки среди като Minimal Essential Media (MEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI), Dulbecco's MEM (DMEM) и AIM V (Gibco/LTI, Grand Island, NY) допълнени с говежди серум до около 20% и до около 5% говежди серум албумин (BSA). Едромасабни култури могат да бъдат развивани в големи спинери, ферментор и биореактори, в присъствието на защитен химикал срещу накъсване, уплътнител, емулгатори или съединения като метилцелулоза, карбоксиметил целулоза и повърхностно активни вещества (сърфактанти) като Pluronic сериите, например PLURONIC®F-68, произведен от BASF Corporation of Wyandotte, Michigan.

При подържане на култури съдържащи вируси, изследователите се стремят да разрушат вредни бактерии в културата, така че клетките съдържащи вируса да могат да растат и да се размножават. В същото време, една придружаваща цел е да са максимализира растежа на клетъчната култура. За улесняване на растежа и разрушаване на бактериите, е приета практиката да се добавят антибиотици, обикновено комбинация от такива, към клетъчната култура. Например, U.S. 5,958,423 представя една клетъчна култура на Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) клетки, при които са използвани до 30 $\mu\text{g/ml}$ polymixin B и neomycin, и до 2.5 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B.

Това което понастоящем е необходимо в тази област, са нови комбинации от клетъчни култури, съдържащи клетки инфектирани с лентивируси. Особено необходими са нови клетъчни култури, при които клетъчният растеж може да бъде максимализиран в присъствието на вредни организми, като едновременно с това бактериите могат да бъдат минимализирани. Необходими са също нови методи за развитие на клетъчни култури, при които тяхната гъстота може да бъде повишена, като се повиши тъканния растеж. Освен това са необходими нови вещества като добавки, които могат да оптимизират гъстотата на клетъчните култури, като правят възможен и усилват растежа на клетките, които са включени в културата.

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

В едно изпълнение, настоящето изобретение е насочено към клетъчна култура, съдържаща най-малко една лентивирус-инфектирана клетка и усилващо растежа количество от един антибиотик, състоящ се главно от неомицин или негова биологично съвместима сол.

Изобретението е насочено също към клетъчна култура, която съдържа най-малко една лентивирус-инфектирана клетка гостоприемник и неомицин или негова биологично съвместима сол, така че неомицинът присъства главно без друг антибиотик в количество, което е ефективно за инхибиране на бактериалния растеж и повишаване гъстотата на клетъчната култура.

Като част от изобретението е предоставен е също метод за повишаване гъстотата на клетъчна култура, в която клетките са инфектирани с лентивирус, която включва добавка на антибиотик, състоящ се главно от неомицин или негова биологично приемлива сол, към клетъчната култура.

Изобретението предоставя също състав, подходящ за добавка към клетъчна култура, инфектирана с лентивирус. Съставът съдържа повишаващо клетъчната гъстота количество от антибиотик, състоящ се главно от неомицин или негова биологична сол, заедно с най-малко една добавка за клетъчна култура. Добавката за клетъчната култура е предпочитано серум от говежди произход.

Горните и други особености и предимства на изобретението ще станат по-видими от подробното описание на предпочитаните изпълнения на изобретението, представени по-долу.

ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ И ПРЕДПОЧИТАНИ ИЗПЪЛНЕНИЯ

Настоящото изобретение се отнася за клетъчни култури. Предвидените за използване тук, са такива, които са подходящи за изследване и изучаване, и които са способни да прикрепят лентивируси и да позволяват техния растеж. Такива клетъчни култури следователно ще включват лимфоцити и други типове клетки, които могат да бъдат инфектирани с един или повече лентивируси. Други подходящи клетъчни култури могат да включват

котешки лимфоцити, фибробласто-подобни и епитело-подобни клетки, като котешки бъбречни клетки, Crandell Feline Kidney или CRFK клетки, FL6, FL72 и FL74 (Feline Lymphocyte) (котешки лимфоцити) клетки. Т-клетъчни лимфоцити могат да бъдат предпочитани за приложение тук, както и IL-2 независими FetJ и FL6 лимфоцити.

Терминът "лентивируси" е използван тук да обхваща всички познати и такива, които ще бъдат открити лентивируси, включвайки без ограничения вируса на конска инфекциозна анемия, Maedi-visna вирус, вирус на прогресивна пневмония, кози артритен-енцефалитен вирус, котешки вирус на имунна недостатъчност (FIV), маймунски вирус на имунна недостатъчност, инфектиращ такива видове като макаки и Африкански маймуни, и песоглавци, и човешки вирус на имунна недостатъчност (HIV) Типове I и II. Терминът "лентивируси" включва също аналози, производни и пептидни последователности на всеки от по-горните. Предпочитани за приложение са не-човешките лентивируси и по-специално, котешкия вирус на имунна недостатъчност (FIV).

Клетъчните култури на изобретението могат да бъдат култивирани като се използват методи, които са известни в тази област. Например, клетките гостоприемници, като лимфоцити, могат да бъдат хронично инфектирани с един или повече от горните лентивируси, като се използват приети процедури, и след това да бъдат размножавани в подходяща среда. Предпочитано, средата е главно течна среда. Дори по-предпочитано, средата първоначално е предоставена като главно безсерумна среда. Клетките гостоприемници могат например да бъдат суспендирани в течна среда. Клетъчната гъстота на култивираната клетъчна култура може да варира съответно за дадения вид клетки гостоприемници, средата и растежната камера, но може да бъде в обсега на около

1×10^4 до около 1×10^6 подходящи клетки за милилитър (ml) клетъчна култура (включително среда). По-предпочитано, клетъчната гъстота е около 2×10^5 до около 5×10^5 клетки за милилитър.

Като следваща част от изобретението, клетъчните култури съдържат подходящ антибиотик, който е ефективен за инхибиране растежа на бактерии в културата, като в същото време повишава растежа на клетките, при което се повишава гъстотата на клетъчната култура. Предпочитан за приложение тук е антибиотика неомицин, който може да включва всички биологично съвместими соли и техни производни, като неомицин сулфат. Като "биологично съвместим" се счита, че неговата сол или производно няма съществени неблагоприятни биологични ефекти върху клетката.

Количеството неомицин включено в клетъчната култура може да варира, съответно на нуждите на специалиста в тази област, но обикновено включва количество, което ще повиши гъстотата на клетъчната култура. Обикновено се предпочита едно количество неомицин в рамките от около 5 микрограма/ml от клетъчна култура до около 60 микрограма/ml от клетъчна култура (включително среда). В по-предпочитано изпълнение, неомицин е включен в клетъчната култура в количество най-малко 10 микрограма/ml и по-предпочитано най-малко около 20 микрограма/ml. Дори по-предпочитано, количеството неомицин може да бъде от около 30 микрограма/ml до 60 микрограма/ml.

Предпочита се неомицин да се използва за повишаване растежа на клетъчна култура и гъстотата, без да се включват други такива антибиотици като например полимиксин В и гентамицин. Полимиксин В може да бъде производно от полимиксин В₁ и В₂, които се получават от растежа на *Bacillus polymyxa* (Prazmowski) Migula (Fam. Bacillaceae). Понастоящем е намерено, че включвайки

двата - неомицин и полимиксин В в клетъчна култура може, в много случаи, да предизвика значително по-малко повишение на клетъчната гъстота, в сравнение с прилагането на неомицин самостоятелно.

Други компоненти на клетъчната култура на изобретението, могат да включват обикновено най-малко една добавка за култура. Културелната добавка може да бъде говеждо производно, като от говежди серум и може да включва говежди серум и говежди серум албумин (BSA). Културелната добавка може да включена в количества от около 0.1 до около 10% обемни от крайната клетъчна култура.

Използването на неомицин, както тук е описано, може да повиши клетъчната гъстота с най-малко 20% и по-предпочитано с най-малко около 33 1/3% повече, в сравнение с идентична клетъчна култура с лентивирус-инфектирани клетки гостоприемници, които не съдържат никакъв антибиотик. Клетъчната гъстота може да бъде определена с приети методи, включително изключване на трипаново синьо с хемоцитометър.

Следващият пример е предоставен за да илюстрира един предпочитан аспект на изобретението, но не трябва да бъде разглеждан като ограничаващ неговия обхват.

ПРИМЕР

В този пример, Fet-J клетки, хронично инфектирани с котешки имунодефицитен вирус (FIV), са развивани в безсерумна среда, като модифицирана DMEM:F12 среда или AIM V среда, допълнена с 2.5 mg/ml на ALBUMAX®, която е производна на BSA. Клетките са развивани в суспензия в Ерленмаерови колби на ротационна клатачна машина при 150 об./мин. на 37°C. Клетките са разсейвани при клетъчна плътност 3×10^5 жизнеспособни клетки/ ml.

Клетъчните гъстоти са определяни с изключване на трипаново синьо на хемоцитометър. Определяне на Gr 120 експресия е правено с ензимно свързан имуносорбентен тест (ELISA), като са използвани анти-FIV Gr 120 моноклонални антитела. Тестираните антибиотици за FIV добавка, включват гентамицин, неомицин и полимиксин В. Медиите са допълнени със съответни антибиотици при концентрация 30 микрограма/ml. Клетъчните гъстоти са определени на 24 часова база, с метод описан по-горе. Резултатите са представени в Таблица 1.

Таблица 1

Експериментална Група	Антибиотик концент. (микрограми/ ml)	Ден 0 (клетки/ml)	Ден 1	Ден 2	Ден 3	Ден 4	Ден 5
Контрола	N/A	3.0×10^5	3.6×10^5	5.5×10^5	1.0×10^6	1.2×10^6	1.2×10^6
Гентамицин	30 µg/ml	3.0×10^5	2.4×10^5	3.2×10^5	6.5×10^5	1.1×10^6	1.1×10^6
Неомицин	30 µg/ml	3.0×10^5	4.7×10^5	7.8×10^5	1.2×10^6	1.3×10^6	1.8×10^6
Полимиксин В	30 µg/ml	3.0×10^5	2.9×10^5	4.6×10^5	5.8×10^5	6.6×10^5	6.6×10^5
Полимиксин В + Неомицин	30 µg/ml	3.0×10^5	2.9×10^5	5.0×10^5	7.0×10^5	7.7×10^5	7.8×10^5

Резултатите от Таблица 1 показват, че суспензиите от клетъчни култури, допълнени с неомицин, имат най-добър общ растеж и повишение на клетъчните гъстоти. Гентамицин няма значим ефект, с дневни клетъчни гъстоти значително еднакви с тези на контролите. Култури с добавен Полимиксин В или неомицин, заедно с полимиксин В, потискат клетъчната гъстота в сравнение с културите, в които няма антибиотик и са значително по-малко гъсти в сравнение с тези, където е използван само неомицин.

Въпреки че изобретението е описано с цитати за дадени изпълнения, трябва да се отчита, че могат да бъдат направени

много промени и модификации без да се излиза от обхвата и духа на изобретението. Съответно с това, изобретението не трябва да бъде разглеждано като ограничено от горното описание, но то е само ограничено от обхвата на приложените претенции.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Клетъчна култура, съдържаща най-малко една лентивирус-инфектирана клетка гостоприемник и усилващо растежа количество от антибиотик, състоящо се от неомицин или негова биологично активна сол или негово производно.
2. Клетъчна култура, съгласно претенция 1, където споменатият неомицин присъства в количество до около 60 микрограма/ml от споменатата култура.
3. Клетъчна култура, съгласно претенция 1, където споменатата клетка гостоприемник е инфектирана с най-малко един лентивирус, избран от група състояща се от вирус на конска инфекциозна анемия, Maedi-visna вирус, вирус на прогресивна пневмония, кози артритно-енцефалитен вирус, котешки вирус на имунна недостатъчност (FIV), маймунски вирус на имунна недостатъчност и вирус на човешка имунна недостатъчност (HIV) Типове I и II.
4. Клетъчна култура, съгласно претенция 3, където споменатият вирус е избран от групата състояща се от котешки вирус на имунна недостатъчност (FIV), маймунски вирус на имунна недостатъчност и човешки вирус на имунна недостатъчност (HIV) Типове I и II.
5. Клетъчна култура съгласно претенция 4, където споменатият вирус е котешки вирус на имунна недостатъчност (FIV).

6. Клетъчна култура съгласно претенция 1, където споменатата клетка гостоприемник е най-малко един член, избран от групата състояща се от лимфоцити.
7. Клетъчна култура съгласно претенция 6, където споменатите лимфоцити са Т-клетъчни лимфоцити.
8. Клетъчна култура съгласно претенция 7, където споменатите лимфоцити са избрани от групата състояща се от IL-2 независими FetJ и FL6 лимфоцити.
9. Клетъчна култура съгласно претенция 1, където споменатият неомицин присъства в количество от около 5 микрограма/ml.
10. Клетъчна култура съгласно претенция 9, където споменатото количество неомицин е ефективно за повишаване гъстотата на споменатата клетъчна култура.
11. Клетъчна култура съгласно претенция 10, където споменатото количество неомицин е ефективно за инхибиране бактериален растеж в споменатата клетъчна култура.
12. Клетъчна култура съгласно претенция 11, където споменатият неомицин присъства в количество от около 20 микрограма/ml.
13. Клетъчна култура съгласно претенция 12, където споменатият неомицин присъства в количество от около 30 микрограма/ml.
14. Клетъчна култура съгласно претенция 5, където споменатата клетъчна култура присъства в безсерумна среда.

15. Клетъчна култура съгласно претенция 12, където клетките на споменатата култура са разсети при плътност в порядъка от около 1×10^5 до около 5×10^5 жизнеспособни клетки/ml клетъчна култура.
16. Клетъчна култура съгласно претенция 15, където клетките на споменатата култура са разсети при плътност от около 3×10^5 жизнеспособни клетки/ml.
17. Клетъчна култура, съдържаща най-малко една лентивирус-инфектирана клетка гостоприемник и неомидин, където споменатият неомидин присъства главно без друг антибиотик в количество, което е ефективно за инхибиране бактериален растеж и повишаване гъстотата на споменатата клетъчна култура.
18. Клетъчна култура съгласно претенция 17, където споменатата клетъчна култура предимно не съдържа гентамицин или полимиксин В.
19. Клетъчна култура съгласно претенция 17, където споменатият неомидин присъства в споменатата клетъчна култура в количество от порядъка на около 5 микрограма/ml до около 60 микрограма/ml на споменатата клетъчна култура.
20. Клетъчна култура съгласно претенция 19, където споменатият неомидин присъства в споменатата клетъчна култура в количество най-малко 20 микрограма/ml.

21. Клетъчна култура съгласно претенция 20, където споменатият неомицин присъства в споменатата клетъчна култура в количество най-малко около 30 микрограма/ml.
22. Клетъчна култура съгласно претенция 17, където споменатият лентивирус е най-малко един член, избран от групата състояща се от конски вирус на инфекциозна анемия, Maedi-visna вирус, вирус на прогресивна пневмония, кози артритен-енцефалитен вирус, котешки вирус на имунна недостатъчност (FIV), маймунски вирус на имунна недостатъчност и човешки вирус на имунна недостатъчност (HIV) Типове I и II.
23. Клетъчна култура съгласно претенция 22, където споменатият вирус е избран от групата състояща се от котешки вирус на имунна недостатъчност (FIV), маймунски вирус на имунна недостатъчност и човешки вирус на имунна недостатъчност (HIV) Типове I и II.
24. Клетъчна култура съгласно претенция 23, където споменатият вирус е котешки вирус на имунна недостатъчност (FIV).
25. Клетъчна култура съгласно претенция 17, където споменатата клетка гостоприемник е най-малко един член, избран от групата състояща се от лимфоцити.
26. Клетъчна култура съгласно претенция 25, където споменатата клетка гостоприемник е Т-лимфоцит.

27. Клетъчна култура съгласно претенция 26, където споменатата клетка гостоприемник е най-малко един член, избран от групата състояща се от IL-2 независими FetJ и FL6 T- лимфоцити.
28. Клетъчна култура съгласно претенция 17, където клетките на споменатата клетъчна култура са разсети при гъстота от порядъка на около 1×10^5 до около 5×10^5 жизнеспособни клетки/ml.
29. Клетъчна култура съгласно претенция 28, където клетките на споменатата клетъчна култура са разсети при плътност от около 3×10^5 жизнеспособни клетки/ml.
30. Метод за повишаване гъстотата на клетъчна култура, при който клетките в нея са инфектирани с лентивирус, който включва добавяне към споменатата клетъчна култура на антибиотик състоящ се главно от неомицин.
31. Метод съгласно претенция 30, където споменатият неомицин е добавен в количество от около 5 микрограма/ml до около 60 микрограма/ml от клетъчната култура.
32. Метод съгласно претенция 31, където споменатият неомицин е добавен в количество, което е ефективно за инхибиране на бактериален растеж в споменатата клетъчна култура.
33. Метод съгласно претенция 32, където споменатият неомицин е добавен в количество най-малко около 20 микрограма/ml.

34. Метод съгласно претенция 33, където споменатият неомицин е добавен в количество най-малко около 30 микрограма/ml.
35. Метод съгласно претенция 30, който освен това включва разсяване на споменатата клетъчна култура до гъстота от порядъка на около 1×10^5 до около 5×10^5 жизнеспособни клетки/ml.
36. Метод съгласно претенция 35, при който споменатата клетъчна култура е разсята при плътност от около 3×10^5 жизнеспособни клетки/ml.
37. Метод съгласно претенция 30, включващ още добавяне на най-малко една културелна добавка към споменатата клетъчна култура.
38. Метод съгласно претенция 37, където споменатата културелна добавка е говежди серум албумин (BSA).
39. Метод съгласно претенция 30, където споменатият неомицин е ефективен за повишаване клетъчната гъстота с най-малко около 20%.
40. Метод съгласно претенция 39, където споменатият неомицин е ефективен за повишаване клетъчната гъстота с най-малко около 33 1/3%.
41. Метод съгласно претенция 40, където споменатият неомицин е ефективен за повишаване на клетъчната гъстота с най-малко около 50%.

42. Метод за култивиране на клетъчна култура с лентивирус-инфектирани клетки, който включва добавка на неомицин, предимно без полимиксин В или гентамицин към споменатата култура.
43. Метод съгласно претенция 42, където споменатият неомицин е добавен в количество в рамките на около 5 микрограма/ml до около 60 микрограма/ml от клетъчната култура.
44. Метод съгласно претенция 43, където споменатото количество неомицин е ефективно за инхибиране бактериален растеж в споменатата клетъчна култура.
45. Метод съгласно претенция 43, където споменатото количество неомицин е най-малко около 20 микрограма/ml от клетъчната култура.
46. Метод съгласно претенция 45, където споменатото количество неомицин е най-малко около 30 микрограма/ml от клетъчната култура.
47. Метод съгласно претенция 42, включващ още добавяне на ефективно количество от най-малко една добавка за клетъчна култура към споменатата клетъчна култура.
48. Метод съгласно претенция 47, където споменатата добавка за клетъчна култура е говежди серум албумин (BSA).

49. Метод съгласно претенция 42, където споменатият лентивирус е най-малко един член, избран от групата състояща се от конски вирус на инфекциозна анемия, Maedi-visna вирус, вирус на прогресивна пневмония, кози артритен-енцефалитен вирус, котешки вирус на имунна недостатъчност (FIV), маймунски вирус на имунна недостатъчност и човешки вирус на имунна недостатъчност (HIV) Типове I и II и още където споменатата клетъчна култура съдържа лимфоцитни клетки.
50. Метод съгласно претенция 49, където споменатият вирус е избран от групата състояща се от котешки вирус на имунна недостатъчност (FIV), маймунски вирус на имунна недостатъчност и човешки вирус на имунна недостатъчност (HIV) Типове I и II.
51. Състав подходящ за клетъчна култура, инфектирана с лентивирус, който включва:
- а) повишаващо клетъчната гъстота количество антибиотик, състоящ се главно от неомицин; и
 - б) най-малко една добавка за клетъчна култура.
52. Състав съгласно претенция 51, където споменатото количество е в рамките на около 5 микрограма/ml до около 60 микрограма/ml от споменатата клетъчна култура.
53. Състав съгласно претенция 52, където споменатата добавка за клетъчна култура е говежди серум.

54. Състав съгласно претенция 53, където споменатата добавка за клетъчна култура е говежди серум албумин.

55. Състав за клетъчна култура, съдържащ

а) от около 1×10^5 до около 5×10^5 жизнеспособни клетки/ml от Fet-J клетки, хронично инфектирани с котешки вирус на имунна недостатъчност;

б) най-малко около 10 микрограма/ml антибиотик, състоящ се главно от неомицин или негова биологично съвместима сол или производно.