

REF: %Caso No.
15014

415570

F.C. 44-I-76



No 415.570

Incl. Cl.:

C12K

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: MERCK & CO., Inc.

RESIDENCIA: 126 EAST LINCOLN Ave.-RAHWAY/N.J. 07065.-

ESTADOS UNIDOS.-

UN
ENUNCIADO: DISPOSITIVO PROPAGADOR MULTIPLACA PARA

LA PRODUCCION DE POR LO MENOS UN MIEMBRO

SELECCIONADO ENTRE EL GRUPO FORMADO POR
CELULAS Y VACUNAS.

Prioridad: Patente estadounidense n.º 262 825 del 14.6.72

415570



1 Esta invención se refiere a un procedimiento para la producción de células y vacunas.

5 Más especialmente, esta invención se refiere a un procedimiento para la producción de células y vacunas que utiliza un propagador multiplacas con propiedades geométricas críticas, tales como la relación del diámetro de la placa al diámetro interno del tanque, la distancia entre la periferia de la placa y la pared interna del tanque y la relación de superficie a volumen, con objeto de producir las células y vacunas con rendimientos considerablemente aumentados y a unos precios de coste sustancialmente reducidos en comparación con los de los procedimientos actualmente utilizados.

10 Las vacunas humanas y animales se han producido comercialmente cultivando los virus deseados en células primarias que deben ser cultivadas sobre superficies. Los procedimientos comerciales fueron desarrollados inicialmente en frascos Brockway y, a medida que evolucionaron las técnicas de producción, estos frascos Brockway fueron sustituidos por frascos rodantes. Más recientemente, se han puesto a punto sistemas de cultivo en masa, comprendidos los que utilizan una serie de anillos o tanques concéntricos con una multiplicidad de placas apiladas. El sistema de cultivo en masa más reciente que ha sido puesto a punto es la máquina multiplaca producida por Biotec A.B. de Suecia que contiene una serie de discos o placas de titanio que están montados sobre un eje giratorio en una vasija de vidrio cilíndrica. La vasija puede ser colocada en posición vertical, en la que la superficie de deposición de los discos se encuentra en un plano horizontal con objeto de permitir que las célu-

15

20

25

30

415570



1975

1 las se sedimenten sobre la superficie de deposición de los
discos. Después el dispositivo se coloca sobre uno de sus
lados de manera que las células depositadas giren a través
del medio de cultivo en la vasija hasta que se produce la
5 formación de láminas celulares, después se añade la siembra
de virus, se hace girar de nuevo la unidad y se recoge la
vacuna.

A medida que evolucionaba el estado de la técnica,
el objetivo primario fue aumentar el rendimiento y redu-
cir los costes de producción aumentando la relación entre
10 la superficie específica o superficie de deposición de célu-
las y el volumen del medio con objeto de obtener el máximo
rendimiento de células y vacuna en el volumen más pequeño
posible. Por ejemplo, la relación de superficie específica
a volumen, calculada como cm^2/ml , es de 1,7 en los frascos
15 Brockway, 3,5 en los frascos rodantes y 8,3 en el aparato
Biotec. Inesperadamente, hemos descubierto que pueden con-
seguirse notables aumentos en el rendimiento de las célu-
las y vacunas utilizando un dispositivo que presenta una
relación de superficie específica a volumen comprendida
20 aproximadamente entre 5,5 y 6,0.

También hemos descubierto que pueden obtenerse ren-
dimientos de células y vacunas que son considerablemente
mayores que los rendimientos de células y vacunas que se
producen utilizando cualquiera de los dispositivos antes
mencionados, mediante el uso de propagadores multiplaca
25 que presentan una relación crítica de diámetro de la placa
a diámetro del tanque interno o que presentan una distancia
crítica entre la periferia de las placas y la pared inter-

415570



1 na del tanque. Esta relación puede estar comprendida apro-
ximadamente entre 0,80 y 0,90, preferiblemente entre 0,82 y
0,83 en comparación con una relación de 0,97 en la unidad
Biotec. La distancia crítica entre la periferia de la placa
5 y la pared interna del tanque está comprendida aproxima-
damente entre 1/2" (12,7 mm) y 3/4" (19,0 mm), en oposición a
3/32" (2,38 mm) en la unidad Biotec. El uso de un disposi-
tivo que presente esta relación crítica de diámetro de la
placa a diámetro del tanque interno o esta distancia crí-
tica entre la periferia de las placas y la pared interna del
10 tanque conduce a notables aumentos en el rendimiento de cé-
lulas y vacunas.

Una ventaja de esta invención es la producción de
células y vacunas con rendimientos muy altos y a precios
15 de coste sustancialmente reducidos en comparación con los
de los procedimientos actualmente utilizados.

Otra ventaja de esta invención es que el rendimien-
to de células es considerablemente aumentado sobre todas
las superficies de deposición.

20 Todavía otra ventaja de esta invención es que pueden
producirse cantidades equivalentes de células y vacunas
mientras se reduce sustancialmente el número de unidades de
producción, reduciendo con ello los costes de manipulación
y el riesgo de contaminación.

25 El procedimiento de esta invención puede ser utili-
zado para producir vacunas virales como las de paperas, sa-
rampión, rubeola, enfermedad de Marek, gripe, para-influen-
za, varicela, tracoma y sincitia respiratoria y células ta-
les como WI-38, células de embrión de pollo y células de
30 embrión de pato. Para cargar el propagador pueden utilizarse

- 5 -
415570



1 células, sueros y medios corrientes. Por ejemplo, pueden
utilizarse células primarias como fibroblastos de embrión
de pollo, riñón de mono verde, riñón bovino, células de
riñón de perro o células diploides como WI-38 así como
5 muchos sueros corrientes tales como suero de ternera fetal,
ternera, bovino, suero de ternera recién nacida exento de
G-G, suero de ternera alfa-gamma o bovino alfa-gamma y me-
dios normales como el medio Eagles Basel, Medio 199, Medio
EBME y Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEME).

10 El procedimiento de esta invención será mejor com-
prendido mediante el examen del dibujo que la acompaña, en
el que:

15 La Figura 1 es una sección de un propagador multipla-
ca que es ilustrativo de los que pueden ser utilizados de
acuerdo con el procedimiento de esta invención y

La Figura 2 es una sección de otro propagador mul-
tiplaca que es ilustrativo de los que pueden ser utilizados
de acuerdo con el procedimiento de esta invención.

20 Refiriéndonos a la Figura 1, ésta presenta un propa-
gador (1) que comprende un tanque cilíndrico de acero ino-
xidable (2) con unos rebordes (3) y (4) en cada extremo del
mismo. Unas placas superior e inferior (5) y (6) están her-
méticamente aplicadas a los rebordes (3) y (4) mediante las
mordazas (7). En el tanque (2) se bombea una mezcla de aire
25 y dióxido de carbono procedente de un depósito (no mostra-
do) a través de un conducto (8) que está conectado al tan-
que mediante un dispositivo de conexión (9) en la placa (6).
Para controlar el caudal de esta mezcla al tanque se utili-
za una válvula (10). A través del conducto (11) que está
30 conectado al tanque mediante el dispositivo de conexión (12)

415570



OCT 1976

1 puede introducirse en el mismo medio, suero y otros nu-
trientes adicionales. Para controlar el caudal de los nu-
trientes al tanque se utiliza una válvula (13). El conducto
de salida (14) está conectado al tanque mediante el dispo-
5 sitivo de conexión (15) que se encuentra en la porción su-
perior de la placa (5) con objeto de sacar el aire del tan-
que de manera que la presión de aire en el interior de este
último no se acumule hasta alcanzar un nivel no satisfacto-
rio. Otro conducto (16) está conectado al tanque (1) me-
10 diante el dispositivo de conexión (17) que está situado li-
geramente por encima del centro de la placa (5) con objeto
de permitir que los fluidos sean sacados del tanque, evitan-
do con ello que el nivel del fluido o de medio (18) en el
tanque suba por encima del nivel deseado. Es necesario con-
15 trolar el nivel del medio con objeto de garantizar la airea-
ción apropiada de las placas (19) a medida que giran a tra-
vés del medio. Las placas (19) están montadas en una barra
(20) que soporta las placas (19) separadas entre sí, debido
a la presencia de separadores cilíndricos entre cada placa.
20 Un extremo de la barra (20) está apoyado de manera que pue-
de girar en un cojinete (21) montado en un rebajo (27) en
la placa extrema (5). El otro extremo de la barra (20) es-
tá también apoyado de manera que puede girar en un cojinete
(23) que está montado en un rebajo (24) de la placa extrema
25 (6). Un par magnético (25) montado fijamente sobre la barra
(20) es enganchado por el medio propulsor magnético (26)
y hace girar las placas (19) a través del medio (18) duran-
te las fases de crecimiento de las células y de infección
por virus de la operación.

30 Análogamente, en la Figura 2 se encuentra un propaga-

415570



OCT. 1915

1 dor (51) que comprende una vasija cilíndrica de acero inoxidable (52) con un reborde (53) en un extremo de la misma. La placa (54) está herméticamente fijada al reborde (53) mediante las mordazas (55). En la vasija (52) se bombea una
5 mezcla de aire y dióxido de carbono procedente de un depósito (no mostrado) a través de un conducto (56) que se extiende a lo largo de la longitud de la pared de la vasija (52) hasta el fondo de la dicha vasija (52), donde una porción del conducto (56) se extiende a lo largo de la parte
10 posterior de la vasija. Esta porción del conducto (56) dispone de unas aperturas (57) que permiten la salida de la mezcla de aire y dióxido de carbono. También se utiliza un conducto de salida (59) para mantener la presión de aire dentro de la vasija a un nivel relativamente constante. Se
15 utiliza otro conducto (60) para proporcionar medio, suero y otros nutrientes y para sacar el medio gastado y el producto. El fluido (58) se mantiene a un nivel ligeramente por encima de la mitad del volumen máximo para garantizar la aireación apropiada de las placas (61) a medida que giran a través del medio. Las placas (61) están montadas en una barra (62), que soporta las placas (54) separadas entre sí, debido a la presencia de separadores cilíndricos entre cada placa. Un extremo de la barra (62) está apoyado de manera que puede girar sobre un cojinete (63) que está
20 montado en un rebajo (64) en el fondo de la vasija (52). El otro extremo de la barra (62) está apoyado de manera que también puede girar en un cojinete (65) que está montado en un rebajo (66) en la placa (54). Un par magnético (67) que está montado fijamente sobre la barra (62) es enganchado por un imán propulsor (68) y hace girar las placas (61)
25
30

- 8 -
415570^{ns} 00



1 a través del medio (58) durante las fases de crecimiento
de las células e infección por virus del ciclo de pro-
ducción.

5 El procedimiento de esta invención será comprendido
mejor refiriéndose a los siguientes ejemplos:

EJEMPLO 1

10 Un propagador giratorio de discos de titanio, con
un diámetro de placa de 6" (152,4 mm), un diámetro interno
del tanque de 7 1/4" (184,15 mm), una distancia de 5/8"
15 (15,87 mm) entre el borde de las placas y la pared del tan-
que y una relación de diámetro de la placa a diámetro in-
terno del tanque de 0,83, se carga con una mezcla de 1500
millones de células de embrión de pollo tripsinizadas y
Medio 199 conteniendo 45 ml/l de NaHCO₃ al 2,8 % y 10 % de
20 suero de ternera fetal. El propagador se mantiene en posi-
ción vertical a una temperatura de 37°C y se efectúa la
deposición. Después el propagador se coloca de manera que
el plano de los discos se encuentre en el eje vertical y
se descarga una parte del medio y del suero hasta que la
25 unidad está llena hasta la mitad o ligeramente por encima
de la mitad. Después se hacen girar los discos a una velo-
cidad de una revolución cada 5 minutos y se hace pasar a
través de la unidad aire o una mezcla de 95 % de aire y
5 % de CO₂, a un caudal de 100 cc/minuto, hasta que se ha
30 completado el ciclo de crecimiento celular, en cuyo momento
se descargan el medio consumido y el suero del propagador
y este último se lava con solución de Hank y se carga con
Medio 199 fresco, conteniendo 60 ml/l de NaHCO₃ al 2,8 %
y 25 % de SPGA conteniendo una suspensión de virus de pape-
ras derivados de 1 ml de una suspensión cuyo $-\log_{10}$

415570⁹



1 TCID₅₀/0,1 ml es 3,6. La unidad se hace girar de nuevo a
una velocidad de 1 revolución cada 5 minutos hasta que ya
no se produce ningún aumento en la concentración de virus
5 en los fluídos que sobrenadan, en cuyo momento se inicia la
operación de recolección de la vacuna.

10 Cuando se compara el título de la vacuna contra las
paperas recogida de acuerdo con el procedimiento indicado
en este ejemplo con el de una vacuna contra las paperas
producida por procedimientos convencionales, se observa un
aumento de diez veces en el título. Esto conduce a rendimien-
tos sustancialmente aumentados de la vacuna.

EJEMPLO 2

15 Un propagador rotatorio de discos, con una pila de
50 discos, cada uno de ellos con un diámetro de placa de
6" (152,4 mm), un diámetro interno del tanque de 7 1/4"
(184,15 mm), una distancia de 5/8" (15,87 mm) entre el bor-
de de las placas y la pared del tanque, una relación del
diámetro de placa a diámetro interno del tanque de 0,80 y
una relación de superficie específica a volumen de 5,5, se
20 carga con una mezcla de 1500 millones de células de embrión
de pollo tripsinizadas y Medio 199 conteniendo 45 ml/l de
NaHCO₃ al 2,8 % y 10 % de suero de ternera fetal. El propa-
gador se mantiene en posición vertical a una temperatura de
37°C y se efectúa la deposición. Al cabo de 3 horas se des-
25 carga el fluído del propagador y se introducen en el mismo
otros 1500 millones de células de embrión de pollo tripsini-
zadas y, después de mezclar, la suspensión fresca se trans-
fiere de nuevo al propagador que se mantiene en la posición
vertical opuesta a la de la primera deposición, a una tem-
30 peratura de 37°C. Una vez completada la deposición, el pro-

415570

83 OCT



1 pagador se coloca de manera que el plano de los discos se
encuentre en el eje vertical y se descarga una parte del
medio y del suero hasta que la unidad está llena hasta la
5 mitad. Entonces se hacen girar los discos a una velocidad
de 1 revolución cada 5 minutos y se hace pasar a través
de la unidad una mezcla de 95 % de aire y 5 % de CO₂ a un
caudal de 100 cc/minuto, hasta que se completa el ciclo de
crecimiento celular, en cuyo momento se descargan del pro-
pagador el medio agotado y el suero. El propagador se llena
10 de nuevo con Medio 199 fresco conteniendo 60 ml/l de NaHCO₃
al 2,8 % y 2 % de suero de ternera recién nacida exento de
G-G y 11 ml de una suspensión de virus del sarampión con
un $-\log_{10} \text{TCID}_{50}/0,1 \text{ ml}$ de 3,3 y se hace girar hasta que el
proceso de infección es completo, en cuyo momento los flui-
15 dos agotados se descargan y el contenido del propagador se
lava con solución de Hank. Después el propagador se recarga
con Medio 199 fresco y 60 ml/l de NaHCO₃ al 2,8 % y 10 %
de SPGA. Cuando la vacuna ha alcanzado la concentración de-
seada, se inicia la operación de recolección de la vacuna.

20 Cuando se compara el título de la vacuna del saram-
pión preparada de acuerdo con el procedimiento indicado en
este ejemplo con el de una vacuna contra el sarampión pro-
ducida por procedimientos convencionales, se observa un
significativo aumento del título. Esto conduce a rendimien-
25 tos sustancialmente aumentados de vacuna.

EJEMPLO 3

30 Un propagador giratorio de disco, con un diámetro de
placas de 5,4" (137,16 mm), un diámetro interno del tanque
de 6" (152,4 mm), una distancia de 0,3" (7,62 mm) entre el
borde de las placas y la pared del tanque y una relación

415570



1 de diámetro de placa a diámetro interno del tanque de 0,90,
se carga con una mezcla de 1500 millones de células de em-
brión de pato tripsinizadas y Medio 199 conteniendo 45 ml/l
de NaHCO_3 al 2,8 % y suero de ternera fetal al 10 %. El
5 propagador se mantiene en la posición vertical a una tempe-
ratura de 37°C y se realiza la deposición. Al cabo de 3 ho-
ras se descarga el fluido del propagador y se introducen
en el mismo otros 1500 millones de células de embrión de
10 pato tripsinizadas y, después de mezclar, la suspensión
fresca se transfiere de nuevo al propagador que se mantie-
ne en la posición vertical opuesta a la de la primera de-
posición, a una temperatura de 37°C . Una vez completada la
deposición, el propagador se coloca de manera que el plano
de los discos se encuentre en el eje vertical y se descarga
15 una parte del medio y del suero hasta que la unidad está
llena hasta la mitad aproximadamente. Entonces se hacen
girar los discos a una velocidad de 1 revolución cada 5 mi-
nutos y se hace pasar por la unidad una mezcla de 95 % de
aire y 5 % de CO_2 a un caudal de 100 cc/minuto, hasta que
20 se completa el ciclo de crecimiento celular, en cuyo momen-
to se descargan del propagador el medio agotado y el suero,
después el propagador se vuelve a cargar con Medio 199 fres-
co conteniendo 60 ml/l de NaHCO_3 al 2,8 %, suero de ternera
recién nacida exento de G-G al 2 % y 42,7 ml de una sus-
25 pensión de virus de la rubeola cuyo título es $-\log_{10}$
 $\text{IND}_{50}/0,1 \text{ ml} = 3,5$ y se hace girar hasta que el proceso
de infección es completo, en cuyo momento se descargan los
fluidos agotados y el contenido del propagador se lava con
solución de Hank. Entonces el propagador se recarga con
30 Medio 199 fresco, 60 ml/l de NaHCO_3 al 2,8 % y 10 % de

- 12 -
415570



1 SPGA. Cuando la vacuna ha alcanzado la concentración deseada, se inicia la operación de recolección de la vacuna.

5 Cuando se compara el título de la vacuna de rubeola recogida de acuerdo con el procedimiento indicado en este ejemplo con el título de una vacuna de rubeola producida por el procedimiento convencional, se observa un aumento significativo del mismo. Este aumento del título conduce a aumentos sustanciales en el rendimiento de vacuna.

EJEMPLO 4

10 Un propagador giratorio de discos de titanio, con un diámetro de placa de 6" (152,4 mm), un diámetro interno del tanque de 7 1/4" (184,15 mm), una distancia de 5/8" (15,87 mm) entre el borde de las placas y la pared del tanque y una relación de diámetro de placa a diámetro interno del
15 tanque de 0,83, se carga con una mezcla de Medio Basel de Eagle y caldo de triptosa-fosfato con 5 % de suero de ternera fetal y 3×10^9 células de embriones de pato tripsinizados de 12 días de edad y $3,6 \times 10^6$ PFU de THV de Marek. El propagador cargado se mantiene en la posición vertical a
20 una temperatura de 37°C y se efectúa la deposición. Después el propagador se coloca de manera que el plano de los discos se encuentre en el eje vertical y se descarga una parte del medio y del suero hasta que la unidad está llena hasta la mitad aproximadamente. Después los discos se hacen girar
25 a una velocidad de 1 revolución cada 8 minutos y se hace pasar a través del propagador aire o una mezcla de 95 % de aire y 5 % de CO₂, a un caudal de 100 cc/minuto. El pH se
ajusta de vez en cuando con NaHCO₃ al 7,5 % de manera que permanezca dentro de los límites de 6,8-7,4. También se
30 agrega glucosa al sistema periódicamente de manera que en

415570



1 ningún momento la concentración de glucosa se salga de los
límites de 15-100 mg/100 ml. Al sexto día después de la de-
posición, se descarga el medio agotado y se transfieren al
propagador 6 litros de KCl/tripsina. Entonces las placas
5 se hacen girar a través de la solución de tripsina a una
velocidad de unas 20 revoluciones/minuto durante 5 minutos.
La suspensión celular se descarga del propagador y se agre-
ga al mismo suero de ternera fetal hasta que se obtiene una
concentración final del 7,5 % de suero de ternera fetal.
10 Después la suspensión se centrifuga durante 10 minutos. El
contenido se resuspende entonces en suero de ternera fetal
al 15 %.

15 Cuando la vacuna se prepara por este método, en el
equipo descrito, se obtiene un aumento sustancial del títu-
lo en comparación con el título obtenido cuando se utiliza
el equipo y los procedimientos convencionales. Este aumen-
to del título conduce a rendimientos considerablemente au-
mentados de vacuna.

EJEMPLO 5

20 Un propagador giratorio de discos de titanio, con
un diámetro de placas de 6" (152,4 mm), un diámetro interno
del tanque de 7 1/4" (184,15 mm), una distancia de 5,8"
(15,87 mm) entre el borde de las placas y la pared del tan-
que y una relación de diámetro de placa a diámetro interno
25 del tanque de 0,83, se carga con una mezcla de 300×10^6
células WI-38 en Medio EBME conteniendo 10 % de suero de
ternera fetal y 10 ml/l de glutamina. El propagador y su
contenido se mantienen entonces con el plano de las placas
en el eje horizontal a 37°C, hasta que se ha conseguido la
30 deposición. Después el propagador se coloca de manera que

- 14 -
415570

170



1 el plano de los discos se encuentre en el eje vertical y
se descarga una parte del medio y del suero hasta que la
unidad está llena hasta la mitad aproximadamente. Después
5 los discos se hacen girar a una velocidad de 1 revolución
cada 5 minutos y se hace pasar a través de la unidad aire
o una mezcla de 5 % de CO₂ y 95 % de aire a un caudal de
100 cc/minuto. Veinticuatro horas más tarde se descarga el
medio de la máquina y la unidad se rellena con un volumen
10 igual de Medio EBME fresco conteniendo 5 % de suero de ter-
nera fetal y 10 ml/l de glutamina. Al cabo de 48 horas más
de giro y gasificación, se recolecta la unidad. Para esta
operación la unidad se vacía de medio agotado y después se
llena hasta la mitad con una solución que contiene tripsina.
15 Las placas se hacen girar a través de la solución de tripsi-
na a una velocidad de 20 revoluciones/minuto durante 5 mi-
nutos. La suspensión celular se descarga del propagador y
se añade suero de ternera fetal hasta que se obtiene una
concentración final del 7,5 % de suero de ternera fetal.
Después la suspensión se centrifuga durante 10 minutos para
20 granular las células y estas últimas se suspenden de nuevo
en Medio 199, 15 % de suero de ternera fetal y 45 ml/l de
NaHCO₃ al 2,8 %. Cuando se preparan por este método célu-
las WI-38 en el equipo descrito, se obtienen con gran efi-
ciencia y economía en comparación con las células produci-
25 das utilizando equipos y procedimientos convencionales.

EJEMPLO 6

30 Un propagador rotatorio de disco, con un diámetro de
placas de 6" (152,4 mm), un diámetro interno del tanque de
7 1/4" (184,15 mm), una distancia de 5/8" (15,87 mm) entre
el borde de las placas y la pared del tanque y una relación

415570

193 06



1 de diámetro de placa a diámetro interno del tanque de 0,83,
se carga con una mezcla de 3000 millones de células de em-
brión de pollo tripsinizadas, Medio 199, 45 ml/l de NaHCO_3
al 2,8 % y 5 % de suero de ternera fetal. El propagador se
5 mantiene en posición vertical a una temperatura de 37°C y
se efectúa la deposición. Al cabo de 3 horas, se descarga
el fluido del propagador y se introducen en el mismo otros
3000 millones de células de embrión de pollo tripsinizadas
y, después de mezclar, la suspensión fresca se transfiere
10 de nuevo al propagador que se mantiene en la posición ver-
tical opuesta a la de la primera deposición, a una tempera-
tura de 37°C , con objeto de efectuar la deposición sobre la
segunda cara de los discos. Cuando se ha conseguido esto,
el propagador se coloca de manera que el plano de los dis-
15 cos se encuentre en el eje vertical y se descarga una parte
del medio y del suero hasta que la unidad está llena hasta
la mitad aproximadamente. Entonces los discos se hacen gi-
rar a una velocidad de 1 revolución cada 5 minutos y se pa-
sa a través del propagador aire o una mezcla de 5 % de CO_2
20 y 95 % de aire, a un caudal de 100 cc/minuto. Cuando las
células han alcanzado el estado confluyente y ha cesado su
crecimiento, pueden ser recolectadas.

25 Se descarga el medio del propagador y este último se
llena hasta la marca que señala la mitad con una solución
que contiene tripsina. Las placas se hacen girar a través
de la solución de tripsina a una velocidad de 20 revolu-
ciones/minuto durante 5 minutos. Se descarga la suspensión
celular del propagador y se añade suero de ternera fetal
hasta que se obtiene una concentración final del 7,5 % de
30 suero de ternera fetal. Después la suspensión se centrifu-

415570⁻¹⁶⁻



1 ga durante 10 minutos para granular las células y estas últimas se suspenden de nuevo en Medio 199, 15 % de suero de ternera fetal y 45 ml/l de NaHCO_3 al 2,8 %.

5 Cuando se preparan células de embrión de pollo por este método en el equipo descrito, se obtienen con una gran eficiencia y economía en comparación con las células producidas utilizando procedimientos y equipos convencionales.

EJEMPLO 7

10 Un propagador giratorio de discos, con un diámetro de placas de 6" (152,4 mm), un diámetro interno del tanque de 7 1/4" (184,15 mm), una distancia de 5/8" (15,87 mm) entre el borde de las placas y la pared del tanque y una relación de diámetro de placa a diámetro interno del tanque de 0,83, se carga con una mezcla de 3000 millones de células de embrión de pato tripsinizadas, Medio 199 F10 al 5 % de suero de ternera fetal, 30 ml/l de NaHCO_3 al 2,8 %.

15 El propagador se mantiene en la posición vertical a una temperatura de 37°C y se efectúa la deposición. Al cabo de 3 horas, se descarga el fluido del propagador y se introducen en el mismo otros 3000 millones de células de embrión de pato tripsinizadas y, después de mezclar, la suspensión fresca se transfiere de nuevo al propagador que se mantiene en la posición vertical opuesta a la de la primera deposición, a una temperatura de 37°C, con objeto de efectuar la deposición sobre la segunda cara de los discos. Cuando se ha conseguido esto, el propagador se coloca de manera que el plano de los discos se encuentre en el eje vertical y se descarga una parte del medio y del suero hasta que la

20

25

30 unidad está llena hasta la mitad aproximadamente. Entonces

415570



1 se hacen girar los discos a una velocidad de 1 revolución
cada 5 minutos y se hace pasar a través del propagador aire
o una mezcla de 5 % de CO₂ y 95 % de aire, a un caudal de
5 100 cc/minuto. Cuando las células han alcanzado el estado
confluyente y ha cesado su crecimiento, éstas pueden ser reco-
lectadas.

Se descarga el medio del propagador y este último se
llena hasta la marca correspondiente a la mitad con una solu-
ción que contiene tripsina. Las placas se hacen girar a tra-
vés de la solución de tripsina a una velocidad de 20 revolu-
10 ciones/minuto durante 5 minutos. Se descarga la suspensión
celular del propagador y se agrega suero de ternera fetal has-
ta que se obtiene una concentración final de 7,5 % de suero
de ternera fetal. Después la suspensión se centrifuga duran-
15 te 10 minutos para granular las células y estas últimas se re-
suspenden en Medio 199 F10, suero de ternera fetal al 5 %,
30 ml/l de NaHCO₃ al 2,8 %.

Cuando se preparan células de embrión de pato por es-
te método en el equipo descrito, se obtienen con gran eficien-
20 cia y economía en comparación con las células producidas uti-
lizando procedimientos y equipos convencionales.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

25 1. Un dispositivo propagador multiplaca para la pro-
ducción de por lo menos un miembro seleccionado entre el gru-
po formado por células y vacunas, cuyo propagador comprende
un tanque cilíndrico y una multiplicidad de placas que están
montadas giratoriamente en dicho tanque, presentando dicho
30 propagador una relación de diámetro de placa a diámetro inter-

415570



13 OCT. 1975

1

no del tanque comprendida entre 0,80 y 0,92 aproximadamente.

5

2. Un dispositivo propagador, según la reivindicación 1, en el que los bordes de dichas placas están separados de la pared del tanque por una distancia de, aproximadamente 0,5 a 0,75" (12,70 a 19,05 mm).

10

3. Un dispositivo propagador, según las reivindicaciones 1 y 2 en el que dicho propagador presenta una relación de superficie específica a volumen de 5,5 a 6,0 aproximadamente.

4. Un dispositivo propagador según la reivindicación 1, en el cual la relación es entre aproximadamente 0,82 y 0,83.

15

5. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:

UN DISPOSITIVO PROPAGADOR MULTIPLACA PARA LA PRODUCCION DE POR LO MENOS UN MIEMBRO SELECCIONADO ENTRE EL GRUPO FORMADO POR CELULAS Y VACUNAS.

20

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de dieciocho páginas mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

25

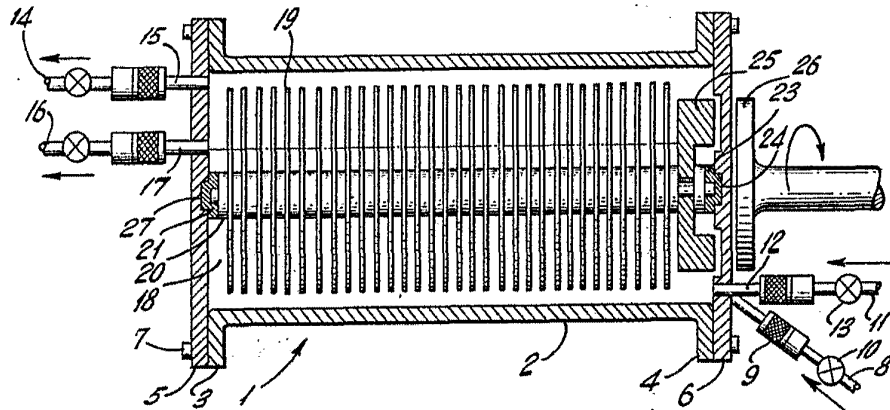
Madrid, 5 junio 1.973
BERNARDO UNGRIA

P.D.

415570



Fig. 1.



ESCALA VARIABLE

Madrid, 5 de junio de 1.973

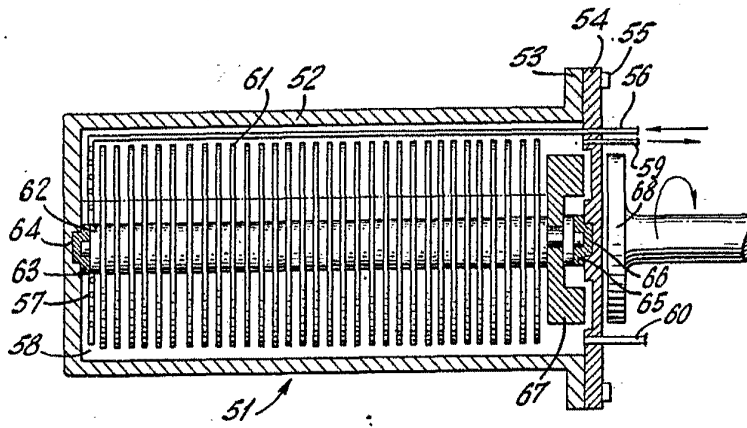
BERNARDO JUNGRIA

P. D.

415570



Fig. 2.



ESCALA VARIABLE
Madrid, 5 de junio de 1.973
BERNARDO UNGRIA

P.P.