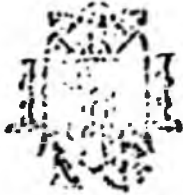


MINISTERIO DE INDUSTRIA
MINISTERIO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA



ES	A I	15 NÚMERO 439.202
		27 FECHA DE PRESENTACIÓN 7-7-1975

PATENTE DE INVENCION

P.- 60.698
GIGI/JI/1388

10 PROPÓSITOS BREVETADOS 19387/72	12 FECHA 26-4-72	13 PAÍS DE ORIGEN Gran Bretaña
--	------------------------	--------------------------------------

CADUCADO

11-2-77

14 FECHA DE PUBLICACIÓN	16 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12K	17 PATENTE DE LA QUE ES DERIVADA No 414.067
----------------------------	---	---

18
TÍTULO DE LA INVENCION

... "UN PROCEDIMIENTO MEJORADO PARA PREPARAR UNA VACUNA POR MEDIO DE UN SISTEMA DE CULTIVO DE CELULAS EUCARIOTICAS VIVAS"

19
SOLICITANTE (S)

... THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

... 183-193 Euston Road, Londres, N.W. 1., Inglaterra

20
INVENTOR (ES)

... Ronald Charles Telling, Roy John Passingham, Brian Lewis Kitchenner y David George Hopkinson

21
TITULAR (ES)

22
REPRESENTANTE

D. FERNANDO DE ELIZABURU MARTINEZ

Esta invención se refiere a la propagación de células eucarióticas en un sistema de cultivo, y al desarrollo de microorganismos, tales como virus, en células de mamíferos y huera.

Es sabido que una variedad de cultivos de células, especialmente las de origen animal o humano, pueden mantenerse en forma de monocapas sobre la superficie lisa de un soporte sólido, por ejemplo bandejas de Petri, frascos de vidrio, o tubos. En cuanto estos cultivos se hacen "confluentes", es decir se forman una capa unida de espesor uniforme, pueden introducirse un virus en el medio líquido que cubre las células, y el cultivo puede usarse para la propagación de los virus en el sistema de monocapa. Muchos tipos de células pueden desarrollarse además, ventajosamente, en suspensión, es decir una dispersión sustancial en el medio nutritivo, y puede adaptarse también la misma técnica a la propagación de virus en células en suspensión. El aparato para este objeto comprende usualmente un recipiente o depósito cerrado con medios adecuados de agitación, control de factores ambientales, por ejemplo pH, pO_2 , suministro de sustancias nutritivas, etc. (véase B.P.S.1 090 758).

En el sistema empleado convencionalmente, por ejemplo para desarrollar linajes de células en cultivo de suspensión, las células son mantenidas en un estado sumergido y agitado en el medio, y son sedimentadas por gravedad cuando

se ha alcanzado el máximo de concentración. El medio es separado después por decantación, y las células son puestas de nuevo en suspensión en un medio reciente que también puede llevar un germen de virus. Después del período de crecimiento del virus, determinado por observaciones del efecto citopático de las células, la cosecha se hace pasar usualmente a través de un filtro, y después a través de una membrana esterilizante de bacterias, para obtener una disolución que contiene virus libres desprendidos por las células rotas.

Una dificultad con los cultivos en suspensión de células de mamíferos en gran escala es que el burbujeo de aire a través del medio a alto caudal puede perjudicar a las células, aunque se requiere continuamente una cierta cantidad de suministro de oxígeno para conseguir un desarrollo óptimo. Otras dificultades son que la sedimentación de las células es un proceso que exige tiempo (aproximadamente 24 horas), las células sedimentadas pueden estar expuestas a un medio ambiente desfavorable en términos de pH y factores nutricios, y sólo puede separarse por drenaje el 95% del medio usado sin riesgo de perder una cantidad importante de las células. Además, durante la filtración de la cosecha de virus, los desechos asociados a las células ejercen un efecto de relleno de poros sobre el medio de filtración, y, para conseguir una filtración de acción esterili-

5
zante, tiene que ser baja la proporción de volumen filtrado/
área de filtración. Esto puede causar pérdidas importantes
(hasta el 50%) de antígeno viral, a causa de la absorción
de virus, tanto sobre el medio filtrante, particularmente
si contiene amianto, como sobre los desechos celulares re-
tenidos. Además, el filtro-prensa de grandes planchas ver-
ticales que se requiere para dar una filtración adecuada
causa usualmente pérdidas importantes de volumen, y, al no
ser un sistema cerrado herméticamente, el goteo consiguien-
te constituye un peligro serio de enfermedad.

10
Por lo tanto, un objeto de la presente invención
es proporcionar un sistema con el que pueden evitarse sus-
tancialmente las desventajas anteriores. Preferiblemente,
el sistema ha de ser aplicable a células tanto del tipo de
15 monocapa como de suspensión, y ha de adaptarse al crecimen-
to de virus para la producción comercial de vacunas.

20
Se ha comprobado ahora que pueden desarrollarse
células ventajosamente en un cuerpo o lecho de soporte sólido,
que o bien es poroso o está en un estado de partículas
que da suficientes vacíos o cavidades interiores para inmo-
vilizar y desarrollar las células, y para permitir que los
medios líquidos pasen a través del soporte sólido e inter-
actúen sobre las células.

25
Por lo tanto, según la presente invención en
uno de sus aspectos, se proporciona un sistema de cultivo

de células, que comprende células eucarióticas vivas, tales como los de origen humano o animal, o micofitos dispersados en un cuerpo o lecho de soporte sólido, soporte que consta de un material poroso o en partículas capaz de retener las células, permitiendo al mismo tiempo que los medios líquidos pasen a través de dichas células o tengan contacto con ellas.

El soporte puede proveerse convenientemente en forma de un lecho filtrante, y puede constar de materiales naturales o sintéticos, por ejemplo, silicatos del tipo de tierra de diatomeas, vidrio, o partículas de polímeros. Para este fin pueden ser convenientes, por ejemplo, varios coadyuvantes de filtración de la tierra de diatomeas, tales como Kieselguhr, tierra de infusorios y en particular diatomita. Otros materiales que pueden usarse incluyen la lana de vidrio, las compresas celulósicas, perlas de nylon o de poliestireno. Todos estos materiales son virtualmente insolubles y sustancialmente inertes desde el punto de vista biológico.

El tamaño de los poros, o el espacio disponible para el crecimiento de las células dentro de un lecho de materiales en partículas, puede elegirse adecuadamente y ajustarse a las necesidades. Frecuentemente es ventajoso seleccionar un "tamaño de retención", que indica la capacidad filtrante del material que retendría de modo efectivo

las células pero permitiría caudales rápidos de paso para líquidos. Así pues, pueden usarse convenientemente tierras de diatomeas con características comprobadas de retención de partículas de 0,1 micras a 2,00 micras, preferiblemente entre 0,2 micras y 1,2 micras, por ejemplo alrededor de 0,4 micras a 0,6 micras. Los materiales son tratados de modo adecuado para eliminar las impurezas y las fuentes de infección, y se clasifican y fraccionan según su tamaño de partícula y otros requerimientos.

Puede usarse más de un tipo de material de soporte para constituir un soporte adecuado para las células. Así, un sistema de lechos múltiples puede ser ventajoso para aumentar la retención de partículas, y puede comprender por ejemplo capas consecutivas de material con tamaños de retención reconocidos de 0,5, 0,2, 0,5 y 1,2 micras, desde la placa o filtro de soporte perforado básico hasta la parte superior. Si se usa una sola capa, puede tener que proporcionarse aún a la misma una capa superior adicional de bajo tamaño de retención, por ejemplo 0,2 micras, inmediatamente antes de la filtración final, para aumentar la retención de las partículas menores.

En el sistema de cultivo según la presente invención puede incorporarse cualquier tipo de célula adecuada para crecimiento, bien en monocapas o en suspensión. Los tipos de células a esto respecto incluyen los cultivos de

células primarios y secundarios, y los linajes o capas de células diploides y heteroploides de origen mamífero o humano. Son particularmente adecuadas a este fin, por ejemplo, los conocidos linajes de células de riñón de cerdo IBRS2 o el linaje de células de riñón de orina de hamster clone 21 (BHK21). En el caso de células que sólo pueden desarrollarse y usarse en monocapas, el sistema de cultivo es eminentemente adecuado para todas las fases de desarrollo, y también para la propagación subsiguiente de microorganismos, tal como virus. Otras células que pueden propagarse de modo eficiente en cultivos en suspensión pueden ser tratadas primero de esta manera, y después ser incorporadas en el sistema de cultivo según la invención, con el fin de la propagación y recogida del virus. Por lo tanto, en un aspecto particular, el sistema de cultivo antes definido comprende también células infectadas con microorganismos, tales como virus a los que las células son susceptibles. Naturalmente, pueden aplicarse también otros tipos de eucarióticos, por ejemplo microfitos tales como las levaduras, al soporte según la presente invención, en un medio nutriente apropiado.

Para servir de soporte al sistema de cultivo pueden usarse, por ejemplo, filtros tipo de presión horizontales, pero es conveniente usar un filtro de presión Calmic de placas horizontales de gran rendimiento, tal como el filtro Calmic de tipo 45-S-9 E, fabricado por Calmic Engineering

Ltd., Cravo. Este filtro comprende nueve unidades de placas horizontales, cada una de 45 cm de diámetro, que tienen un área total de filtración de 1,26 m². Cada unidad de placa comprende una placa perforada de acero inoxidable asentada sobre una placa ondulada de acero inoxidable. Durante el uso puede emplearse una lámina de soporte, por ejemplo de papel o rayón, sobre la placa perforada, para sujetar el lecho filtrante.

En la preparación del lecho de cultivo, pueden bombearse sucesivamente suspensiones de las calidades apropiadas del material de soporte, a partir de un recipiente conveniente y a través del filtro de placas, con lo que el soporte es retenido sobre la placa. Para cada placa, la suspensión es recirculada varias veces hasta que el líquido de filtración es transparente, dejando el espesor requerido de lecho de soporte sobre la lámina de soporte o capa anterior, que por ejemplo puede ser de aproximadamente 8 mm a 20 mm, preferiblemente 10 mm a 14 mm, y lo más preferiblemente 12 mm.

Usualmente, una capa aislada consta de material que tiene un tamaño de retención reconocido de partículas relativamente grande, por ejemplo 0,75 a 2,0 micras, preferiblemente 1,2 micras, y, en el caso de un sistema de lecho múltiple, las capas subsiguientes son de un tamaño de retención de partículas relativamente pequeño, por ejemplo 0,1 a

0,75 micras, y convenientemente 0,2 a 0,5 micras.

El recipiente de cultivo puede ser del tipo convencional, provisto de un agitador y de medios para medir y controlar el pH, la temperatura, y para introducir aire u oxígeno para airear el medio. Puede estar provisto también de un electrodo de oxígeno, que mide la tensión de oxígeno disuelto en el medio de cultivo y por tanto puede usarse como se describe más adelante para determinar la duración del período de desarrollo del virus.

Puede usarse cualquier medio de cultivo conocido como adecuado para el crecimiento de las células y/o de los microorganismos, por ejemplo virus asociados con las células, tales como Medio Basal Eagles (*Science*, 122, 501 (1955)), o Medio de Eagles modificado (*Virology*, 16, 147 (1962)). Los medios pueden contener también, por ejemplo, 10% en vol./vol. de suero bovino para el crecimiento del linaje de células en suspensión BHK21, y una proporción reducida de suero, por ejemplo 1% de suero, para el crecimiento de virus de la glosopeda sobre este linaje de células.

La glosopeda (denominada aquí en adelante FMO) es causada por una variedad de tipos de virus antígenamente distintos, varios de los cuales pueden encontrarse en regiones particulares. Por ejemplo, los tipos O, A y C se dan en Europa y Sudamérica, los tipos SAT1, SAT2 y SAT3 se dan en Sudáfrica, y los tipos O, A, Asia I y SAT1 se encuentran

en el Próximo Oriente. Las cepas siguientes de virus de FMO se han encontrado hasta ahora adecuadas para el desarrollo según la presente invención: A Pando, O BPS 1860, SAT1 Rho-5/66, SAT2 Swz. 1/69 y SAT3 Bco 1/65.

5 La invención puede ponerse en práctica de dos maneras, que dependen de si el sistema de células ha crecido en un cultivo en suspensión o en monocapa. En el primer caso, las células son propagadas en cultivo sumergido en un recipiente agitado del modo convencional, y filtradas y retenidas sobre el lecho cuando las células han alcanzado su concentración máxima. Por otro lado, las células que sólo son adecuadas para el cultivo en monocapa pueden ser propagadas ventajosamente dentro del sistema de cultivo. Así, en el último caso, el medio de desarrollo apropiado en el recipiente de cultivo puede ser inoculado con un germen de células, y después ser hecho circular inmediatamente a través del lecho de soporte previamente preparado, con lo que las células son embebidas e inmovilizadas dentro del lecho. El medio de cultivo se hace circular después continuamente durante todo el período de desarrollo de las células. En ambos tipos de casos puede añadirse después al recipiente de cultivo un medio adecuado para el crecimiento del virus, y las células ser inoculadas con el virus. El medio se hace circular de nuevo continuamente a través del lecho, de modo que el virus puede propagarse en las células

10

15

20

25

bebidas en el lecho de soporte. En cuanto el virus rompe las células, los deechos formados con ello quedan en el lecho de soporte, y el virus es puesto en libertad en el medio.

5 Aunque no puede observarse directamente el crecimiento de las células dentro del soporte, el desarrollo puede vigilarse fácilmente por medio de la utilización de glucosa. El período de crecimiento del virus puede determinarse indirectamente de los valores tomados del electrodo de oxígeno, que dan la tensión de oxígeno disuelto (pO_2) en el medio de cultivo. Así, en las etapas iniciales del cultivo del virus, la absorción de oxígeno por las células metabolizantes es mayor que la velocidad de disolución de oxígeno en el medio de cultivo, y por consiguiente descendiendo la pO_2 del oxígeno disuelto. A medida que mueren células como resultado de infección por virus, hay una demanda de oxígeno continuamente decreciente para el metabolismo celular, que finalmente es menor que la velocidad de disolución de oxígeno, de modo que la pO_2 de oxígeno disuelto aumenta. Por lo tanto, este cambio puede usarse para la vigilancia y control de la etapa de propagación del virus, y se ha encontrado que es ventajoso recolectar el cultivo de virus cuando la pO_2 de oxígeno disuelto en el medio de cultivo está en equilibrio aproximado con el valor de pO_2 para las condiciones de saturación del aire.

La secuencia general de las operaciones en la práctica de la presente invención, tal como se ilustra por las células capaces de crecer en cultivos en suspensión, es como sigue. El cultivo de células se inicia en el recipiente agitado del modo normal, siendo el pH del medio de aproximadamente 7,4 y la temperatura de aproximadamente 35°C en la mayoría de los casos. Después se prepara un lecho de soporte bombeando una suspensión acuosa de los gránulos apropiados de material de soporte, por ejemplo tierra de diatomeas, sucesivamente, a través de un filtro apropiado, que trabaja preferiblemente bajo presión, y el sistema es esterilizado y mantenido en este estado hasta que se requiere. Cuando las células han alcanzado su concentración máxima, el cultivo de células se hace pasar a través del lecho a un caudal de aproximadamente 20 litros/minuto, con lo que la mayoría de las células son inmovilizadas en el lecho de soporte. El medio de cultivo, y cualquier célula no atrapada de este modo, son bombeados de nuevo al recipiente de cultivo y circulados de nuevo a través del filtro, hasta el momento en que se encuentra que menos del 10% de las células, preferiblemente menos del 5%, está atravesando el sistema. Esto puede determinarse indirectamente por recuentos celulares a intervalos repartidos en toda la etapa de recirculación, con muestras tomadas del líquido de filtración en cuanto sale del filtro. El líquido de filtración es bombeado después al desagüe, dejando, no obstante,

las células cubiertas por el medio retenido en el filtro, hasta que se comienza la etapa de desarrollo del virus.

5 Con el fin de que el virus se desarrolle, se introduce, y se hace pasar a través del sistema de cultivo de células, un nuevo medio, usualmente con una composición diferente. Después puede introducirse un virus de siembra apropiado, al que las células son susceptibles, para infectar el cultivo. Una vez que las células se rompen por la población de virus multiplicada, es decir que ha tenido lugar el efecto citopático, queda en libertad un gran número de virus, y son arrastrados por el medio.

10 El medio que contiene las partículas de virus separadas de este modo de los desechos celulares puede ser almacenado a continuación, o preferiblemente ser sometido a filtración, extrayendo del medio cualquier contaminación bacteriana. El antígeno viral puede ser desactivado después con un agente desactivador adecuado, tal como formaldehído, o, especialmente, acetilacetilamina, y ser incorporado en una vacuna, que preferiblemente comprende un condyuvante tal como hidróxido de aluminio, combinado ventajosamente con saponina.

20 Por tanto, la invención proporciona, en otro aspecto, un procedimiento para preparar y mantener un sistema de cultivo de células, tal como se ha definido anteriormente, que comprende las operaciones de

25

(a) preparar un lecho de soporte a partir de una suspensión de material poroso o en partículas,

(b) aplicar una suspensión líquida de células eucarióticas al lecho,

5

(c) permitir que se establezcan por sí mismas las células retenidas en el lecho,

10

(d) hacer circular medio nutriente a través del lecho, con lo que se suministran sustancias nutrientes a las células, y los productos metabólicos y de degradación son extraídos en el líquido que sale del lecho.

En particular, el procedimiento comprende también las operaciones adicionales de

(e) infectar las células con un microorganismo al que son susceptibles las células,

15

(f) cultivar el microorganismo en un medio nutriente,

(g) separar el microorganismo de los desechos de las células, y

20

(h) si es necesario, eliminar la contaminación bacteriana por filtración.

El procedimiento es especialmente adecuado para desarrollar virus en linajes de células, y por lo tanto puede usarse ventajosamente para proporcionar vacunas virales, tras una desactivación apropiada si es necesario.

25

En otro aspecto particular, la presente inven-

ción proporciona una vacuna, que es preparada por un método que comprende las operaciones antes definidas. Es ventajoso que el virus usado en los sistemas de cultivo, en los métodos, y en las vacunas, sea un virus de FMD.

5

Los métodos y sistemas recomendados según la invención evitan la etapa de sedimentación, que en la que las células son mantenidas frecuentemente, en las técnicas convencionales, en un medio ambiente desfavorable durante períodos prolongados. Ahora, la eliminación de medio celular usado puede ser rápida y más o menos completa. Además, el cambio de cultivo de células al medio de desarrollo de virus puede ser fácil y rápido, y puede evitar la contaminación cruzada de los dos medios, que ocurre frecuentemente con el sistema convencional. Las células pueden lavarse convenientemente entre unas etapas y otras, si es necesario. Como las células y los desechos celulares quedan retenidos en el lecho de soporte, la filtración previa, que es esencial para conseguir altas velocidades de flujo en la etapa final de filtración esterilizante de las bacterias, es incorporada ventajosamente en la etapa de crecimiento del virus, con un ahorro potencial de varias horas.

10

15

20

25

Es importante que las sustancias nutritivas deseadas sean añadidas siempre que se precise el medio en recirculación, y que el medio pueda someterse a un burbujeo con aire al caudal máximo necesario, sin riesgo de deterioro

físico para las células. Además, el método puede ponerse en práctica en un sistema cerrado, que puede esterilizarse, por ejemplo, por inyección de vapor de agua, y por lo tanto no hay ningún peligro de enfermedad derivado de las gotas y salpicaduras que tienen lugar con las técnicas convencionales.

La invención se describirá ahora más particularmente con referencia a la Figura, que muestra esquemáticamente la interconexión de un filtro de presión que contiene un lecho de soporte con un recipiente de cultivo y el equipo asociado.

En la figura se muestra un recipiente convencional (A) de cultivo, equipado con un sistema de electrodo (B) y medios para bombear materiales desde el recipiente, a través de una bomba (C), a un filtro prensa (D) que sujeta a un lecho de soporte (E). Cartuchos filtrantes (F) y filtros de membrana (G) sirven para filtrar la coucha de virus antes de pasarla al depósito (H) de desactivación.

Ejemplo 1

Preparación de los lechos filtrantes de tierra de diatomeas.

Los lechos filtrantes usados en la práctica de la presente invención eran de tres clases:

- (a) se preparó un único lecho bombeando una suspensión acuosa de 3000 g de Dicalite 4200 de tamaño de retención de partículas de 1,2 mi-

cras, a través del orificio central de las placas horizontales de un filtro prensa Calmic 45-8-9, y bajando a través de cada placa individual, dejando así una capa de Dicalite sobre cada placa. El sistema de filtración fue esterilizado después por inyección de vapor de agua.

Inmediatamente antes de la filtración de la cosecha de virus, se añadió a ésta una cantidad de 1500 g de Superaid esterilizada de tamaño de retención de partículas reconocido de 0,2 micras, como alimentación de consistencia.

(b) Se preparó un lecho aislado como en (a) bombeando 4000 g de Dicalite a través del filtro prensa. Al lecho de soporte se añadieron directamente 500 g de Superaid esterilizado, inmediatamente antes de la filtración esterilizante.

(c) Se preparó un lecho múltiple bombeando las siguientes tierras de diatomeas a través del filtro prensa, en el orden dado: 1000 g de Hyflo Supercel de tamaño de retención de partícula reconocido de 0,5 micras; 1000 g de Superaid, 2000 g de Hyflo Supercel y 1000 g de Dicalite 4200, obviando este sistema la necesidad de añadir posteriores cantidades de tierras de diatomeas al final de la etapa de cultivo del virus.

5 . El filtro prensa Calmic fue esterilizado por inyección de vapor de agua a $1,37 \times 10^5$ newton/metro² y mantenido bajo una presión positiva de aire estéril hasta que fue preciso. Durante su uso, la temperatura del filtro fue controlada haciendo circular agua a través de la cámara del filtro.

Ejemplo 2

Producción de virus de FMD a partir de células en suspensión

10 BHK 21 mantenidas en el lecho de soporte.

15 Un cultivo de 650 litros de un medio que contenía aproximadamente 7×10^5 células de riñón de oría de hamster clonizada (BHK21) fue iniciado en un recipiente cerrado de cultivo de 700 litros, que estaba adecuadamente para controlar el pH, para la adición de diversas sustancias nutrientes durante los períodos de cultivo de las células y de crecimiento del virus, y con un electrodo de oxígeno para permitir determinar la tensión de oxígeno disuelto (pO_2).

20 El medio de cultivo usado era Medio de Eagles modificado (Virology, 16, 147 (1962)) al que se había añadido 10% en vol./vol. de suero bovino. La temperatura del cultivo de células se mantuvo a 35°C y se fijó en este valor \pm 0,25°C, y la velocidad de agitación, por medio de una paleta de movimiento de vaivén, se ajustó a 36 carreras por minuto.

25

Se mantuvo un flujo de aire a un caudal de 5 l/min a través de la parte superior del medio, y el pH se ajustó a 7,4 y se mantuvo automáticamente en ese valor en $\pm 0,03$ unidades de pH, por medio de un flujo de dióxido de carbono gaseoso de 10 l/min, burbujeados a través del medio, o por adición de disolución 4 molar de hidróxido de sodio. Se hizo burbujear automáticamente un flujo adicional de 15 l/min a través del medio de cultivo cuando los valores leídos en el electrodo de oxígeno indicaron que ello era necesario.

La concentración máxima de las células, aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/ml, fue alcanzada al cabo de 50 horas, y el cultivo de células fue hecho circular después a 20 l/min tres veces a través del filtro de lechos múltiples preparado en el Ejemplo 1(c). Las determinaciones de recuento celular, en muestras tomadas del medio nada más salir del filtro a intervalos de 15 minutos, indicaron que en esta etapa el 96% de las células a la concentración máxima habían sido inmovilizadas sobre el lecho de soporte. El medio agotado, sustancialmente exento de células, fue bombeado después al desagüe que salía del lecho de soporte cubierto por el medio, sin embargo, hasta la etapa de cultivo del virus.

Al recipiente de cultivo se añadieron 650 litros de medio de cultivo de virus, que comprendía Medio de Eagle modificado que contenía 1% en vol./vol. de suero bovino, y se aumentó la temperatura a 35°C. El medio de cultivo de

5 células retenido en el filtro fue desechado en el desagüe,
y se comenzó la circulación del medio de virus a través del
filtro. El medio del recipiente de cultivo fue inoculado
después con 2000 ml de suspensión de una capa de virus de
FMD denominada Pando Tipo A, que había sido adaptada para
desarrollarse en células BHK21. El medio inoculado se re-
circuló a través del filtro durante aproximadamente 48 ho-
ras a un caudal de 20 l/min, con lo que el número de cambio
de medios en el filtro fue de aproximadamente 20/hora, y en
10 el volumen de cultivo total de aproximadamente 2/hora. La
velocidad con la que el medio fluía realmente a través del
lecho de soporte era de aproximadamente 1,8 cm/min. El pH
del medio fue controlado en un valor de 7,4 por inyección
automática de aire y dióxido de carbono gaseosos a través
15 del medio.

El virus fue propagado en las células inmovili-
zadas en el lecho de soporte hasta una concentración de $10^{7,5}$
unidades formadoras de placas (pfu)/ml de fluido de cultivo,
tomándose muestras para ensayo de placas del recipiente de
20 cultivo, a intervalos regulares durante el día. La concen-
tración de fijación efectiva máxima fue de 1/12.

El final del período de cultivo de virus fue
determinado controlando el pO_2 en el medio de cultivo, y el
cultivo fue recolectado cuando el valor de pO_2 había aumen-
25 tado hasta un valor igual a las condiciones de saturación

5 del aire. El medio de filtro se devolvió después al recipiente de cultivo por medio de aire a presión, y el filtro fue aislado del sistema. La cosecha de virus existente en el medio fue bombeada a través de un sistema de filtración en dos etapas, de grado esterilizante de bacterias, que había sido esterilizado previamente por inyección de vapor de agua.

10 En la primera etapa, el medio de cultivo de virus fue ajustado a un pH de 7,6 con tampón de glicina 2 molar, y después fue filtrado a temperatura ambiente y a un caudal de 6,8 l/min a través de dos cartuchos filtrantes Balston de profundidad (47,5 cm x 3 cm) de fibras de vidrio aglutinadas. Los cartuchos filtrantes, que tenían un tamaño de retención de partículas reconocido de 0,35 micras, fueron
15 dispuestos en paralelo para dar un área de filtración de 1500 cm². En la segunda etapa, el medio que salía de los cartuchos filtrantes era bombeado a la misma velocidad, a una presión de 4,8 - 6,2 x 10⁴ N/m², a través de filtros de membrana Schleicher y Schüll, tipo 20 (20 cm x 20 cm),
20 que tenían un tamaño reconocido de retención de partículas de 0,22 micras. Esto dió un área efectiva de filtración de 6500 cm², o aproximadamente 100 ml de líquido de filtración/cm² de área de filtración.

25 El antígeno viral así obtenido fue inactivado en el recipiente de inactivación previamente esterilizado,

por tratamiento con acetiltilenimina (ATI), y se formuló en una vacuna que contenía 2 ml de líquido de filtración de virus inactivado, 25% en volumen de hidróxido de aluminio de 2% en peso/vol y 5 mg de saponina, por dosis de vacuna para ganado. La vacuna fue sometida a ensayo en ganado por inoculación con virus vivo 21 días después de la vacunación, y dió un resultado de potencia de 29,7 DP₅₀/dosis.

Ejemplo 3

Producción de virus de FMD a partir de células en suspensión BHK21 mantenidas en el lecho de soporte.

Según el procedimiento del Ejemplo 2, la cepa SAT.2 Swz. 1/69 de FMD fue cultivada, filtrada, inactivada y formulada en forma de vacuna. Sometida a ensayo en ganado, la vacuna mostró un valor de potencia de 29,3 DP₅₀/dosis, calculado a partir del valor de las concentraciones del anticuerpo en circulación presente en el ganado 21 días después de la vacunación.

Ejemplo 4

Se examinó el desarrollo de virus por los métodos descritos, usando tanto técnicas de lecho sencillo como de lecho múltiple, usando una variedad de capas de FMD. En la tabla siguiente se muestran ejemplos de la capacidad específica de infección y de los valores de fijación máxima efectiva obtenidos con las distintas cepas empleadas:

	<u>Escala litros</u>	<u>Lecho de diatomita</u>	<u>Capa de virus</u>	<u>Capacidad de infección ($10E_{10}$ pfu/ml)</u>	<u>Fijad. efect. (crp/ml)</u>
	30	Sencillo	SAT.1-Rho 5/66	6,7	1/10
	"	"	O-BFS 1880	6,8	1/10
	"	"	"	6,4	1/10
5	650	"	A Pando	6,3	1/10
	"	"	"	6,8	1/10
	"	Múltiple	"	7,5	1/10
	"	"	"	7,3	1/8
10	"	"	SAT.1-Rho 5/66	6,4	1/6
	"	"	"	7,0	1/8
	"	"	Sat.2-SWZ. 1/69	7,1	1/6
	"	"	"	6,1	1/8
	"	"	SAT.3-BEC 1/65	7,2	1/5
15	"	"	"	6,8	1/6

Ejemplo 5

20

Producción de virus de FMD a partir de un linaje de células
de riñón de cerdo IBRS 2 mantenidas en el lecho de soporte.

25

Se repitió el procedimiento de los Ejemplos 2 y 3 usando en cambio células IBRS 2 para soportar una capa adaptada adecuadamente de virus de FMD. Se obtuvo una vacuna que tenía un valor de potencia satisfactorio, como se determinó por ensayo inoculando ganado con virus vivo 21 días.

después de la vacunación.

Ejemplo 6

Desarrollo de células BHK21 en el interior del lecho de soporte en el filtro.

5

-

10

15

20

25

En un recipiente de cultivo de 700 litros se introdujeron 500 litros de medio de cultivo de células que comprendía medio de Eagles modificado que contenía 10% en vol./vol. de suero bovino, el medio fue llevado a 35°C, y después fue inoculado con un germen de células, para una concentración inicial de aproximadamente 7×10^5 células/ml de células de monocapa de riñón de cría de hamster clonizadas (BHK21). El cultivo inoculado, juntamente con 200 g de Dicalite 4200 de tamaño de retención de partículas reconocido de 1,2 micras, fue bombeado inmediatamente a través de un lecho filtrante esterilizado, preparado según el Ejemplo 1(a), a un caudal de 20 l/min, de modo que prácticamente todas las células fueron depositadas en el lecho de soporte, siendo interdispersadas con las capas de la tierra de diatomeas. El medio de cultivo de células se hizo recircular continuamente durante 48 horas, y las células fueron cultivadas dentro del lecho de soporte, y durante este tiempo la cantidad de glucosa desasimilada fue de 2 g/l. El medio fue bombeado después al desagüe, y se añadieron medio de Virus reciente y germen de inoculación de la cepa O-BPS 1820 del virus de FMD, según el procedimiento del Ejemplo 1.

El virus producido fue filtrado, inactivado y formulado como un componente de una vacuna trivalente, que contenía el equivalente de 2 ml de cada uno de los antígenos de virus inactivados, 25% en volumen de hidróxido de aluminio al 2% en peso/vol., y 5 mg de saponina por dosis para ganado. La vacuna trivalente fue sometida a ensayo en ganado por inoculación con virus vivo 21 días después de la vacunación, y la potencia del componente de O-DFS 1860, producido y descrito en este Ejemplo, era de 15,3 DP₅₀/dosis.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 26 de Abril de 1.972, bajo el número 19387/72, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente

de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

5
10
15
20

1ª.- Un procedimiento mejorado para preparar una vacuna por medio de un sistema de cultivo de células eucarióticas vivas, que comprende las operaciones de: (a) preparar un lecho de soporte o partir de una suspensión de material poroso o en partículas. (b) aplicar una suspensión líquida de células eucarióticas al lecho, (c) permitir que las células retenidas en el lecho se establezcan por sí mismas, (d) hacer circular medio nutritivo a través del lecho, con lo cual los nutrientes se suministran a las células y se separan los productos metabólicos y de degradación en el líquido que abandona el lecho, (e) infectar las células con un microorganismo al cual son susceptibles las células, (f) cultivar el microorganismo en un medio nutritivo, (g) separar el microorganismo de los residuos de las células, (h) si es necesario, eliminar la contaminación bacteriana por filtración, y (i) formular los microorganismos en una vacuna de un modo conocido.

2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el cual el microorganismo es un virus.

3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª, en el cual el virus es una cepa del virus de la glosopeda.

25

4a.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2ª ó 3ª, en el cual el virus se inactiva con un agente inactivamente como formaldehído o acetiletilenimina.

5 .

5a.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la vacuna incorpora un coadyuvante.

10

6a.- Un procedimiento según la reivindicación 5ª, en el cual el coadyuvante es hidróxido de aluminio combinado con saponina

7a.- Un procedimiento mejorado para preparar una vacuna por medio de un sistema de cultivo de células eucarióticas vivas.

15

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

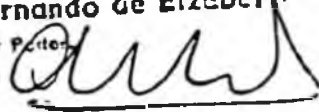
Esta Memoria consta de veintisiete hojas escritas a máquina por una sola cara.

20

Madrid, 04.ENE.1976.

P.A.

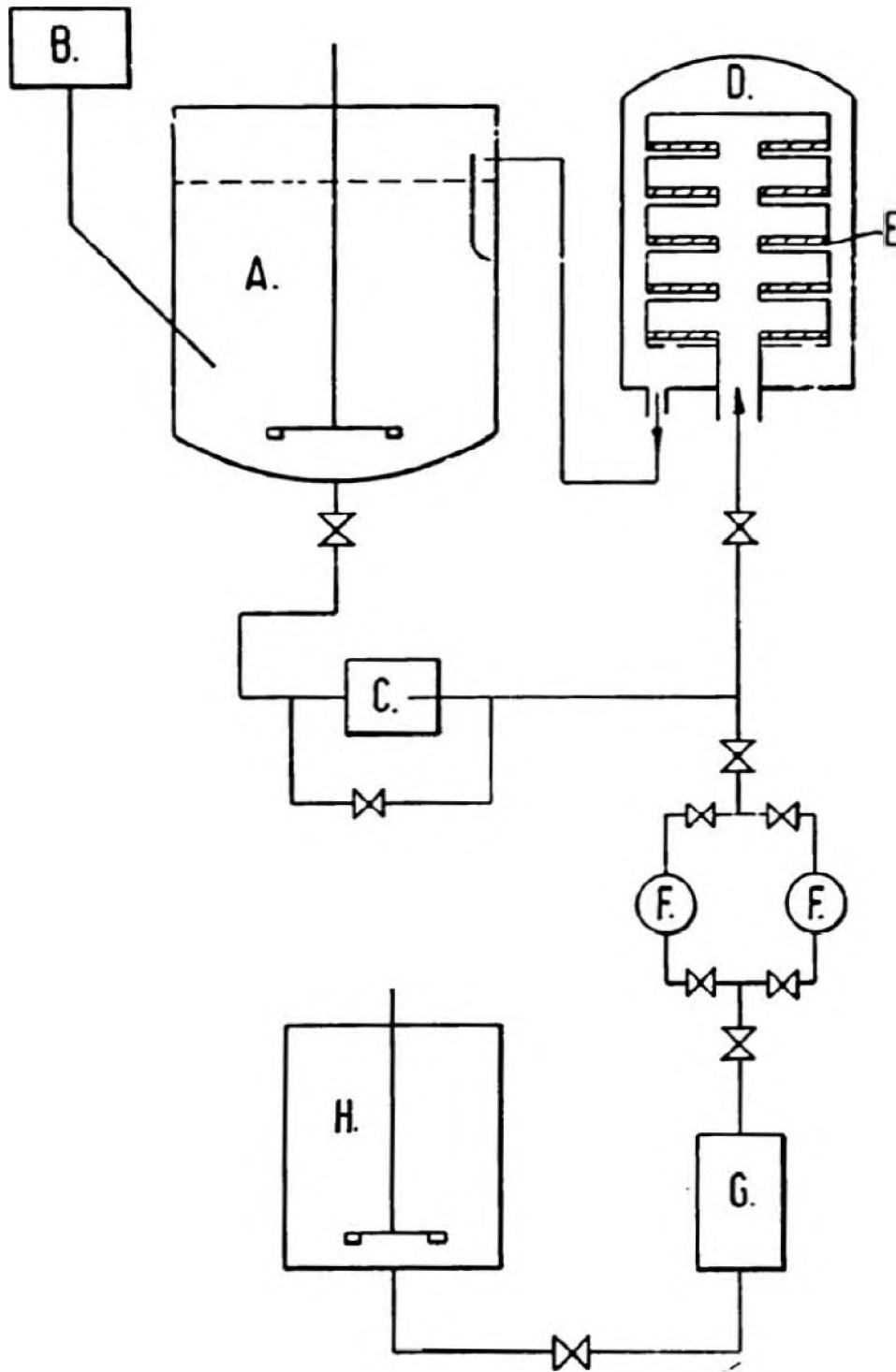
Fernando de Elzaburu
Por Autor



25

10.12.76

JMM/.



Ernesto de Eizaguru
P. D. 1933