

Case G. 274

379927



SECCION FONDA
CLASIFICACION
CLASE <u>E 12</u>
SUBCLASE <u>K</u>

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

por "APARATO PARA EL CULTIVO DE CELULAS VIVIENTES DE ORIGEN ANIMAL", a favor de la firma italiana SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA, residente en MILAN (Italia).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un método para el cultivo en gran escala de células vivientes.

5. Más particularmente, objeto de este invento es un método y un equipo para el cultivo de células vivientes en monoestrato, lo mismo que de eumicetos, esquizomicetos y algas, y para la producción en gran escala de virus, vacunas y productos biológicos, tanto para el uso humano como en veterinaria. Es bien sabido que la producción de vacunas para impedir las enfermedades por virus ha pasado por diferentes fases cronológicas de substratos para el cultivo de dichos virus: el gran animal doméstico receptor (bobino o equino), paso a pequeños animales de laboratorio, luego a

10.

= 2 =  
379927



a huevos embrinados y por último cultivo de células (en monoestrato o en suspensión ).

5. La producción de virus sobre monoestratos de tejido para cultivo es evidentemente un progreso técnico y económico respecto a las dos técnicas anteriores. Se sabe también que para la producción en escala industrial de muchas vacunas se necesitan grandes cantidades de células vivientes y que estas células no pueden cultivarse en suspensión, en fermentadores apropiados, como se hace para la producción biosintética de antibióticos, se alcaloides de cornozuelo de centeno y similares.

10. En efecto, la producción de vacunas y de productos biológicos para el uso humano está restringida a los cultivos en tejido de células de tejido no canceroso normales, como los de explantos primarios y cepas celulares.

15. Se sabe que uno de los procedimientos típicos de cultivo en tejido para la producción de vacunas se efectúa en frascos de "Roux" o "Brockway".

20. La capacidad total de un frasco de Roux es de 1 litro aproximadamente y la superficie interna para el cultivo en monoestrato es de 250 cm<sup>2</sup>. En los frascos esterilizados se introduce el medio nutritivo, que contiene una suspensión de células y se incuban los frascos en posición horizontal hasta que el desarrollo celular forma un monoestrato uniforme.

25. Luego se retira el medio de cultivo y se le reemplaza por un medio de mantenimiento que contiene el virus, el cual penetra en las células y se multiplica.

Cuando el virus ha llegado a la concentración debida, se recoge el contenido de los frascos y se le elabora para

379927



hacer vacunas.

5. El método de los frascos de "Roux" estacionarios ha sido bastante mejorado por el método llamado de los frascos giratorios, colocados en cestas especiales de alambre inoxidable que contienen cada una unos 20 frascos redondos.

Por este método, se logra, a igualdad de volumen, un aumento considerable de la potencialidad de producción de vacuna.

10. No obstante, ambos métodos muestran notables desventajas que restringen la capacidad industrial de producción, por cuanto el manejo es demasiado complicado y fraccionado por los muchos frascos que se requieren.

15. En consecuencia, se necesita mucha mano de obra calificada y la contaminación de los productos biológicos es muy probable a causa de la abertura, el relleno, el vaciado y el cierre de cada frasco.

20. Otra desventaja de los cultivos de tejido en frascos es la imposibilidad de comprobar y encauzar el metabolismo de los propios cultivos de tejido por extracción del anhídrido carbónico e introducción de oxígeno y de más terreno nutritivo o por retirada de células, ya que el frasco es una unidad "cerrada" que excluye toda maniobra automática para actuar en estéril.

25. Evidentemente, todas las desventajas que se han enumerado afectan al precio de los productos finales.

Abbott ha descrito y patentado recientemente el llamado "propagador de cultivo en tejido" (patente canadiense N° 787.391, prioridad del 23.12.1965 en los EE.UU.).

El "propagador de cultivo en tejido" consiste en

379927



- cierto número de discos de vidrio o de plástico apropiado, fijados sobre un soporte idóneo y espaciados. Está puesto en un recipiente apropiado que tiene en un extremo una tapa apropiada de cierre hermético, provista de tubo transportador pescante, de tubo de descarga, de tubo de toma y de agitador.
- 5.

También dicho "propagador de cultivo en tejido", que se caracteriza por cierto progreso técnico en comparación con los cultivos en frascos giratorios, muestra notables desventajas.

10. En efecto, no permite efectuar todo el ciclo de operaciones en "línea cerrada" de modo completamente automático, con la posibilidad de comprobar todas las fases por entero y sin riesgo de contaminación del exterior y al exterior.

15. Sorprendentemente, ahora se ha descubierto y elaborado, y ello constituye el objeto de este invento, un nuevo método y la instalación respectiva para cultivar células vivas en monoestrato, lo mismo que eumicetos, esquizomicetos y algas unicelulares.

20. Otro objeto de este invento es un nuevo método y la instalación respectiva para la producción en monoestrato y en gran escala de células como explantos primarios, cepas celulares diploides o líneas continuas de células, lo mismo que para la producción consecutiva de virus, vacunas y productos biológicos, tanto para el uso humano como veterinario.
- 25.

No hay necesidad del personal, los locales y el equipo que utilizan las técnicas ordinarias citadas antes.

El cultivo de las células por el método de este invento, que por brevedad se llamara "método de las columnas



- giratorias", consiste en fijar, en una sola unidad, un número incluso elevado de columnas, con colectores situados en los dos extremos. Las columnas pueden ser de vidrio, de plástico o de otro material apto para el crecimiento de células, y
5. pueden tener longitud y diámetro diferentes. El aparato se coloca en una sala o se reviste con una camisa termorregulable a calor y a frío y se le provee de dispositivos que permiten hacer girar el haz de columnas sobre su eje mayor y llevarlo a la posición vertical.
10. Realiza el ciclo completo del cultivo de células vivientes en monoestrato, eumicetos, esquizomicetos y de algas, lo mismo que para la producción de virus, vacunas y productos biológicos.
- Los medios para lograr las ventajas antes expuestas
15. y otras de este invento se comprenderán con facilidad haciendo referencia a la descripción detallada que sigue, expuesta en conjunción con los dibujos anexos, en los cuales la Figura 1 es una representación esquemática del equipo con la varilla de soporte general del aparato giratorio (7) en posición horizontal y la Figura 2 es un esquema del equipo con la
20. varilla de soporte general del aparato giratorio en posición vertical.
- Las columnas (1) que forman el aparato terminan en una sola unidad por medio de los colectores terminales (2 y 3).
25. En los colectores parciales que sujetan las columnas están insertos grifos (3) que permiten elaboración total, parcial y fraccionada.
- Todas las operaciones necesarias para el número respectivo de frascos se efectúan de una vez abriendo y cerrando

379927



los grifos de los colectores terminales (2).

5. El haz de columnas sujetas entre si por colectores terminales (6) está fijado sobre una varilla de soporte general (7) y, por medio de dispositivos particulares (4-5), puede girar a velocidad regulable sobre el eje giratorio y puede pasar de la posición horizontal a la vertical.

10. El conjunto está colocado sobre un soporte fijo (8) en una sala o revestido de una camisa termorregulable a calor y a frio, con mandos automaticos para mantener dentro de un intervalo elegido la temperatura del terreno de cultivo.

15. Por medio de los grifos de los colectores generales, puede ser conectado a diversos servicios (9) (detergente, agua corriente y agua desionizada, vapor fluente, tubos de llenado, de descarga y de toma de líquidos y de gases necesarios para el cultivo de las células).

20. Más particularmente, el uso apropiado de los colectores generales y parciales con los respectivos grifos (2 y 3) permite conectar el haz de columnas "in toto" o aún una sola columna, no solamente a los diversos servicios generales enumerados antes, sino también, en línea cerrada y en estéril, a dispositivos especiales para la distribución, debidamente medida y automáticamente registrada, de líquidos tales como medios nutritivos, soluciones tampón, células en suspensión, tripsina u otras enzimas, virus o gases puros o mixtos, como oxígeno, aire y anhídrido carbónico.

25. También es posible una conexión temporal con tubos especiales de exhalación para el anhídrido carbónico formado durante el desarrollo de las células y con tubos de descarga y extracción de líquidos.

379927



Si es necesario, dichos dispositivos prevén la medición y el registro automático o semiautomático de los diversos parámetros.

5. Tales medios de medición y registro pueden estar conectados, según las técnicas usuales, con dispositivos de intervención automática, aptos para corregir y mantener los parámetros dentro de intervalos elegidos.

10. Además, cada columna, o el haz de columnas, están provistos de un elemento medidor y registrador del pH inter-  
np, con un dispositivo de intervención automática capaz de mantener el terreno de cultivo dentro de un pH deseado, ya sea variando la relación de oxígeno, aire/anhidrido carbónico, ya sea con el envío de soluciones tampón.

15. Cuando las "columnas giratorias" se utilizan para cultivar células en monoestrato, se incorpora al aparato un microscópico que permite observar las células en monoestrato sobre la superficie de las propias columnas con diferentes aumentos para toda la longitud de las columnas.

El ciclo de acción comprende las partes siguientes:

20. - lavado del aparato con una solución detergente por aspiración en vacío y enjuague con agua desionizada;
- esterilización del aparato con vapor fluente;
- siembra del aparato con una suspensión de células en terreno de cultivo apropiado;
25. - crecimiento de las células sembradas sobre la superficie de las columnas, que giran en posición horizontal.

El crecimiento de las células sobre la superficie puede comprobarse con el microscópico y se caracteriza también por la formación de una delgada capa opalescente sobre la

379927



superficie de las columnas.

5. Cuando el crecimiento está terminado, las células están listas para las fases de escisión enzimática con tripsina o con otras enzimas apropiadas, si las células en monoestrato deben utilizarse para ulterior siembra, o para la producción de virus u otros productos biológicos.

Ambas operaciones se realizan con facilidad gracias a la sencillez y manejabilidad del aparato.

10. Una vez recogidas las células o los otros productos biológicos, se empieza de nuevo el ciclo con el lavado del aparato.

De la descripción anterior se desprende que el aparato de "columnas giratorias" aporta las ventajas siguientes:

- 15. - abriendo y cerrando los grifos de los colectores generales se efectúan en estéril y de una vez las mismas operaciones de llenado y vaciado necesarias para el respectivo número de frascos;
- 20. - el transvase de los líquidos se efectúa por vacío y presión;
- el aparato se lava rápidamente llenándolo y vaciándolo con vacío y presión, mientras que los otros métodos exigen máquinas lavadoras;
- el aparato está listo en breve tiempo, gracias a la esterilización con vapor fluente;
- 25. - la cantidad de mano de obra se reduce al mínimo y las operaciones se efectúan con seguridad y en estéril, evitando toda contaminación de los productos en elaboración y todo riesgo de que el personal contraiga infecciones;
- el aparato puede emplearse con todas las columnas, con un número parcial de ellas y con fases sucesivas;

379927



- una vez montado el aparato, está siempre listo para otras elaboraciones; no necesita ser movido y puede conectarse por tuberías a otros servicios situados en otra sala;
- control microscópico directo de las fases de crecimiento de las células y del efecto citopático de los virus;
- 5. - posibilidad de tripsinizar fácilmente y con control microscópico directo las células del monoestrato que han de utilizarse en otras siembras;
- termorregulación automática y semiautomática para temperatura caliente y fría.
- 10. - posibilidad de emplear cantidades diferentes de terrenos de crecimiento y de mantenimiento según las necesidades de cultivo;
- control y regulación rápida, automática o semiautomática, del pH durante las diversas fases de elaboración;
- 15. - empleando el aparato para el cultivo de las células en monoestrato sobre la superficie interna de las columnas, el crecimiento es independiente de la longitud, el diámetro y el número de las columnas que forman el aparato.

20. Cabe señalar que la relación entre la superficie de cultivo de células en monoestrato y el volumen del terreno necesario para el cultivo de las células según el procedimiento y con el aparato de este invento está muy mejorada en comparación con los métodos usuales.

25. De ellos resulta que la cantidad necesaria de terreno, de enzimas incluso costosas como la tripsina, se reduce, con grandes ventajas económicas, y que los terrenos líquidos que contienen los virus presentan ya una concentración útil para las otras operaciones de preparación de vacunas,

379927



sin necesidad de concentrarlos ulteriormente.

La tabla N° 1 expone, sin que ello implique limitación, datos comparativos entre los frascos de Roux, los propagadores y las columnas giratorias.

5.

TABLA N° 1

10.

15.

20.

Recipiente	Volumen de líquido actuante (terreno en cm <sup>3</sup> )	Superficie de cultivo, en cm <sup>2</sup>	Relación superficie/volumen del terreno	Número correspondiente de frascos de Roux
Frasco de Roux	120	250	2,09	-
Propagador de 1 litro	500	819	1,64	5
Propagador de 7,5 litros	4500	6966	1,54	42
Columna giratoria N° 1 ø 5,6 cm h 100,0 cm	670-350	1758	2,62-5,02	7
Columna giratoria N° 1 ø 8,0 cm h 100,0 cm	1074-537	2512	2,33-4,67	10
Columna giratoria N° 1 ø 5,6 cm h 500,0 cm	3190-2500	8792	2,75-3,51	35

25.

La tabla 1 demuestra que, a igualdad de condiciones, cuanto mayor es la relación superficie/volumen del terreno tanto mejor es la utilización del terreno y la concentración de los productos biológicos al final de la operación, como ya se ha mencionado antes.

Los Ejemplos que siguen sirven para ilustrar

379927



el invento sin limitarlo.

EJEMPLO 1

Monoestratos de células en cultivo primario

5. Organos de mamíferos y otros animales, tomados en condiciones óptimas, cortadas en trozos de 2 a 5 mm y lavados en soluciones tamponadas, se tripsinan según las técnicas de cultivo clásicas.

10. Después de la comprobación, las células recogidas se suspenden en los terrenos de cultivo hasta la concentración deseada para la implantación.

15. La siembra del aparato de "columnas giratorias", debidamente lavado y esterilizado, consiste en conectar un tubo entre el recipiente que contiene la suspensión de células y al propio aparato en posición vertical y en efectuar el transvaso por vacío, presión o bomba peristáltica.

Se cierran los diversos grifos y se ajusta a las mejores condiciones de oxigenación y pH el aflujo de mezcla gaseosa esteril (aire/anhidrido carbónico).

20. Después se pone a girar el aparato en posición horizontal y se incuban a 36-37°C las células sembradas.

25. El monoestrato uniforme que se forma con regularidad en la superficie de las columnas puede comprobarse en cada fase con el microscópio y se completa en el mismo tiempo que necesitan otros cultivos sembrados en recipientes mantenidos en posición estacionaria.

La Tabla N° 2 expone algunos ejemplos de los periodos de tiempo necesarios para obtener los monoestratos completos en "columnas giratorias" y en frascos de "Roux" estacionarios.

379927



Tabla No 2

Monoestratos de cultivos primarios de:	Dias necesarios para obtener monoestratos completos	
	en columnas giratorias	en frascos de Roux estacionarios
5. Riñón de ternera	5-6 dias	5-6 dias
Riñón de cerdo	5-6 "	5-6 "
Riñón de perro	3-4 "	3-4 "
Embrión de pollo	2-3 "	2-3 "
Testículo de cerdo	3-4 "	3-4 "
10. Testículo de caballo	3-4 "	3-4 "

EJEMPLO 2

Monoestratos de cepas celulares y líneas celulares establecidas

15. El método de las "columnas giratorias" permite obtener la producción en escala industrial de líneas de células y cepas de células.

Una vez se ha formado el monoestrato completo, deben efectuarse diversas maniobras en período de tiempo bien fijados, llevan el aparato diversas veces a las distintas posiciones (vertical, horizontal, giratoria, etc.) para realizar las diversas fases de tripsinización y recolección de las células.

25. La facilidad de manejo del aparato aquí descrito permite efectuar cómodamente y con exactitud las maniobras necesarias para la tripsinización de un frasco de Roux.

Tales maniobras pueden ser efectuadas por una o



dos personas, en el mismo tiempo, ya sea en todo el aparato, ya sea en parte de él. Las dimensiones y el número de las columnas pueden variar.

5. La Tabla Nº 3 muestra algunos ejemplos de los datos obtenidos sembrando el aparato de "columnas giratorias" con células BHK<sub>21</sub>. Las células sembradas procedían de la tripsinización en el aparato de monoestrato.

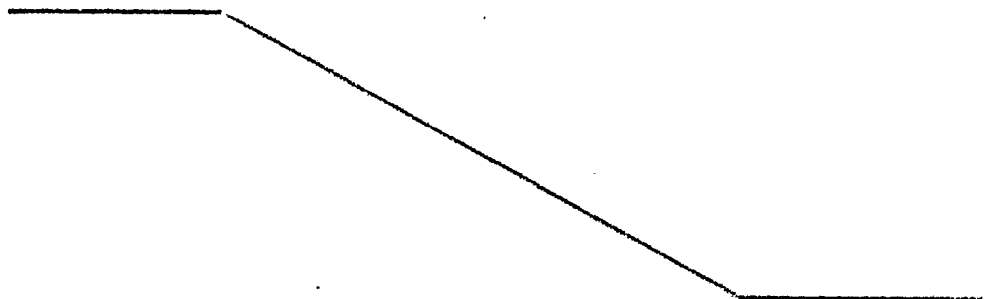
Tabla Nº 3

10.

Recipiente	Células sembradas por cm <sup>2</sup> Vidrio	Células recogidas por cm <sup>2</sup> Vidrio	Horas de incubación	Indice de multiplicación
Columnas	75000	260500	44	3,47
15. Frascos de Roux	75000	248350	44	3,31
Columnas	100000	623162	66	6,23
Frascos de Roux	100000	582300	66	5,82

20.

La Tabla Nº 4 muestra el tiempo necesario para obtener los monoestratos completos en las "columnas giratorias" y en frascos de Roux estacionarios de algunas líneas de células y cepas celulares.



379927



Tabla Nº 4

	Desig- nación de las células	Origen	Días necesarios para obtener monoestratos completos	
			en columnas giratorias	en frascos de Roux estaciona- rios
5.	BHK <sub>21</sub>	Línea Macpherson y Stoker	2-3 días	2-3 días
	PK <sub>15</sub>	Línea NADL JOWA	2-3 "	2-3 "
10.	J.L.S. V 6	Línea J.L.S. Memorial Cancer Res, Dept. Viral Oncology-Maywed N.Y.	2-3 "	2-3 "
	T.T.	cepas procedentes del tiroide ternera <sup>(o)</sup>	2-3 "	2-3 "
	T.C.	cepas procedentes del testículo del cordero <sup>(o)</sup>	3-4 "	3-4 "
15.	P.F.O.	cepas procedentes del pulmón de feto de oveja <sup>(o)</sup>	3-4 "	3-4 "
	R.P.	cepas procedentes del ri- ñón de perro <sup>(o)</sup>	3-4 "	3-4 "

(<sup>o</sup>) Colección de nuestro laboratorio

20. EJEMPLO 3

Producción de virus C de la glosopeda

Procediendo como en el Ejemplo 1 y empleando un  
riñón de cerdo, se obtiene un monoestrato uniforme al cabo  
de 5 a 6 días de incubación.

25. Se aparta luego el terreno de cultivo por lavado  
del monoestrato y substituyéndolo con un terreno de manteni-  
miento de las células durante la producción del virus, en  
línea cerrada y en esteril, con la técnica complementamente  
automatizada que se ha descrito antes.



Junto con el terreno de mantenimiento citado se introduce una cepa C de la glosopeda.

5. Después de la siembra del virus, se ajusta el aparato a las mejores condiciones de ventilación, pH y temperatura y se inicia el cultivo del virus. Para comprobar el crecimiento de éste, se efectúan, siempre en línea cerrada y en esteril, algunas extracciones a intervalos regulares de tiempo.

10. El máximo de producción se alcanza al cabo de 15 a 24 horas de incubación. Dosis<sub>50</sub> de infección del cultivo de tejido (T.C.I.D.<sub>50</sub>) =  $10^{6,5} - 10^{7,0}$  para 0,1

15. Se obtienen resultados análogos si se utiliza un riñón de ternera o células B.H.K.<sub>21</sub> en lugar de un riñón de cerdo como fuente de células primarias o de línea.

EJEMPLO 4

Producción de virus de la pseudopeste aviar (N.C.D.V.)

20. Procediendo como en el Ejemplo 3, pero empleando una cepa de virus N.C.D., se obtiene sobre huevos embrionados x 0,1 un título infectivo 50 (EID<sub>50</sub>) =  $10^{6,5} - 10^{7,0}$  al cabo de 28 a 72 horas de incubación.

Se obtienen resultados análogos si se utiliza un riñón de ternera o células B.H.K.<sub>21</sub> en lugar de un riñón de cerdo como fuente de células primarias o de línea.

25. EJEMPLO 5

Procediendo tal como se ha descrito en los Ejemplos anteriores, pero empleando otras cepas de virus, se obtienen producciones de los virus siguientes: muermo del perro (CDV), rinotraqueitis bobina infecciosa (IBR), "enfer-



medad mucosa" (M.D.V.), para-influenzá (P.I.), rabia (R.V.), hepatitis canina infecciosa (C.H.V.), sarampión y otros tantos en campo humano como veterinario.

EJEMPLO 6

- 5. Procedimiento en condiciones apropiadas, se ha efectuado el cultivo de eumicetos (como por ejemplo, *Penicillium chrysogenum*), esquizomicetos (como el *Bacillus subtilis*) y algas unicelulares (como *Chlorella*).

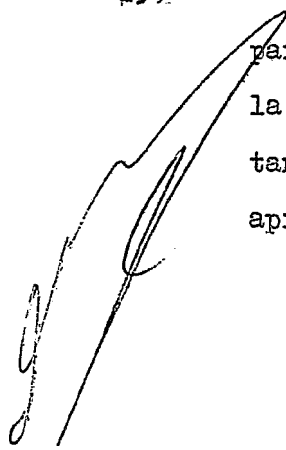
= . =

- 10. REIVINDICACIONES

Se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente italiana nº 17244 A/69 del 23 de Mayo de 1969.

- 15. 1. Aparato para el cultivo de células vivientes de origen animal, lo mismo que de eumicetos, esquizomicetos y algas unicelulares, en terreno apropiado, aparato que se caracteriza por constar de gran número de columnas de longitud y diámetro variables, en las que pueden proliferar las células columnas que están unidas entre si por los extremos mediante colectores apropiados y fijados sobre una varilla de soporte que permite hacer girar las columnas en torno al eje de giro y pasarlas de la posición horizontal a la vertical; y por estar el propio aparato rodeado por un espacio termoajustable para calor y frío.

- 25. 2. Aparato de conformidad con la reivindicación 1, para el cultivo de células vivientes en monoestrato y para la producción de virus, de vacunas y de productos biológicos, tanto para el uso humano como veterinario, en un terreno apropiado por constar de un haz de cierto número de colum-





- nas hechas de material apropiado, como vidrio, plástico u otro compatible con el desarrollo de las células, en cuyas columnas pueden proliferar en monoestrato células de longitud y diámetro variables; por estar sujeto este haz de columnas,
5. en ambos extremos, por colectores aplicados sobre una varilla de soporte giratoria, que permite que el haz de columnas gire a velocidad variable en torno al eje de giro y pase de la posición horizontal a la vertical; por estar las columnas sujetas en los extremos por medio de colectores generales y parciales
10. apropiados, provistos con los grifos respectivos para conexión automática, en línea cerrada y en esteril, con los diferentes servicios; por estar el aparato colocado en una sala o rodeado con una camisa termoajustable para calor y frio.
3. Aparato según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado en que los colectores generales del haz de columnas están
15. conectados, en línea cerrada y esteril, con los diversos servicios, que incluyen tuberías de agua, de detergente, de vapor, de agua desionizada, de aducción de gases necesarios para el desarrollo de las células, de aducción para las diversas
20. adiciones de líquidos, tales como terrenos, soluciones tamponadas y tripsina, y de descarga o de extracción para gases o líquidos.
4. Aparato según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado en que el tubo aductor de gases está provisto de un
25. elemento medidor y registrador del volumen de gas de entrada con dispositivo de intervención automática.
5. Aparato según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado en que el haz de columnas está provisto de un medidor y registrador de pH que mantiene el terreno de cultivo dentro



de una gama de pH elegida.

- 6. Aparato según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado en que está colocado en una sala o rodeado por una camisa termoajustable, provista de dispositivo de intervención automática que mantienen el terreno de cultivo dentro de una gama elegida de temperatura.
- 5.

7. Aparato para el cultivo de células vivientes de origen animal.

- 10. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 23 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

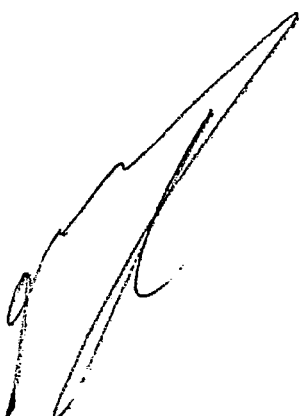
Madrid, a 22 de Mayo de 1970.

p.a.

JAVIER IBERN

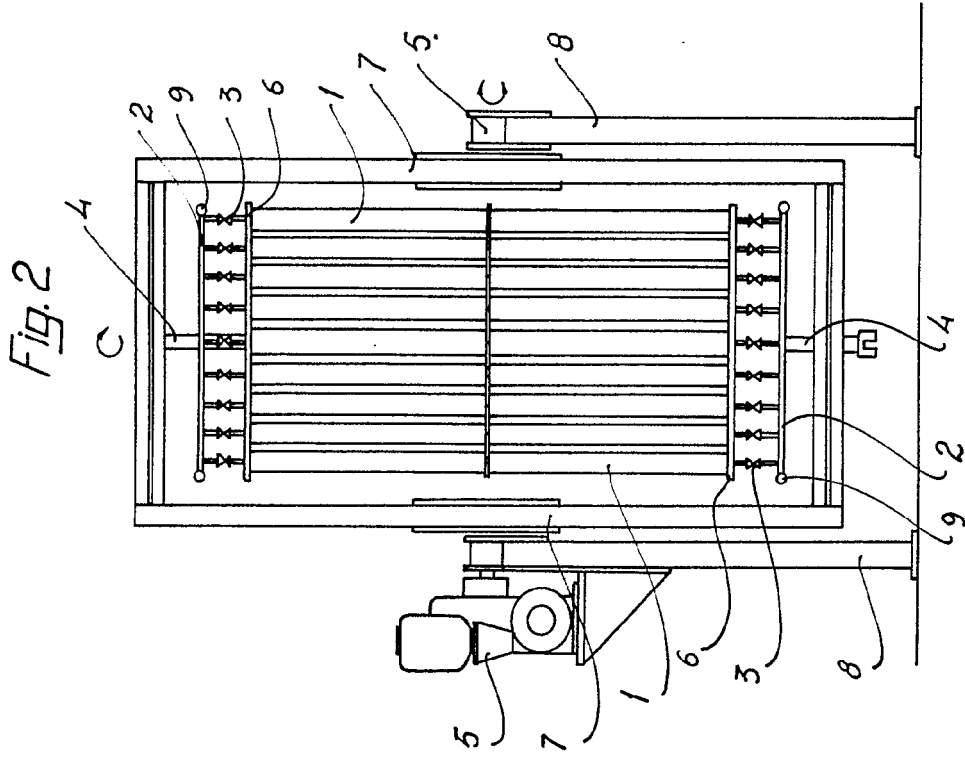
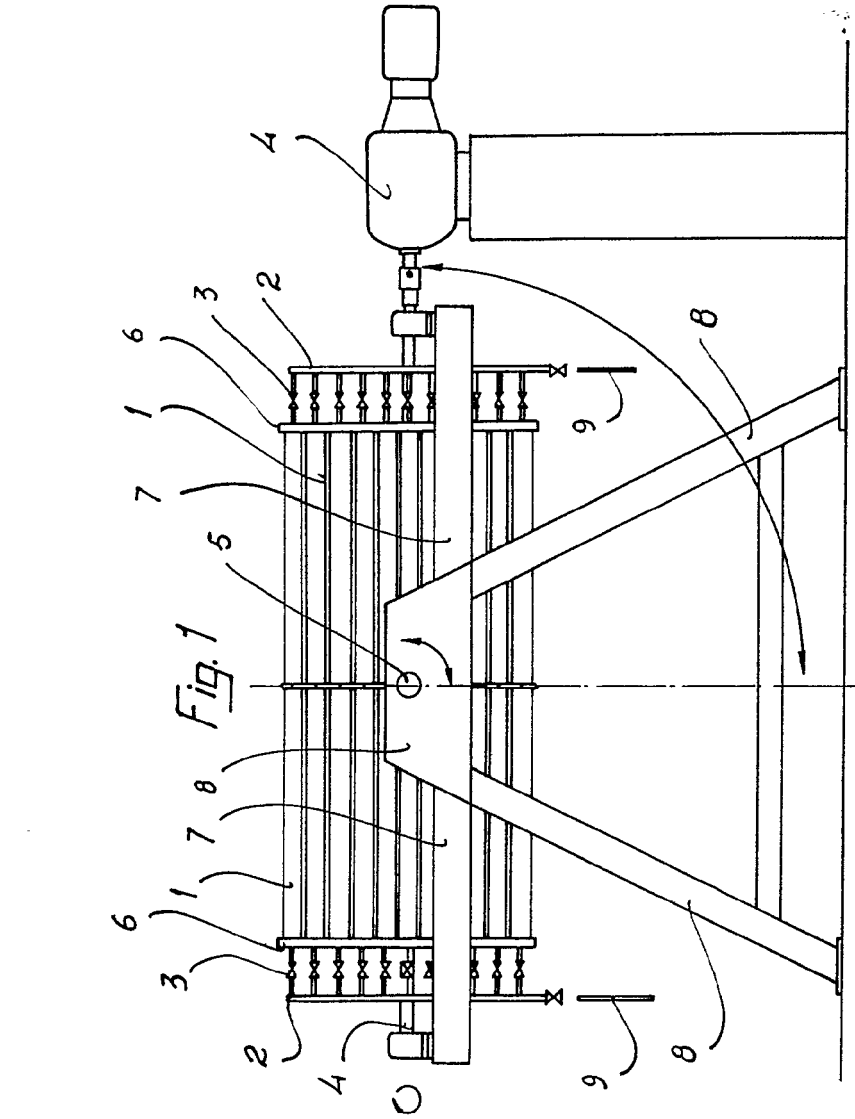
p. p.

  
 Firmado: JOSE F. NIETO





379927



Madrid, a 22 MAY. 1970

P. a. JAUME ISERN



CAS. G. 274

379927

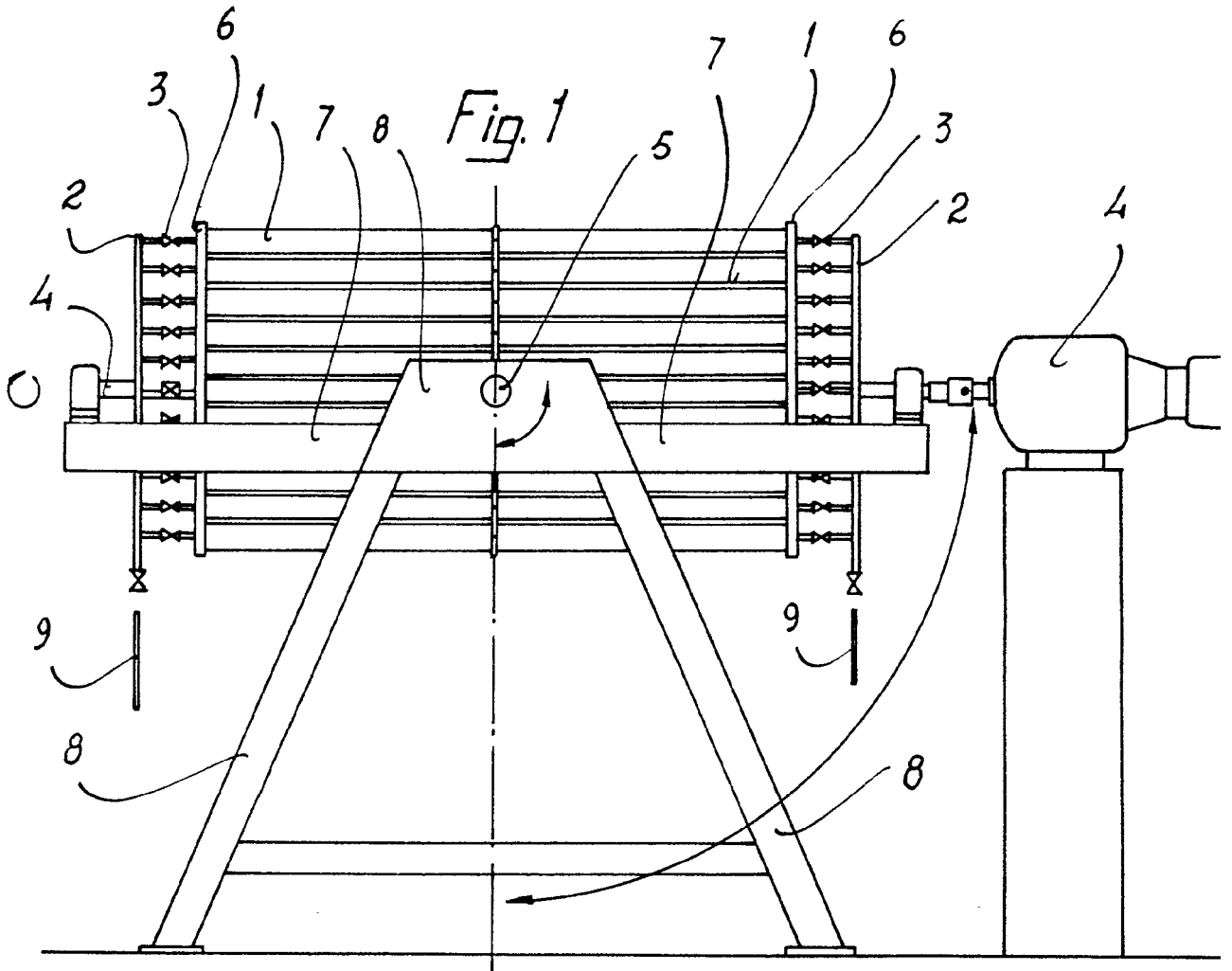
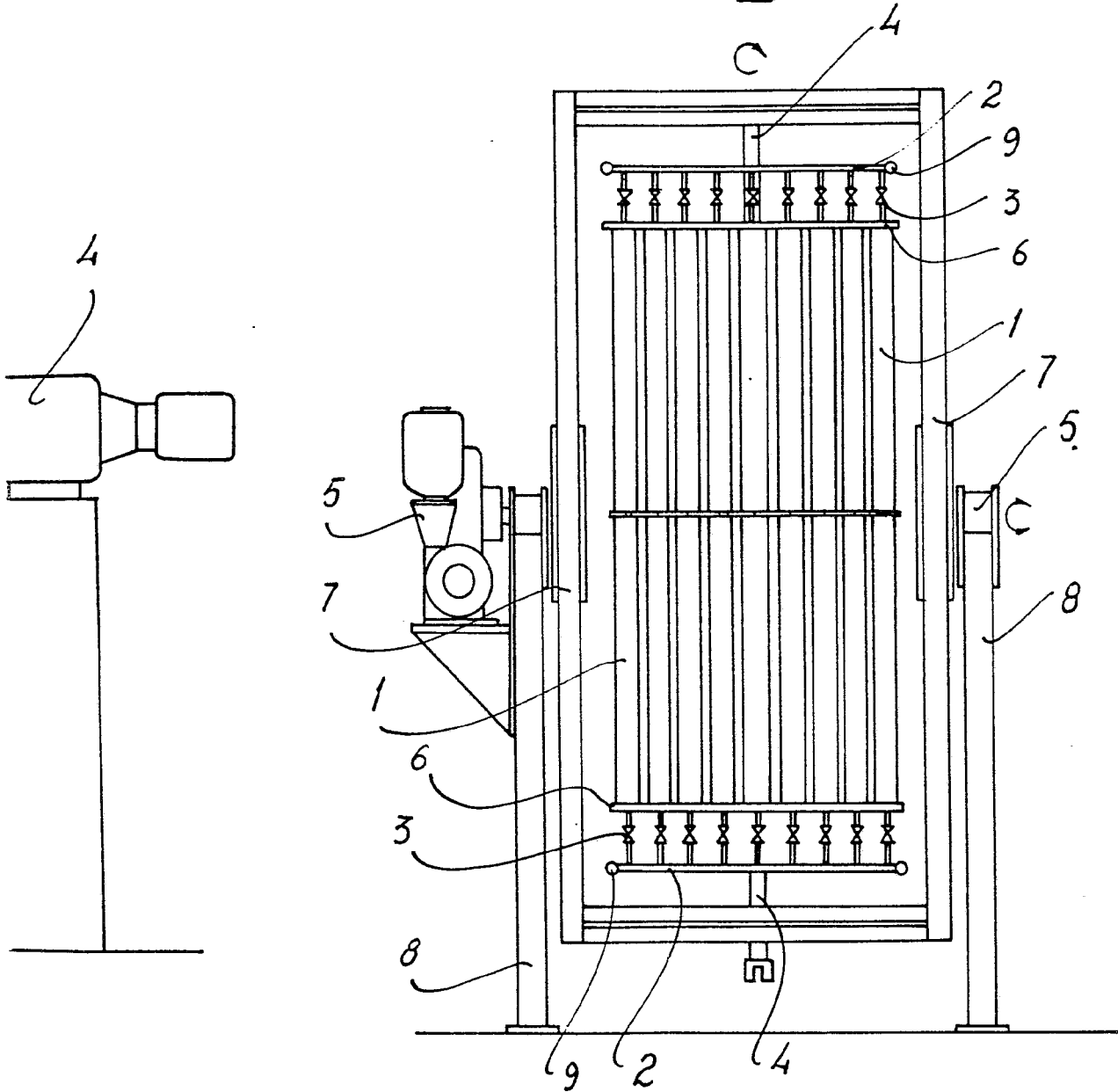




Fig. 2



Madrid, a 22 MAY. 1970

p.a. JAIME ISERN

