

AÑO 1950

Expediente núm. \_\_\_\_\_



246341

# REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE INVENCIÓN

## MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una PATENTE DE INVENCIÓN por VEINTIS años, en España

a favor de

RESEARCH CORPORATION, de nacionalidad  
norteamericana domiciliado en 405 Lexington Avenue,  
calle de Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América.

por:

UN MÉTODO DE PROPAGACIÓN DE CELULAS DE MAMÍFEROS

Nº 11877

Agente Sr. ELZABURO

1959 2 4634 f



MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E      D E      I N V E N C I O N

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de RESEARCH CORPORATION, entidad norteamericana, establecida en 405 Lexington Avenue, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"UN METODO DE PROPAGACION DE CELULAS DE MAMIFEROS".

---

La invención se refiere a la propagación de células de mamíferos.

Un objeto de la invención es proporcionar un método por el cual puedan propagarse células de mamíferos en gran escala para la producción económica de secreciones celulares y metabolitos fisiológicamente activos, o como medio de cultivo para agentes infecciones, tales como virus.

La propagación de células de mamíferos se ha efectuado, típicamente, haciendo desarrollar las células en una monocapa sobre las superficies internas de frascos y botellas que conte-



1959

2 46341

nían un medio nutriente adecuado. Este método de propagación es conveniente para investigaciones de laboratorio y tiene la ventaja de que facilita el cambio frecuente de medio nutriente que, hasta ahora, era necesario para mantener la proliferación celular activa en tales cultivos. Sin embargo, este método de cultivo es inadecuado para la propagación de líneas de células en gran escala. Además, el cambio frecuente de medio nutriente resulta caro tanto en lo que se refiere a mano de obra como a materiales.

Hemos encontrado que pueden propagarse de modo continuo células de mamíferos manteniendo índices sostenidos de proliferación en suspensiones voluminosas agitadas de células discretas en medio nutriente sin ninguna limitación aparente del tamaño de las vasijas de cultivo y sin que sea necesario el cambio del medio de cultivo durante periodos de tiempo prolongados, añadiendo al medio de cultivo, de modo continuo o intermitente, el aminoácido L-arginina, o el aminoácido estrechamente relacionado L-citrulina, preferiblemente a una dosis diaria igual, por lo menos, a la cantidad de L-arginina que hay en el medio de cultivo inicial. Aunque el aminoácido añadido puede introducirse en el medio de cultivo continuamente a la dosis seleccionada, no es necesario la adición continua, y el aminoácido adicional puede suministrarse intermitentemente a periodos hasta de 2 a 3 días.

Los datos preliminares indican que la arginina y la citrulina pueden reemplazarse por ácido aspártico, aunque puede presentarse un periodo de inducción o de demora en la velocidad de desarrollo, cuando se utiliza este último ácido.

La arginina, la citrulina o el ácido aspártico pueden añadirse al medio de cultivo bien sea solos o mezclados entre sí



2 4634 1

o con otros aminoácidos o sustancias nutrientes. Cuando se están propagando células para uso como medio de cultivo para un virus, por ejemplo, la adición de la arginina puede efectuarse ventajosamente retirando una parte alícuota del cultivo de células para uso y reemplazándola con un volumen equivalente del medio de cultivo original. Análogamente, cuando se están propagando células para secreciones o metabolitos útiles producidos durante el desarrollo celular, pueden separarse partes alícuotas del medio de cultivo que hay que elaborar en cuanto se refiere al contenido del producto celular deseado, y reemplazarlas por un volumen equivalente del medio de cultivo original. La adición periódica de arginina, citrulina, o ácido aspártico es útil también para reducir o eliminar los cambios del medio de cultivo en cultivos de capa superficial de células de mamíferos.

En general pueden utilizarse los medios de cultivo que hasta ahora se ha visto que eran adecuados para cultivo de tejidos y células de mamíferos. Tales medios de cultivo pueden contener típicamente los nutrientes conocidos de aminoácidos esenciales, sales minerales, vitaminas y carbohidratos, junto con un suero de mamíferos. Preferiblemente, se agregan al medio sustancias fungistáticas y bacteriostáticas para prevenir el desarrollo de microorganismos, siendo también ventajosa una pequeña proporción de metilcelulosa.

En la tabla siguiente se indica un medio adecuado, que es una modificación del de Eagle (Science 122, 501 (1955)).



246341

MEDIO DE CULTIVO

L-aminoácidos (gramos/litro)

	Arginina, HCl	0,021	Fenilalanina	0,016
	Cistina	0,012	Treonina	0,024
5	Histidina, HCl	0,008	Triptofano	0,004
	Isoleucina	0,026	Tirosina	0,018
	Leucina	0,026	Valina	0,024
	Lisina, HCl	0,026	Glutamina	0,300
	Metionina	0,008		

10

Vitamina (mg/litro)

Sales (gramos/litro)

	Biotina	1	NaCl	7,0
	Colina	1	KCl	0,4
	Acido fólico	1	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
15	Nicotinamida	1	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44
	Acido pantoténico	1		
	Piridoxal	1		
	Tiamina	1		
	Riboflavina	0,1		

20

	Glucosa	2,5 gramos/litro
	Rojo fenol	0,01 gramo/litro
	Metilcelulosa	1 gramos/litro
	Penicilina	100 unidades/mililitro
25	Estreptomicina	50 mcg/ml.
	Micostatina	30 unidades/ml.
	Suero de caballo	100 cc/litro

30

El cultivo de células de acuerdo con la presente invención puede realizarse en una vasija de cultivo adecuada para el desarrollo de tejido de mamíferos bajo condiciones asépticas y control



19 EN 6

2 4 6 3 4 1

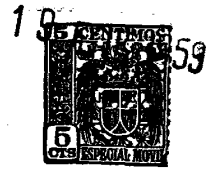
de temperatura. Se encuentran disponibles en el comercio muchas de estas vasijas.

5 Los inóculos para la propagación de células por el método de la invención pueden obtenerse bien sea a partir de cultivos en capa en vasijas de vidrio o bien de cultivos sumergidos agitados en pequeña escala. Los cultivos en capa se dispersan preferiblemente con 0,25% de tripsina y se lavan con medio de cultivo antes de la adición al cultivo sumergido.

10 A continuación se da un ejemplo del cultivo de células de fibroblasto de ratón cepa L de Earle et al. (J. Nat. Cancer Inst. 4, 165-212 (1943):

15 Se colocaron tres litros de suspensión de células cepa L que contenían  $4,9 \times 10^5$  células/ml, y desarrolladas en el medio de cultivo antes descrito, en una vasija de cultivo adecuada provista de agitador, y se añadieron tres litros de medio cultivo nuevo. El cultivo se mantenía a  $36-37^{\circ} \text{C}$ , por circulación de agua procedente de un baño a temperatura constante a través de la camisa de la vasija, y el cultivo se agitaba a una velocidad efectiva para mantener las células en suspensión sin que se formara espuma. Se hacía pasar continuamente una corriente de 20 aire a través de la vasija por encima del nivel de cultivo. Al cabo de cuatro días de desarrollo, la suspensión celular aproximadamente  $4,0 \times 10^5$  células/ml, y se agregaban otros seis litros más de medio cultivo. Se producían de este modo un incremento 25 constante en la población celular y se mantenía durante un periodo de 7 días por medio de tres adiciones de concentrados de aminoácidos de Eagle. Cada adición, a dos días de plazo, era igual a la cantidad original de los aminoácidos contenidos en el medio nuevo. Al final de este periodo, la concentración celular alcanzaba 30  $6,75 \times 10^5$  células/ml., lo que representa un incremento en

2 4634 1



las células totales desde  $1,47 \times 10^9$  hasta  $3,4 \times 10^9$  células en 12 litros de suspensión celular.

5 Se obtienen incrementos análogos en el contenido celular total, cuando se agrega una solución de clorhidrato de arginina solo al cultivo, en lugar del concentrado de aminoácido, siendo el contenido de arginina de dichas adiciones el mismo que el contenido de arginina concentrado de aminoácido.

10 Puede añadirse arginina o citrulina al cultivo a una dosis equivalente a la comprendida entre 20 y 200 microgramos, aproximadamente, por mililitro de medio de cultivo, por día, aunque, en general, las cantidades muy por encima de 20 microgramos por mililitro, por día no tienen justificación desde el punto de vista económico.

15 Mediante el método descrito anteriormente, las células pueden mantenerse en proliferación logarítmica activa durante periodos de 10 a 20 días, o más, sin reemplazamiento del medio de cultivo.

20 Además de las células de la cepa L descritas en el ejemplo precedente, se han propagado por el método de la invención las siguientes cepas de células de mamíferos:

Cepa HeLa, célula de tipo epitelial por Gay y col. a partir de un carcinoma cervical humano (Cáncer Research 12, 264-265 (1952));

25 Una cepa de célula conjuntiva humana aislada por Chang (Proc Soc. Exp. Biol. Med. 87, 440-443 (1954));

Una cepa antibiótica humana FL. de Fogh y col., (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94, 523-537 (1957));

Cepa ERK de riñón de conejo embrionario, de Sheffield y colaboradores (Brit. J. Exptl. Path. 38, 155-159 (1957));

30 Cepa L de fibroblasto de ratón, Earle y col. (J. Nat. Cancer Inst. 4 165-212 (1943));

Cepa R6K de riñón de conejo adulto, de Drew;

2 46341



Cepa del riñón de bovino, de Stewart Madin;

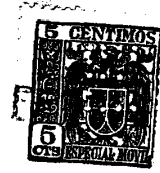
Cepa de riñón de porcino, de Stewart Madin;

5 Como ejemplo ilustrativo de la producción de metabolitos celulares fisiológicamente activos por el método de la invención, se propagó de la manera siguiente una línea de células aislada a partir de la glándula pituitaria anterior de un feto humano de siete meses;

10 Se trataron fragmentos de tejido cuidadosamente separados de la porción anterior de la glándula, con una solución acuosa al 0,25 % de tripsina, con agitación moderada, para obtener una liberación sustancial de células individuales en el líquido. Las células dispersadas se recogían por centrifugación, se lavaban y se plantaban en botellas Blake o Roux en medio de cultivo constituido por mezcla de Eagle con 10 a 40 % de suero humano, de ternera o de caballo. Por incubación a 35-37° C., 15 las células individuales se sedimentaban sobre las superficies de vidrio de las botellas y proliferaban hasta que la superficie del vidrio estaba cubierta con una lámina de células. Al llegar a este momento, las células se rascaban de la superficie, se dispersaban con tripsina y se seguían propagando en 20 cultivos sumergidos en gran escala, como se ha descrito antes. La línea de células así establecida se conserva en el Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, Pennsylvania, con la designación Wistar 6.

25 Pueden obtenerse hormonas de desarrollo de pituitaria y hormona adrenocórticotrofica (ACTH) a partir de cultivos de esta línea de células por secado de congelación y dialización del cultivo. Para obtener hormonas de desarrollo, se suspende el cultivo liofilizado en agua destilada, se dializa contra 30 agua destilada durante unas 24 horas en frío y se liofiliza.

2 4634 1



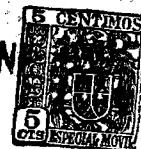
El material así obtenido acusa una aceleración de desarrollo sustancial en ratas hembra y hipofisectomizadas, cuando se ensaya en comparación con hormona de desarrollo de pituitaria normal.

5           Para obtener ACTH, el cultivo liofilizado se suspende en ácido acético acuoso a pH 3 y se dializa contra ácido acético de pH 3 en frío durante unas 20 horas. Después se liofiliza en dializado. El producto así obtenido acusa aproximadamente tres unidades Saffran/miligramo por el método Saffran/Schally.

10           Las células de riñón de conejo embrionario de cepa ERK (Sheffield y col., ver arriba) son particularmente adecuadas para la propagación de virus de poliomielitis que pueden tratarse por métodos conocidos para dar una vacuna de virus para uso en el hombre. El cultivo del virus sobre células no-primate  
15           es particularmente conveniente. Esta línea de células puede usarse también para la propagación de los adenovirus.

Los ejemplos indicados anteriormente son solo ilustrativos de los principios de la invención que proporciona un método útil para la propagación de una gran variedad de células de  
20           mamíferos para obtener productos fisiológicamente activos del metabolismo celular, para proporcionar sustratos de células vivientes de mamíferos para la propagación de virus y otros agentes infecciosos y para muchos fines experimentales y de ensayo, por ejemplo, para ensayos farmacológicos.

25           Esta solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el 7 de Enero de 1.956, bajo el Número 707486 y 707.487, se acogen a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



24.341

- N O T A -

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

- 5           1.- Un método de propagación de células de mamíferos, que comprende mantener en suspensión células de mamíferos en un medio nutriente de cultivo de tejidos, caracterizado por añadir al medio arginina, citrulina o ácido aspártico según se necesite para mantener la proliferación de las células.
- 10           2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la arginina, la citrulina o el ácido aspártico se agregan en una dosis de por lo menos unos 20 microgramos por mililitro de medio de cultivo, por día.
- 15           3.- Un método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque la arginina, la citrulina o el ácido aspártico se agregan a la dosis específica, por lo menos cada tercer día del periodo de cultivo.
- 20           4.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la célula de mamífero procede de un carcinoma humano.
- 5.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la célula de mamífero es una célula conjuntiva humana.
- 25           6.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la célula de mamífero es una célula amniótica humana.
- 7.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la célula de mamífero es de un riñón de conejo.

2 4634 1



8.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la célula de mamífero es de fibroblasto de ratón.

5 9.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la célula de mamífero es de riñón de bovino.

10 10.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la célula de mamífero es de riñón de porcino.

11.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la célula de mamífero es una célula discreta.

15 12.- Un método de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque se recuperan dichas hormonas del medio de cultivo.

13.- Un método de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque la hormona producida y aislada es ACTH.

20 14.- Un método de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque las hormonas producidas y aisladas son hormonas de desarrollo de la pituitaria.

15.- Un método de propagación de células de mamíferos. Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

25 La presente Memoria consta de diez hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 19 FNE 1959

P. A.

MCR//.