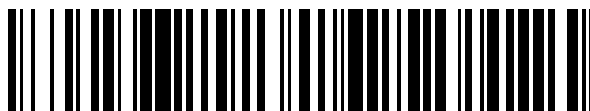


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 294**

51 Int. Cl.:

B01F 7/00 (2006.01)

C12M 1/02 (2006.01)

C12M 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2010 E 10736633 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2456547**

54 Título: **Sistema de agitador**

30 Prioridad:

24.07.2009 EP 09009639

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.07.2014

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**ALISCH, ALEXANDER;
JENZSCH, MARCO;
POHLSCHIEDT, MICHAEL;
THIELE, JOERG y
WALLERIUS, CLAUS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 478 294 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema de agitador

5 En el presente documento se informa de un sistema de agitador para el cultivo de células animales que consiste en una combinación de al menos un elemento de transporte radial y al menos un elemento de transporte axial, en el que al menos tres elementos de transporte deben estar presentes y el elemento más alto es un elemento de transporte axial. Los elementos de transporte están dispuestos con una cierta separación los unos sobre los otros en un árbol. En una realización particular, el sistema de agitador consiste en dos agitadores de disco como elementos
10 de transporte radial y un agitador de pala inclinada como elemento de transporte axial en el que el agitador de pala inclinada está dispuesto por encima del agitador de disco en el árbol. El agitador según la invención consigue, entre otras cosas, una mezcla más suave y mejor del medio de cultivo para el cultivo de células procariotas y eucariotas.

Antecedentes tecnológicos

15 La producción de proteínas recombinantes, vacunas y anticuerpos con la ayuda de células procariotas y eucariotas desempeña una función esencial en la producción farmacéutica moderna. Para producir proteínas y anticuerpos postraducionalmente modificados complejos se usan principalmente células derivadas de animal. Sin embargo, el uso de células derivadas de animal plantea altas exigencias al proceso de fermentación debido a las características específicas de estas células tales como, por ejemplo, el medio de cultivo, la sensibilidad hacia la limitación e inhibiciones (por ejemplo, por lactato, CO₂, amonio etc.), la membrana externa sensible (tensión de cizallamiento),
20 las bajas tasas específicas y la sensibilidad hacia variaciones en las condiciones de cultivo (por ejemplo, debido a faltas de homogeneidad locales, variaciones de pH, variaciones de pO₂, etc.). Estas propiedades tienen que tenerse en cuenta cuando se diseñan biorreactores y para el control de procesos.

25 En los últimos años se han desarrollado diversos tipos de reactores para cultivar células. Independientemente del tipo, el reactor debe poder cumplir las siguientes funciones técnicas básicas: suspensión adecuada, además de homogenización, transporte de material y de calor adecuado, además de una tensión de cizallamiento mínima sobre las células. El reactor de tanque con agitación es especialmente adecuado para uso industrial. En este reactor, la energía necesaria para cumplir las funciones básicas se introduce por agitación mecánica.
30

Se conoce de la bibliografía que las células de mamífero son mucho más sensibles a las fuerzas de cizallamiento que los microorganismos. Esto se atribuye normalmente a la ausencia de una pared celular (véase, por ejemplo, Glacken, M.W. y col., Trends Biotechnol. 1 (1983) 102-108; van der Pol, L.A. y Tramper, J. Enzyme Microb. Technol. 17 (1995) 401-407; Nienow, A.W., Cytotechnol. 50 (2006) 9-33; Cervantes, M.I. y col., Chem. Eng. Sci. 61 (2006) 8075-8084; Frahm, B. y col., Chem. Ing. Tech. 79 (2007) 1052-1058). La sensibilidad al cizallamiento es el motivo de las considerables dificultades en la manipulación técnica de biorreactores de cultivo en suspensión. Los reactores de tanque con agitación se usan normalmente en procedimientos de producción de biotecnología para alimentar las células ya que éstos pueden ser más flexiblemente controlados y usados con respecto a las condiciones de procedimiento requeridas. Además de la geometría de los sistemas y la reología del material agitado, las funciones básicas anteriormente mencionadas se cumplen principalmente por los sistemas de agitadores que se usan.
40

Los motivos principales de la tensión de cizallamiento sobre las células que van cultivarse son, entre otros, las fuerzas de cizallamiento generadas por el sistema de agitador. Éstas tienen un intenso efecto, especialmente en la región de las palas de agitador, además de la de los tabiques deflectores. Según la teoría de Kolmogorov, los macro-vórtices generados por los agitadores se descomponen por disipación de energía para formar pequeños micro-vórtices. Cuando su tamaño se convierte en el mismo que el tamaño de las células que van a fermentarse, las células pueden dañarse (Cherry, R.S. y Papoutsakis, E.T., Biotechnol. Bioeng. 32 (1988) 1001-1014; Papoutsakis, E.T. y Kunas, K.T., en "Advances in animal cell biology and technology for bioprocess", Spier, R.E. y col. (Eds) Butterworth, Sevenoaks, Kent, UK (1989) 203-211; Kunas, K.T. y Papoutsakis, E.T., Biotech. Bioeng. 36 (1990) 476-483; Zhang, Z.B. y Thomas, C.R., Gen. Eng. Biotechnol. 13 (1993) 19-29; Nienow, A.W., Cytotechnol. 50 (2006) 9-33).
50

Se han hecho recomendaciones del uso de agitadores en cultivos de células animales en suspensión (véase, por ejemplo, Feder, J. y Tolbert, W.R., Sci. Am. 248 (1983) 24-31; fabricantes de agitadores, por ejemplo, Ekato, Chemineer, Bioengineering, Zeta) que enfatizan la generación de bajos flujos de cizallamiento como un criterio importante. Por tanto, se ha desarrollado un gran número de agitadores de baja fuerza de cizallamiento para reducir el daño (por ejemplo, "impulsor de oreja de elefante" o "impulsor de flujo de Max").
55

En un artículo en línea ("Axial flow down-pumping agitators in biological processes", abril de 2009, <http://www.postmixing.com/mixing%20forum/Micro/Liq-Solid-Gas/down-pumpers.htm>) se muestra que una combinación de agitadores que consiste en diferentes agitadores produce una transferencia de masa mejorada. Con respecto a células animales se recomienda el uso de tres transportadores axiales para lograr los mejores resultados en el cultivo celular. Fugasova, M. y col., (Chem. Eng. Sci. 62 (2007) 1650-1669) informan de correlaciones en la transferencia de masa para agitadores de múltiples etapas. La transferencia de masa entre la fase gaseosa y la fase
60
65

líquida usando un sistema de agitador de tres etapas en un biorreactor se informa por Puthli y col. (Puthli, M.S. y col., Biochem. Eng. J. 23 (2005) 25-30).

5 El uso de un fermentador para cultivar células bacterianas con un árbol giratorio vertical al que están unidos preferentemente dos o tres agitadores Rushton se informa en el documento US 5.633.165. Nienow, A.W., (Cytotechnol. 50 (2006) 9-33) recomienda un sistema de reactor para el cultivo de células animales con una relación H/D de 1 a 1,3 y el uso de dos agitadores de hidroplaneador de transporte hacia abajo (transportadores axiales) con un aireador que está montado debajo del agitador más bajo.

10 En el documento US 2004/0234435 se informa de un aparato y procedimiento de producción de ácidos carboxílicos aromáticos. Se informa de un reactor de polimerización continuo en el documento US 4.438.074. En el documento US 2004/0087814 se informa de un sistema de agitación para reactores de oxidación de alquilbenzeno. Un sistema de mezcla se informa en el documento US 5.972.661. En el documento US 6.250.769 se informa de un aparato de agitación con mezcladora estática o medios generadores de turbulencia. Los agitadores se informan en el
15 documento US 5.198.156. En el documento US 4.779.990 se informa de un aparato impulsor.

Resumen de la invención

20 En el presente documento se informa de un sistema de agitador que comprende al menos un elemento de transporte radial y al menos un elemento de transporte axial en el que al menos tres elementos de transporte deben estar presentes y el elemento más alto de transporte es un elemento de transporte axial. En comparación con los agitadores que normalmente se usan para cultivar células animales sensibles al cizallamiento, el sistema de agitador que se informa en el presente documento puede conseguir una mezcla más rápida del medio de cultivo (por ejemplo, con el fin de introducir agentes correctores tales como ácidos o bases mediante la superficie del líquido) sin
25 exponer las células en el medio de cultivo a alta tensión de cizallamiento.

En una realización, el sistema de agitador consiste en 3 a 5 elementos de transporte. En otra realización, el sistema de agitador consiste en 3 ó 4 elementos de transporte. En otra realización, los elementos de transporte del sistema de agitador están dispuestos a una cierta distancia los unos encima de los otros en un árbol vertical. En otra
30 realización más, los elementos de transporte están dispuestos en el árbol con la misma distancia entre sí. En otra realización más, la distancia entre los elementos de transporte es entre uno y dos diámetros del elemento de transporte d . En una realización, los elementos de transporte del sistema de agitador están dispuestos en un árbol vertical por lo que el elemento más alto de transporte está a una distancia definida del elemento de transporte inferior y está a una distancia suficiente de la superficie del líquido del medio de cultivo cuando el sistema de
35 agitador opera en un recipiente de cultivo lleno de medio de cultivo, por lo que el sistema de agitador garantiza la mezcla del medio de cultivo. En una realización, la distancia de la superficie del medio de cultivo es la misma que la distancia entre el elemento de agitador más alto y el elemento de agitador que es el segundo desde la parte superior. En una realización, todos los elementos de transporte tienen el mismo diámetro d .

40 Según la invención, el sistema de agitador consiste en dos elementos de transporte radial y un elemento de transporte axial, en el que el elemento de transporte axial está dispuesto en el árbol de agitador por encima de los elementos de transporte radial.

45 En una realización, los elementos de transporte radial tienen entre 2 y 8 palas de agitador y el elemento de transporte axial tiene entre 2 y 10 palas de agitador. En otra realización, los elementos de transporte radial tienen 3 a 6 palas de agitador y en otra realización 6 palas de agitador. En una realización, el elemento de transporte axial tiene 2 a 6 palas de agitador y en otra realización 4 palas de agitador. En otra realización, todos los elementos de transporte radial y todos de transporte axial tienen el mismo número de palas de agitador. En una realización, todos los elementos de transporte tienen 4 ó 6 palas de agitador. En una realización, el elemento de transporte radial es un
50 elemento de transporte radial simétrico. Un "elemento de transporte radial simétrico" es un elemento que tiene una sección transversal simétrica a lo largo del eje longitudinal del elemento, es decir, la sección transversal a lo largo y que incluye el eje de rotación tiene simetría puntual y simetría especular.

55 En una realización, la relación del diámetro del elemento de transporte d con respecto al diámetro del recipiente de cultivo D cuando el sistema de agitador se coloca en el recipiente de cultivo está en el intervalo entre 0,2 y 0,8, en otra realización en el intervalo entre 0,3 y 0,6, en otra realización en el intervalo entre 0,31 y 0,39, o en también una realización aproximadamente 0,34. La relación de la altura de la pala del agitador del elemento de transporte axial h_B con respecto a la anchura de las palas de agitador del elemento de transporte radial b está en el intervalo entre 0,2 y 2,0, en otra realización en el intervalo entre 0,3 y 1,4, o en otra realización en el intervalo entre 0,4 y 1,0. En otra
60 realización, el paso de las palas de agitador del elemento de transporte axial está entre 10° y 80° , en otra realización entre 24° y 60° , o en otra realización entre 40° y 50° con respecto al eje del árbol. En una realización, todos los elementos de transporte tienen una relación del diámetro del elemento de transporte d con respecto al diámetro del recipiente de cultivo D de 0,32 a 0,35.

65 En una realización, el sistema de agitador tiene un número de Newton de 5,5 a 8,0 a un número de Reynolds de $5 \cdot 10^4$ a $5 \cdot 10^5$. En otra realización, el sistema de agitador tiene un tiempo de mezcla $\theta_{0,95}$ de aproximadamente 20

segundos a una entrada de potencia de aproximadamente 0,05 W/kg y de aproximadamente 10 segundos a una entrada de potencia de aproximadamente 0,3 W/kg.

Otro aspecto como se informa en el presente documento es un dispositivo que comprende un sistema de agitador que se informa en el presente documento y un recipiente de cultivo. En una realización, el dispositivo comprende además un módulo de diálisis. En otra realización, el dispositivo es para el cultivo de células animales. En todavía otra realización, el dispositivo comprende

- a) un recipiente de cultivo que es adecuado para recibir un medio de cultivo y células animales que van a cultivarse en su interior,
- b) un árbol a lo largo del eje vertical del recipiente de cultivo,
- c) un sistema de agitador que se informa en el presente documento unido al árbol,
- d) una entrada de gas en la parte inferior del recipiente de cultivo, y
- e) al menos una entrada en la porción superior del recipiente de cultivo por encima de la superficie del líquido para añadir disoluciones correctoras y/o de alimentación.

También un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento de producción de un polipéptido que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido en un recipiente de cultivo que comprende un sistema de agitador que se informa en el presente documento o un dispositivo que se informa en el presente documento,
- b) recuperar el polipéptido del medio de cultivo o las células, y
- c) purificar el polipéptido y así producir el polipéptido.

En una realización, la purificación es un procedimiento cromatográfico de múltiples etapas. En otra realización, la purificación comprende una cromatografía de afinidad, una cromatografía de intercambio catiónico y una cromatografía de intercambio aniónico.

Otro aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento de cultivo de células animales, caracterizado porque las células animales se cultivan en un recipiente de cultivo que comprende un sistema de agitador que se informa en el presente documento.

En una realización, el cultivo es un cultivo semi-continuo. En otra realización, el cultivo semi-continuo es una diálisis. En una realización, el polipéptido es un anticuerpo o un derivado de anticuerpo.

Otro aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un sistema de agitador que se informa en el presente documento para la mezcla de un medio de cultivo. En una realización de los aspectos previos, el medio de cultivo es un medio acuoso que es adecuado para el cultivo de células procariotas y eucariotas. En otra realización, el medio de cultivo es un líquido newtoniano. En una realización, el sistema de agitador opera a una entrada de potencia de 0,01 W/kg a 1 W/kg. En otra realización, el sistema de agitador opera a una entrada de potencia de 0,04 W/kg a 0,5 W/kg. En todavía otra realización, el flujo inducido por el sistema de agitador en el medio de cultivo es un flujo turbulento. En otra realización, el medio de cultivo tiene una viscosidad de 3 mPas*s o menos. En otra realización, la viscosidad es 2 mPas*s o menos.

Otro aspecto como se informa en el presente documento es el uso del sistema de agitador para cultivar células animales o células de hibridoma para la producción de polipéptidos o anticuerpos. En una realización, el cultivo se lleva a cabo en un reactor de tanque con agitación gasificado sumergido. En otra realización, la célula animal es una célula de mamífero. En todavía otra realización, la célula es una célula CHO, una célula BHK, una célula NS0, una célula COS, una célula PER.C6, una célula Sp2/0, una célula HEK 293 o una célula de hibridoma. En todavía otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo contra CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CD33, CD52, EGFR, G250, GD3, HER2, PSMA, CD56, VEGF, VEGF2, CEA, antígeno Lewis Y, receptor de IL-6 o receptor de IGF-1.

Descripción detallada de la invención

La invención se define en las reivindicaciones independientes.

En el presente documento se informe de un sistema de agitador que consiste en al menos un elemento de transporte radial y al menos un elemento de transporte axial, en el que al menos tres elementos de transporte deben estar presentes y por lo que el elemento más alto es un elemento de transporte axial. En comparación con sistemas de agitadores que actualmente se usan para cultivar células animales sensibles al cizallamiento, el sistema de agitador que se informa en el presente documento permite una mezcla más suave y más rápida del medio de cultivo. Un ejemplo de un sistema de agitador que se informa en el presente documento se muestra en la Figura 1. Así, el sistema de agitador que se informa en el presente documento proporciona tiempos de mezcla más cortos y también menos tensión conferida a las células cultivadas sin la necesidad de componentes adicionales complejos tales como

tabiques deflectores, mezcladoras estáticas, generadores de turbulencia, tubos de aspiración u otros medios para dirigir el flujo dentro de un recipiente de cultivo.

Los términos “elemento” o “elemento de transporte”, que pueden usarse indistintamente, indican una unidad (funcional) de palas de agitador que están en una configuración espacial fija entre sí con respecto a distancia y ángulo. Un elemento de transporte radial indica un elemento en el que las palas de agitador no tienen paso con respecto al eje del árbol. Un elemento de transporte axial indica un elemento en que las palas de agitador tienen un paso con respecto al eje del árbol. Las palas de agitador de los elementos de transporte son en una realización placas rectangulares, aunque pueden usarse otras formas geométricas. La dirección de transporte de un elemento se indica con respecto al eje de rotación del elemento. Las palas de agitador de los elementos de transporte pueden no extenderse desde el propio árbol, sino que pueden estar montadas sobre un brazo o un medio equivalente en el árbol. Cada uno de los elementos de transporte consiste en un número definido de palas de agitador. Cada pala está tanto directamente conectada al árbol giratorio como está conectada al árbol giratorio mediante un buje. Cada pala de agitador independiente del elemento de transporte tiene un borde externo y un borde interno. La parte de cada pala del agitador que tiene la máxima distancia al árbol se indica como la punta de la pala. Cada elemento de transporte tiene un diámetro externo y un diámetro interno. Por ejemplo, el diámetro externo de un elemento de transporte axial es la máxima distancia entre las puntas de palas de agitador opuestas y el diámetro interno de un elemento de transporte radial es la mínima distancia entre bordes internos de palas de agitador opuestas.

El término “anticuerpo” indica una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de las diferentes regiones constantes, además de los genes de la región variable de la inmunoglobulina de miriada. Los anticuerpos pueden existir en una variedad de formatos, que incluyen, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, además de cadenas individuales (scFv) o diacuerpos o triacuerpos, como formas monovalentes, divalentes, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes y hexavalentes, además de anticuerpos mono-específicos, biespecíficos, triespecíficos o tetraespecíficos.

Un “polipéptido” es un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, tanto si se producen naturalmente como sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos pueden denominarse “péptidos”, mientras que las moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos de aminoácidos pueden denominarse “proteínas”. Un polipéptido también puede comprender componentes de no aminoácido, tales como grupos hidrato de carbono, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes de no aminoácido pueden añadirse por la célula en la que el polipéptido se produce, y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de su estructura de esqueleto de aminoácido o el ácido nucleico que los codifica. Adiciones tales como grupos hidrato de carbono no se especifican generalmente, pero sin embargo pueden estar presentes.

Los recipientes de cultivo gasificados sumergidos se usan generalmente para cultivar células animales para la producción de polipéptidos o anticuerpos. Un sistema de agitador de transporte puramente axial o de transporte puramente radial de una etapa o de múltiples etapas se usa en su interior. En el presente documento, el término “de transporte axial” indica que el elemento de transporte genera un flujo paralelo al árbol o eje de rotación del elemento que se desvía del elemento. Análogamente, el término “de transporte radial” indica que el elemento de transporte genera un flujo que se desvía del elemento de agitador y que es perpendicular al árbol o eje de rotación del elemento. Esta observación es independientemente del hecho de que el reactor tenga una dimensión espacial limitada y, así, el flujo es desviado en las paredes del reactor y, por otra parte, independientemente del hecho de que el flujo que conduce al elemento de agitador pueda ser diferente. El árbol y también el eje del árbol se extienden a través del eje longitudinal del recipiente de cultivo en el que se usan los elementos de transporte o sistema de agitador. La velocidad de rotación n del elemento se usa como una velocidad característica y el diámetro del elemento d se usa como una longitud característica.

Puede proporcionarse un sistema de agitador mejorado como se informa en el presente documento usando una combinación de elementos de transporte para su uso en el cultivo de células de mamífero. Con el sistema de agitador que se informa en el presente documento pueden lograrse viabilidades, densidades celulares y títulos de producto comparables con al mismo tiempo tensión de cizallamiento reducida para las células cultivadas. Se encontró que el sistema de agitador que se informa en el presente documento puede mejorar la mezcla del contenido del recipiente de cultivo y al mismo tiempo retener la densidad celular que puede conseguirse, por ejemplo, en comparación con un sistema de agitador que consiste en tres elementos de transporte axial (tal como tres agitadores de palas inclinadas). El sistema de agitador que se informa en el presente documento también es particularmente adecuado para mezclar líquidos en o de la superficie del medio de cultivo, por ejemplo, con el fin de introducir agentes correctores tales como, por ejemplo, ácidos, bases, medio nutritivo, antiespumantes o también CO₂ u O₂ mediante la superficie del líquido, y para la rápida mezcla total del medio de cultivo cuando se cultivan células animales.

En la dinámica de fluidos, el número de Reynolds (Re) describe la relación de la fuerza inercial con la fuerza de fricción interna en un sistema hidrodinámico. A partir de éste también pueden hacerse afirmaciones sobre el grado de turbulencia del medio movido. Para líquidos agitados, el número de Reynolds del agitador se define en la Ecuación 1 como

$$Re = \frac{n \cdot d^2}{\nu} = \frac{n \cdot d^2 \cdot \rho}{\eta}$$

(Ecuación 1)

5 El número de Newton (Ne, también denominado número de potencia) describe la relación de la fuerza de resistencia con la fuerza de flujo y es así una medida de la resistencia al flujo de un agitador en un material agitado y se describe en la Ecuación 2:

$$Ne = \frac{P}{\rho \cdot n^3 \cdot d^5}$$

(Ecuación 2)

10 Los números de Ne para diferentes sistemas de agitadores se muestran en la Figura 2.

Los elementos de transporte con un bajo número de Newton, tales como agitadores impulsores o de palas inclinadas, convierten la entrada de potencia más eficazmente en salida hidrodinámica, es decir, movimiento de fluido, que aquellos con un alto número de Newton, tales como turbinas Rushton.

15 Un criterio para evaluar los procedimientos de agitación en procedimientos de cultivo es el tiempo de mezcla. El "tiempo de mezcla" de una mezcla líquido-líquido no homogénea indica el tiempo que se requiere para lograr una homogeneidad definida en el medio de cultivo. Los factores que influyen en el tiempo de mezcla son el grado de mezcla y el sitio de observación. El grado de mezcla depende a su vez de la geometría del reactor, la geometría del agitador, la frecuencia giratoria del agitador y las sustancias de los materiales agitados. Es importante para los procedimientos de cultivo que, en la medida de lo posible, todas las células se suministren óptimamente y uniformemente con los sustratos necesarios (tales como medio nutritivo, O₂) y que los metabolitos (tales como productos sobrantes, CO₂) sean simultáneamente conducidos a otra parte. Esto significa que los depósitos y sumideros que pueden producirse espacialmente, además de temporalmente, en el recipiente de cultivo tienen que ser evitados o al menos minimizados con el fin de evitar daño a las células. Esto puede lograrse, por ejemplo, usando un sistema de agitación mejorado para mezclar el contenido del recipiente. Los procedimientos de mezcla pueden dividirse en los sub-procedimientos micro-mezcla y macro-mezcla. La micro-mezcla se define como el ajuste de concentración molecular debido a difusión o microturbulencias; a diferencia de ésta, la macro-mezcla se define como la mezcla gruesa convectiva producida por el agitador (véase, por ejemplo, Houcine, I. y col., Chem. Eng. Technol. 23 (2000) 605-613; Zlokarnik, M., "Rührtechnik Theorie und Praxis", Springer Publishers, Berlin Heidelberg, 1999). El grado de mezcla puede según Henzler (Henzler, H.-J., "Homogenisieren: Referenz-Rührsysteme und Methoden zur Erfassung der Homogenisierungseigenschaften von Rührsystemen", GVC Fachausschuß Mischvorgänge, 1998) definirse del siguiente modo en la Ecuación 3:

$$\chi_1 = 1 - \frac{\Delta a}{\bar{a}}$$

(Ecuación 3).

35 En esta ecuación \bar{a} se corresponde con la concentración de la sustancia trazadora después de una mezcla teóricamente completa y Δa se corresponde con la máxima diferencia entre las concentraciones locales de la sustancia trazadora a un tiempo t. En general, un grado de mezcla de $\chi_1 = 0,95$ se considera suficiente (véase Henzler, arriba). El coeficiente de mezcla $C_{H0,95}$ como se describe en la Ecuación 4 se basa en este grado de mezcla y es el producto del tiempo de mezcla $\theta_{0,95}$ y la velocidad de rotación del agitador n que se usó. Así, se corresponde con el número de revoluciones del agitador que se requieren después de añadir un agente con el fin de lograr un grado de entremezcla de 0,95.

$$C_{H0,95} = \Theta_{0,95} \cdot n$$

(Ecuación 4).

45 Los coeficientes de mezcla mostrados en la Tabla 1 y en extractos en las Figuras 3 y 4 resultaron de investigaciones del tiempo de mezcla usando el procedimiento de decoloración.

Tabla 1: Coeficientes de mezcla de diversos agitadores

Agitador	H/D	d/D	C _H (Re)
sistema de agitador con dos agitadores de disco convencionales separados (2SSR)	1,6	0,34	78
sistema de agitador con dos agitadores de palas inclinadas separados (2SBR)	1,6	0,34	95
sistema de agitador con tres agitadores de disco convencionales separados (3SSR)	1,6	0,33	77
sistema de agitador con tres agitadores de palas inclinadas separados (3SBR)	1,6	0,33	65,5
sistema de agitador con un agitador de pala inclinada y dos agitadores de disco convencionales (1SBR + 2SSR)	1,6	0,34	38
sistema de agitador con dos agitadores de palas inclinadas y un agitador de disco convencional (2SBR + 1SSR)	1,6	0,34	39

En comparación de las configuraciones, el sistema de agitador que se informa en el presente documento tiene un índice de mezcla promedio de aproximadamente 38 a un número de Reynolds constante en comparación con, por ejemplo, un agitador que consiste en tres agitadores de palas inclinadas separados (3SBR) o en tres agitadores de disco convencionales separados (3SSR) con un índice mezcla promedio de 65,5 y 77, respectivamente. Así, en una realización del dispositivo que se informa en el presente documento, la relación de la altura de llenado del recipiente de cultivo H con respecto al diámetro del recipiente de cultivo D es aproximadamente 1,6. El término "aproximadamente" indica que el siguiente valor a partir de aquí no es un valor exacto, sino simplemente el valor central de un intervalo. En una realización, el término aproximadamente indica un intervalo de +/- 25 % alrededor del valor central, en otra realización de +/- 15 %, y en todavía otra realización de +/- 10 %.

Otro parámetro de procedimiento para el cultivo de células animales es la tensión de cizallamiento aplicada a la célula en el medio de cultivo. Los cultivos de células animales están, entre otras cosas, limitados por la tensión mecánica e hidrodinámica aplicada a las células. La tensión se produce, por una parte, por el propio agitador y, por otra parte, por la aireación de burbujas del medio de cultivo (véase, por ejemplo, Wollny, S. y Sperling, R., Chem. Ing. Tec. 79 (2007) 199-208). Para las regiones de flujo turbulento que son principalmente predominantes en recipientes de tanque con agitación, la tensión hidrodinámica se facilita por el enfoque de tensión de Reynolds según la Ecuación 5 (Henzler, H.J. y Biedermann, A., Chem. Ing. Tec. 68 (1996) 1546-1561):

$$\tau_{turb} = \rho \cdot u'^2 \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Según la Ecuación 5 puede deducirse que la tensión principal es debida a la fluctuación de velocidad turbulenta u' de los elementos de fluido.

La caracterización de la tensión de cizallamiento se llevó a cabo para los sistemas de agitadores en el estado no gasificado. Los diámetros de copo de referencia d_{VF} describen una medida relativa de la tensión predominante y se muestran en la Figura 5 y la Tabla 2. Cuanto mayor sea el diámetro de copo de referencia, menor será la tensión hidrodinámica. En este caso, la única influencia es debida al sistema de agitador, ya que la aireación no está encendida.

Tabla 2: Ejemplos de diámetros de copo de referencia de diversos sistemas de agitadores a una entrada de potencia de 100 W/m³.

Agitador	H/D	d/D	d_{VF} (100 W/m ³) [μm]
sistema de agitador con tres agitadores de disco convencionales separados (3SSR)	1,6	0,33	65
sistema de agitador con tres agitadores de palas inclinadas separados (3SBR)	1,6	0,33	65
sistema de agitador con un agitador de pala inclinada y dos agitadores de disco convencionales (1SBR + 2SSR)	1,6	0,34	75
sistema de agitador con dos agitadores de palas inclinadas y un agitador de disco convencional (2SBR + 1SSR)	1,6	0,34	75

En comparación con sistemas de agitadores con solo elementos de transporte axial, tales como, por ejemplo, tres agitadores de palas inclinadas, el sistema de agitador que se informa en el presente documento produce considerablemente menos tensión, es decir, proporciona copos con un diámetro de copo de referencia d_{VF} mayor.

La Figura 2 muestra una comparación de números de Newton a partir de los cuales pueden determinarse las entradas de potencia no gasificadas. Puede observarse que el sistema de agitador que se informa en el presente

documento puede generar un número de Newton considerablemente mayor que confiere una entrada de energía más suave y más uniforme.

5 En una comparación directa con diversos sistemas de agitadores, el sistema de agitador que se informa en el presente documento presenta ventajas considerables en la mezcla (Figuras 3 y 4, Tabla 1), además de en la tensión de cizallamiento generada (Figura 5, Tabla 2).

10 Con el fin de lograr alto título de producto y una buena calidad de producto, el modo de operación del recipiente de cultivo tiene una función importante además de, por ejemplo, el desarrollo de la línea celular, la composición del medio y el dimensionado del recipiente de cultivo. Puede hacerse una distinción entre los modos de operación discontinuo o procedimientos discontinuos, procedimientos de lotes alimentados o de alimentación, procedimientos continuos con o sin retención de células (por ejemplo, perfusión o quimiostato), además de procedimientos semi-continuos tales como, por ejemplo, diálisis interna o externa.

15 En los procedimientos de cultivo semi-continuos, tales como, por ejemplo, diálisis externa o interna, los sustratos se alimentan al recipiente de cultivo a través de una membrana y al mismo tiempo componentes inhibidores / productos metabólicos de las células cultivadas se conducen a otra parte. Este intercambio de material es por difusión. Por tanto, los principales factores de influencia son la diferencia de concentración predominante, el material de la membrana, la superficie de la membrana, los coeficientes de difusión de los compuestos respectivos dentro del material de la membrana y el espesor de la interfase de fase que se determina por el flujo contra la membrana. Si se emplea diálisis en la fermentación de alta densidad celular, es un procedimiento semi-continuo similar a la perfusión en el que un módulo de diálisis (de fibra hueca) unido en el reactor proporciona el área de intercambio entre el medio de cultivo y el medio nutritivo fresco. El medio nutritivo es bombeado de un recipiente de almacenamiento a través del módulo de diálisis y a partir de aquí se devuelve de nuevo al recipiente de almacenamiento (para un diagrama esquemático véase la Figura 13). El módulo de diálisis puede localizarse fuera del reactor (diálisis externa) o dentro del reactor (diálisis interna). Las mismas leyes físicas se aplican a ambos modos de operación. Así, en el presente documento se informa como un aspecto un dispositivo que comprende un sistema de agitador que se informa en el presente documento y un recipiente de cultivo y opcionalmente un módulo de diálisis.

30 El recipiente de cultivo tiene una porción superior, una porción media y una porción inferior, en el que el eje longitudinal del recipiente se extiende desde el medio o centro de la porción superior hasta el medio o centro de la porción inferior. El recipiente de cultivo cilíndrico tiene una sección transversal sustancialmente circular cuando se mira perpendicular al eje longitudinal. La porción superior del recipiente de cultivo puede comprender además un medio de salida de descarga de gas, uno o más medios de entrada y/o un medio de boca de hombre para mantenimiento y limpieza. La porción inferior del recipiente de cultivo puede comprender además uno o más medios de entrada de medio líquido, uno o más medios de salida de medio líquido y/o un medio de entrada de gas. La porción media del recipiente de cultivo puede comprender además una camisa de intercambio de calor montada en la pared externa del recipiente de cultivo. Los elementos de transporte del sistema de agitador se someten a rotación por un árbol que se acopla a un mecanismo adecuado para inducir una rotación del mismo. El árbol se extiende a lo largo del eje longitudinal del recipiente de cultivo y, así, el árbol tiene un eje verticalmente orientado de rotación. El árbol no se extiende al fondo del recipiente, sino a un punto muy por encima del fondo del recipiente y también muy por encima de un burbujeador de gas opcional en el fondo del recipiente de cultivo. El árbol está operativamente acoplado a un árbol de transmisión por un mecanismo de acoplamiento adecuado. Además de un medio para acoplar el árbol al árbol de transmisión, el árbol compromete además medios adicionales, es decir, al menos tres medios, para acoplar individualmente los elementos de transporte al árbol. Los elementos de transporte del sistema de agitador se acoplan al árbol en una posición que es/estará por debajo de la superficie del medio de cultivo en el recipiente de cultivo una vez el sistema de agitador se sumerge en el medio de cultivo. La superficie se determina cuando el medio de cultivo es estático, es decir, no está siendo circulado. El recipiente de cultivo no contiene un tubo de aspiración.

50 En una realización opcional el recipiente de cultivo es un recipiente con tabiques deflectores. En otra realización, el recipiente de cultivo comprende dos o cuatro tabiques deflectores. Un "tabique deflector" indica una placa dispuesta dentro de un recipiente de cultivo en la misma dirección que el eje del árbol y que se extiende radialmente en el recipiente de cultivo hacia el agitador. El tabique deflector tiene generalmente forma rectangular. En una realización, el tabique deflector se coloca a una distancia b_d de la pared interna del recipiente de cultivo. En otra realización, los tabiques deflectores están equidistantemente separados alrededor de la circunferencia del interior del recipiente de cultivo.

60 En una realización, el dispositivo también comprende un módulo de diálisis. Los componentes del dispositivo están dimensionados de forma que puedan ejercer su función prevista, es decir, el recipiente de cultivo pueda recibir el medio de cultivo, el sistema de agitador pueda mezclar el medio y dispersar compuesto añadido en su interior y el módulo de diálisis pueda proporcionar medio fresco y conducir a otra parte compuestos metabólicos secretados por la célula cultivada. Así, el sistema de agitador tiene un diámetro que permite una rotación libre dentro del recipiente en presencia y ausencia del módulo de diálisis. Con el dispositivo que se informa en el presente documento puede llevarse a cabo ventajosamente un cultivo de alta densidad celular como cultivo de perfusión o como cultivo por diálisis. El cultivo se lleva a cabo en una realización a una velocidad de rotación del sistema de agitador a la que

puede lograrse una entrada de potencia constante independiente del número de Reynolds al medio de cultivo, es decir, durante el cultivo se proporciona un flujo de medio de cultivo turbulento en el recipiente de cultivo. Es posible con un dispositivo que se informa en el presente documento cultivar células de mamífero sensibles al cizallamiento a una baja velocidad de rotación del sistema de agitador, pero a la misma entrada de potencia en comparación con otros sistemas de agitadores.

La forma del recipiente de cultivo no está limitada. En una realización, el recipiente de cultivo es un recipiente cilíndrico. En otra realización, el recipiente de cultivo es un reactor de tanque con agitación. El recipiente de cultivo puede tener cualquier dimensión. En una realización, el recipiente de cultivo tiene un volumen de trabajo de 5 l a 25.000 l. Los componentes del medio nutritivo fresco difunden del interior del módulo de diálisis a través de la membrana de fibra hueca semi-permeable en el recipiente de cultivo y al mismo tiempo metabolitos de las células cultivadas difunden en la dirección opuesta del recipiente de cultivo en el medio nutritivo según la diferencia de concentración. El objetivo es mantener la concentración absoluta de metabolitos inhibidores en el recipiente de cultivo tan baja como sea posible (dilución) y al mismo tiempo mantener la concentración de nutrientes esenciales el mayor tiempo posible a un nivel óptimo en el cultivo. Esto produce condiciones de cultivo mejoradas en comparación con un procedimiento sin diálisis que permite lograr mayor densidad celular máxima o título de producto.

Los procesos de transporte en el módulo de diálisis pueden describirse de una manera equivalente a la transferencia de masa en una burbuja de gas por la teoría de las dos películas conjuntamente con la primera ley de Fick. Así, suponiendo gradientes lineales basados en el área de intercambio A_H del módulo de diálisis de fibra hueca, el flujo de difusión transferida eficaz J_{eff} es según la Ecuación 6:

$$J_{eff,i} = -D_{eff,i} \cdot A_H \cdot \frac{c_{2,i} - c_{1,i}}{x_2 - x_1} = -D_{eff,i} \cdot A_H \cdot \frac{\Delta c_i}{z_{eff}} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

La fuerza impulsora de la difusión es la diferencia de concentración Δc_i entre dentro y fuera del módulo de diálisis con respecto a la trayectoria de difusión eficaz z_{ef} . Esta trayectoria de difusión eficaz está compuesta por las trayectorias individuales a través de la capa límite laminar interna sobre la cara interna de la membrana de fibra hueca del módulo de diálisis δ_{BI} , a través de la propia membrana de fibra hueca δ_M y a través de la capa límite laminar externa sobre la cara externa de la membrana de fibra hueca en el reactor δ_{HI} . Generalmente dependen del tamaño y forma de la molécula que difunde, las propiedades del medio de alrededor y la temperatura.

Los coeficientes de transferencia de masa separados pueden definirse para las secciones individuales respectivas y a partir de la suma de sus inversas la resistencia a la transferencia de masa total $1/k$ se facilita según la Ecuación 7:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_{HI}} + \frac{1}{k_M} + \frac{1}{k_{BI}} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

Las resistencias al transporte en las capas límite laminares sobre la cara interna y externa de la membrana de fibra hueca también dependen del flujo contra la membrana de fibra hueca. Cuanto mejor, es decir, cuando más perpendicular sea el flujo hacia la membrana, más estrechas se vuelven las capas límite laminares y menores son las resistencias al transporte correspondientes. Para un módulo de diálisis en un recipiente de cultivo existe una dependencia directa de la resistencia al transporte de la capa límite laminar externa de, entre otros, los siguientes factores:

- la velocidad de rotación del sistema de agitador,
- el tipo de sistema de agitador,
- el flujo contra las membranas,
- el perfil de flujo primario generado por el sistema de agitador.

La resistencia de la capa límite laminar sobre la cara interna de la membrana de fibra hueca puede despreciarse debido al bajo diámetro interno y las altas velocidades de flujo simultáneas. Dentro de la presente solicitud, el término "cara interna de la membrana de fibra hueca" indica la cara de la membrana de fibra hueca que se orienta al recipiente de almacenamiento. El término "cara externa de la membrana de fibra hueca" indica la cara de la membrana de fibra hueca que se orienta al recipiente de cultivo. La resistencia a la transferencia de masa total es así una resistencia en serie a la que contribuyen principalmente la resistencia dentro de la membrana y la resistencia de la capa límite laminar externa (Rehm y col., Biotechnology - volumen 3: Bioprocessing, VCH Weinheim, 1993). El

coeficiente de transferencia de masa total k resulta de la inversa de la resistencia a la transferencia de masa total y puede relacionarse con el área superficial multiplicando por la superficie específica para el volumen del módulo de diálisis de fibra hueca (valor de ka). La siguiente Ecuación 8 puede usarse para describir los transcurros de concentración-tiempo para los espacios en equilibrio reactor y recipiente de almacenamiento:

$$\frac{dc_R}{dt} = ka \cdot (c^* - c_R) \quad \text{(Ecuación 8)}$$

En general, los recipientes de cultivo gasificados sumergidos se usan en cultivo celular. En estos casos se usa principalmente un sistema de agitador de transporte axial de una etapa o dos etapas. Esto genera un perfil de flujo que es esencialmente paralelo al árbol giratorio. Así, en la disposición que se muestra en la Figura 12, con el módulo de diálisis paralelo al árbol giratorio no se consigue un flujo directo contra el módulo de diálisis. Esto tiene un efecto desventajoso sobre el transporte de masa en el módulo de diálisis (capa límite laminar externa más ancha sobre la superficie de la fibra).

Un flujo tangencial o radial directo contra la membrana de diálisis tiene un efecto ventajoso que puede, por ejemplo, lograrse por un impulsor de anclaje convencional. Este impulsor genera un flujo que se dirige directamente sobre el módulo de diálisis o módulos en el reactor y así reduce la capa límite laminar sobre la superficie del (de los) módulo(s) de diálisis. Este simple flujo radial es, sin embargo, desventajoso para las otras funciones del procedimiento técnico básico, en particular con respecto a mezclar el reactor y la transferencia de masa, especialmente en reactores gasificados sumergidos. El gas puede introducirse en el recipiente de cultivo, por ejemplo, mediante un burbujeador de tubería o un burbujeador de anillo.

El sistema de agitador que se informa en el presente documento puede, en comparación con otros sistemas de agitadores, usarse para mezclar más rápidamente el medio de cultivo, por ejemplo, con el fin de introducir agentes correctores tales como ácidos o bases mediante la superficie del líquido, para reducir la formación de espuma y en procedimientos de diálisis para reducir la bioincrustación y aumentar la velocidad de transferencia de masa por el flujo ortogonal directo contra el módulo de diálisis.

El uso del sistema de agitador según la invención en el cultivo de células animales que producen un anticuerpo contra IGF-1R o CD20 o HER2 se mostró como un ejemplo (véase el documento WO 2004/087756; véanse los documentos WO 2007/045465, WO 2007/115814 y WO 2005/044859; véanse los documentos WO 99/057134 y WO 92/022653). Esto no representa una limitación de la divulgación, sino que solo sirve para ilustrar la invención. Como puede apreciarse de las Figuras 6 a 11, el uso de un sistema de agitador que se informa en el presente documento muestra transcurros de tiempo similares para densidad de células vivas, viabilidad y formación de productos cuando se compara con un sistema de agitador diferente (tal como, por ejemplo, tres agitadores de palas inclinadas).

Las abreviaturas usadas en la presente solicitud tienen los siguientes significados (véase también la Figura 1a):

b:	anchura de las palas del elemento de transporte radial
d:	diámetro externo total del agitador
d_w :	diámetro del árbol
h:	altura de las palas de agitador del elemento de transporte radial
h_B :	altura de un elemento de transporte axial
Δh :	diferencia de altura de dos elementos de transporte
l:	longitud de las palas de agitador de un elemento de transporte axial
α :	paso de pala de las palas de un elemento de transporte axial
z:	número de palas de agitador por agitador
d_i :	distancia interna entre las palas de agitador del elemento de transporte radial
D:	diámetro interno del recipiente de cultivo
H:	altura de llenado del recipiente de cultivo.

En una realización, la relación de la diferencia de altura (Δh) de dos elementos de transporte con respecto al diámetro del recipiente de cultivo (D) es al menos 0,75. En el presente documento se informa como un aspecto el uso del sistema de agitador que se informa en el presente documento para el cultivo de células para la producción de polipéptidos o anticuerpos. En una realización, el cultivo es una diálisis. En otra realización, el cultivo se lleva a cabo en un recipiente de cultivo de tanque con agitación gasificado sumergido. En otra realización, la célula es una célula eucariota, en otra realización, una célula de mamífero. En todavía otra realización, la célula es una célula CHO, una célula BHK, una célula NS0, una célula COS, una célula PER.C6, una célula Sp2/0 o una célula HEK 293. En una realización, la célula está seleccionada de *Arthrobacter protophormiae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, células BHK, *Candida boidinii*, *Cellulomonas cellulans*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium glutamicum*, células CHO, *E. coli*, *Geobacillus stearothermophilus*, *H. polymorpha*, células HEK, células HeLa, *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus luteus*, células MDCK,

Paenibacillus macerans, *P. pastoris*, especies de *Pseudomonas*, *S. cerevisiae*, especies de *Rhodobacter*, *Rhodococcus erythropolis*, especies de *Streptomyces*, *Streptomyces anulatus*, *Streptomyces hygroscopicus*, células Sf-9 y *Xantomonas campestris*. En todavía otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo contra CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CD33, CD52, EGFR, G250, GD3, HER2, PSMA, CD56, VEGF, VEGF2, CEA, antígeno Lewis Y, receptor de IL-6 o receptor de IGF-1.

El siguiente ejemplo y figuras se proporcionan para ilustrar la materia de la invención. El alcance protector se define por las reivindicaciones de patente adjuntas. Es evidente que las modificaciones pueden hacerse en la materia de los procedimientos desvelados sin apartarse de la materia de la invención.

Descripción de las figuras

- Figura 1 a) Diagrama del sistema de agitador que se informa en el presente documento en un reactor en el que D = diámetro interno del recipiente, d = diámetro externo del sistema de agitador, d_{sp} = diámetro del distribuidor de gas (orificios de salida), H = nivel de llenado del recipiente, H_B = altura del recipiente, h_{sp} = altura de instalación del distribuidor de gas, h_{1m} = altura de instalación del elemento de agitador más bajo, h_{2m} = distancia entre el elemento de agitador 1 y el elemento de agitador 2, h_{3m} = distancia entre el elemento de agitador 2 y el elemento de agitador 3, b_d = distancia del tabique deflector de la pared del recipiente, w = anchura de la pala del tabique deflector; b) Diagrama de un agitador de disco convencional en el que: d = diámetro externo del agitador, b = anchura de la pala de agitador, h = altura de la pala de agitador; c) Diagrama de un agitador de pala inclinada en el que: α = paso de la pala de agitador, l = longitud de la pala de agitador, $h = h_{SB}$ = (altura proyectada de la pala de agitador).
- Figura 2 Diagrama del coeficiente de potencia Ne de diversos sistemas de agitadores en función del número de Reynolds; SSR = agitador de disco convencional; SBR = agitador de pala inclinada.
- Figura 3 Diagrama del tiempo de mezcla para un grado de entremezcla del 95 % en función de la entrada de potencia para diversos sistemas de agitadores.
- Figura 4 Comparación de los coeficientes de mezcla C_H para diversos sistemas de agitadores en función del número de Reynolds; SSR = agitador de disco convencional; SBR = agitador de pala inclinada.
- Figura 5 Dependencia del diámetro de copo de referencia d_{VF} en la entrada de potencia específica para volumen y el sistema de agitador; SSR = agitador de disco convencional; SBR = agitador de pala inclinada.
- Figura 6 Transcurso de tiempo normalizado de la densidad de células vivas (a) y la viabilidad (b) en función del tiempo de fermentación y el sistema de agitador usado para cultivar una línea celular productora de anticuerpos anti-IGF-1R.
- Figura 7 Transcurso de tiempo normalizado de la concentración de producto en función del tiempo de fermentación y del sistema de agitador usado para cultivar una línea celular productora de anticuerpos anti-IGF-1R.
- Figura 8 Transcurso de tiempo normalizado de la densidad de células vivas (a) y la viabilidad (b) en función del tiempo de fermentación usando un sistema de agitador que se informa en el presente documento para cultivar una línea celular productora de anticuerpos anti-CD20.
- Figura 9 Transcurso de tiempo normalizado de la concentración de producto en función del tiempo de fermentación y el sistema de agitador usado para cultivar una línea celular productora de anticuerpos anti-CD20.
- Figura 10 Transcurso de tiempo normalizado de la densidad de células vivas (a) y la viabilidad (b) en función del tiempo de fermentación usando un sistema de agitador que se informa en el presente documento para cultivar una línea celular productora de anticuerpos anti-HER2.
- Figura 11 Transcurso de tiempo normalizado de la concentración de producto en función del tiempo de fermentación y el sistema de agitador usado para cultivar una línea celular productora de anticuerpos anti-HER2.
- Figura 12 El coeficiente de transferencia de masa en la diálisis en función de la entrada de potencia específica.
- Figura 13 Diagrama esquemático de un dispositivo para el cultivo por diálisis.
- Figura 14 Diagrama esquemático de los gradientes de concentración sobre las fibras huecas del módulo de diálisis.

Ejemplo 1

Dispositivos de cultivo

Todas las investigaciones se llevaron a cabo en un recipiente modelo Plexiglas® de 300 l (denominado DN 640 a continuación) o en los propios reactores de producción. Las investigaciones de diálisis se llevaron a cabo en un recipiente modelo Plexiglas® de 100 l (denominado DN 440 a continuación).

Ejemplo 2

Entrada de potencia

5 La entrada de potencia de diferentes agitadores se determinó midiendo el par de giro en el árbol giratorio. Un sistema de procesamiento de datos modelo GMV2 junto con el sensor de par de giro modelo DRFL-II-5-A (ambos de la empresa "ETH Messtechnik", Gschwend, Alemania) se usaron para registrar el par de giro. Para cada sistema de agitador el par de giro se registró en primer lugar a diversas velocidades de revolución en el estado sin llenar ($M_{\text{vacío}}$) y posteriormente por medio de una determinación por triplicado del estado lleno (M_{carga}) según la Ecuación 9:

10

$$M = M_{\text{carga}} - M_{\text{vacío}} \quad . \quad \text{(Ecuación 9).}$$

15 Después, el número de Newton (número Ne) y el número de Reynolds (número Re) correspondientes se calcularon para cada punto. Como los números de Newton para un sistema de agitador se vuelven constantes en la región de flujo turbulento, los números de Newton calculados se promediaron posteriormente en esta región (Uhl, V.W. y Gray, J.B., *Mixing Theory and Practice*, Academic Press, 1966). Esta media representa el número de Newton total del agitador respectivo.

Ejemplo 3

20

Homogeneización

La homogeneización se determinó usando el procedimiento de cambio de color, además de usando el procedimiento de conductividad.

25

El procedimiento de cambio de color se basa en la decoloración de una disolución de almidón teñida con yodo-yoduro de potasio mediante adición de tiosulfato de sodio (I, KI, almidón, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ obtenido de la empresa Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Alemania). Como disoluciones de partida se usaron una disolución uno molar de tiosulfato de sodio y una disolución uno molar de yodo-yoduro de potasio (disolución de Lugol), además de una disolución de almidón a una concentración de 10 g/l. En correspondencia con los experimentos de conductividad, al menos cuatro etapas de velocidad se examinaron por agitador (determinaciones por cuadruplicado por etapa de velocidad), llevándose a cabo un máximo de cuatro experimentos por cantidad de llenado del recipiente. En cada caso, la disolución de almidón se añadió una vez por llenado del recipiente. Para cada medición individual, el volumen correspondiente de la disolución de yodo-yoduro de potasio se añadió en primer lugar y posteriormente se añadió el tiosulfato de sodio. El tiempo de mezcla se ha determinado manualmente a partir del momento de tiempo en el que se añadió el tiosulfato de sodio y se restó un segundo en cada caso con el fin de tener en cuenta el tiempo de adición. Después de completarse la medición se valoró (neutralizó) el volumen de llenado del recipiente con yodo-yoduro de potasio con el fin de compensar el exceso de tiosulfato de sodio previamente añadido.

30

35

40 En el procedimiento de conductividad, el tiempo de mezcla se define como el tiempo desde la adición de una disolución de electrolito hasta el tiempo al que las fluctuaciones de conductividad medidas por última vez superaron un intervalo de tolerancia de $\pm 5\%$ alrededor de los valores de conductividad que se alcanzan en un estado estacionario. Si se usan varias sondas, el tiempo de mezcla detectado más largo en cada caso se considera representativo para el sistema entero.

45

Una disolución al 30 % (peso/volumen) de NaCl (NaCl cristalino, empresa Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) se usó como disolución de electrolito para determinar el tiempo de mezcla por el procedimiento de conductividad. Ésta se añadió en pulsos sobre la superficie del líquido en el árbol giratorio del agitador y el volumen por adición se seleccionó de forma que los saltos en la conductividad que produjeron un estado estacionario no superaran 200 mS/cm.

50

Para cada agitador se examinaron al menos cuatro etapas de velocidad. El tiempo de mezcla se determinó al menos ocho veces por etapa de velocidad y estos ocho valores se promediaron. El coeficiente de mezcla de los sistemas de agitadores respectivos se facilita como la media de los coeficientes de mezcla promediados por etapa de velocidad. La conductividad se midió en cada caso por tres sondas de conductividad de 4 polos (TetraCon, empresa WTW, Weilheim) a diversas posiciones radiales o axiales en el recipiente. Las señales de conductividad se leyeron en línea mediante el amplificador de medición que se usó (Cond813, empresa Knick "Elektronische Messgeräte GmbH & Co, KG", Berlín, Alemania). Los valores medidos se almacenaron en línea y simultáneamente para todas las sondas por medio del software Paraly SW 109 (empresa Knick "Elektronische Messgeräte GmbH & Co, KG", Berlín, Alemania) a una tasa de muestreo de 5 segundos. Después de completarse las series de mediciones, los datos se evaluaron por separado para cada sonda.

55

60

Ejemplo 4

Tensión de cizallamiento

5 Se usó un sistema de partículas modelo, el sistema de copos de polímero de arcilla azul, para determinar la tensión de cizallamiento. Éste es un sistema de partículas modelo que consiste en un polímero catiónico (Praestol BC 650) y una arcilla mineral (arcilla azul) que se coloca en el recipiente. Se inicia una reacción de floculación añadiendo Praestol BC 650 que genera copos de un tamaño definido. Estos copos se desintegran posteriormente por la tensión mecánica e hidrodinámica del sistema de agitador. En el caso de sistemas gasificados con burbujas se desintegran
 10 adicionalmente por la disipación de energía cuando las burbujas se forman y explotan. El diámetro de partícula promedio del sistema de partículas modelo se usó como una variable medida para caracterizar la tensión de cizallamiento. En este caso, el cambio en el tamaño de partícula se midió *in situ* por una sonda de medición de reflectancia con haz enfocado de la empresa Mettler Toledo (denominada FBRM® a continuación). Las tasas de cambio en el tamaño de partícula que se determinaron son una medida de la tensión de cizallamiento que predomina en el sistema modelo. El gradiente de la tasa de cambio del tamaño de partícula se vuelve más pequeño durante el transcurso del experimento, pero no se forma estado de equilibrio (trituration de partículas a un diámetro de las partículas primarias de arcilla azul de ≈15 μm). Por este motivo, un diámetro de copo final d_{P50}' para el sistema de copo de polímero de arcilla azul se determinó según el siguiente criterio (Ecuación 10):

$$\frac{d(d_{P50})}{dt} \leq 0.0055 [\mu m / s] \rightarrow d_{P50} = d_{P50}' \quad \text{(Ecuación 10)}$$

Con el fin de garantizar la comparabilidad de los diámetros de copo finales a diferentes entradas de potencia y entre diferentes agitadores, el diámetro de copo de referencia se calculó del siguiente modo (Ecuaciones 11 a 13):

$$d_{VF} = m \cdot d_{P50}' - b \quad \text{(Ecuación 11)}$$

$$m = 1,3 \cdot 10^{-6} \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^2 + 1,37 \cdot 10^{-3} \cdot \left(\frac{P}{V}\right) + 2,46 \quad \text{(Ecuación 12)}$$

$$b = 8,12 \cdot 10^{-5} \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^2 + 6,48 \cdot 10^{-3} \cdot \left(\frac{P}{V}\right) + 76,9 \quad \text{(Ecuación 13)}$$

Tabla 3: Sustancias usadas para determinar la tensión de partículas (las concentraciones se basan en el volumen de llenado del recipiente).

Componente	Concentración	Fabricante
Arcilla azul Witterschlicker	5 g/l	Braun Tonbergbau Co., Alemania
Praestol 650 BC (disolución 2 g/l)	5 ml/l	Stockhaus GmbH & Co. KG, Krefeld, Alemania
NaCl	1 g/l	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
CaCl ₂ (disolución 30 g/l)	--	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Alemania

30 En primer lugar, el recipiente modelo de 100 l se llenó con un volumen correspondiente (relación H/D) de agua completamente desmineralizada (agua VE) y se mantuvo a una temperatura de 20 °C. Posteriormente, la conductividad se ajustó a un valor de 1000 μS/cm por valoración con una disolución de CaCl₂. La conductividad se midió por una sonda de conductividad de 4 polos (sonda: TetraCon, WTW Co. Weilheim; amplificador de medición: Cond813, empresa Knick "Elektronische Messgeräte GmbH & Co, KG", Berlín, Alemania). Después, la arcilla azul y el NaCl se añadieron en cantidades apropiadas a la disolución. Posteriormente tuvo lugar una fase de
 35 homogenización a la mayor velocidad con una duración de al menos 20 minutos. La sonda FBRM® (FBRM® Lasentec® D600L, Mettler-Toledo GmbH Co., Giessen, Alemania) se montó en el recipiente perpendicular desde arriba (profundidad de inmersión 300 mm) a una distancia radial de 70 mm a la pared. La reacción de floculación se

5 inició posteriormente añadiendo Praestol 650 BS a una velocidad definida. Los valores medidos se registraron en línea por medio de la interfaz de control de adquisición de datos del programa versión 6.7.0 (Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Alemania). El diámetro de copo de referencia se determinó de los datos de medición. Al menos se midieron tres entradas de potencia para cada agitador. En cada caso se llevaron a cabo tres mediciones por entrada de potencia.

Ejemplo 5

Diálisis (transferencia de masa líquido - líquido)

10 Una disolución de NaCl (NaCl cristalino, empresa Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) se usó como sustancia trazadora para determinar la semivida de la concentración del módulo (DIADYN-DP 070 F1 OL; empresa MICRODYN-NADIR GmbH, Wiesbaden, Alemania) en relación con el sistema de agitador que se usó y la entrada de potencia específica para el volumen. La sustancia trazadora se ajustó en el recipiente de almacenamiento al inicio de cada ejecución experimental a una conductividad de referencia de 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$. El reactor se llenó de agua completamente desmineralizada para cada ejecución experimental. El volumen de llenado del reactor fue 100 l (H/D = 1,6) y el del recipiente de almacenamiento fue 400 l (H/D = 2,0) y ambos recipientes se mantuvieron a una temperatura de 20 °C al inicio de cada experimento. La conductividad en ambos recipientes se midió por una sonda de conductividad de 4 polos (sonda: TetraCon, WTW Co. Weilheim, Alemania; amplificador de medición: Cond813, empresa Knick "Elektronische Messgeräte GmbH & Co, KG", Berlín, Alemania). La tasa de muestreo de los amplificadores de la medición que se usaron fue 5 segundos y los valores de medición se almacenaron en línea y simultáneamente para todas las sondas por medio del software Paraly SW 109 (empresa Knick "Elektronische Messgeräte GmbH & Co, KG", Berlín, Alemania). La disolución de NaCl se circuló por medio de una bomba peristáltica entre el recipiente de suministro y el módulo de diálisis (que aloja la bomba 520 U, empresa Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen, Alemania) a una velocidad de flujo constante de 2,1 l/min. Para la evaluación, la sonda 1 se usó como sonda de referencia para el reactor y la sonda 3 se usó como sonda de referencia para el recipiente de almacenamiento. Los datos de estas dos sondas se evaluaron por una rutina de evaluación. En cada caso se investigaron al menos seis entradas de potencia diferentes en el reactor por agitador.

30 Con el fin de comparar las características de transferencia de masa determinadas por medio de la disolución de NaCl, mediciones adicionales se llevaron a cabo con una disolución de glucosa como sustancia trazadora. El entorno experimental no se cambió para esto. Se proporcionó una concentración de glucosa definida (sólido de glucosa, empresa Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a una concentración de 3 g/l en el recipiente de almacenamiento. La concentración de glucosa se determinó manualmente y simultáneamente para el recipiente de almacenamiento y el reactor a un intervalo de tiempo de 10 minutos por medio de un instrumento de medición de azúcar en sangre (ACCU-CHEK® Aviva, empresa Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Ejemplo 6

40 Anticuerpo anti-IGF-1R

La línea celular que secreta anticuerpos anti-IGF-1R se produjo y se cultivó según los datos publicados en las solicitudes de patente internacional WO 2004/087756, WO 2007/045465 y WO 2007/115814 y por medio de procedimientos generalmente conocidos.

Ejemplo 7

Anticuerpo anti-CD20

50 La línea celular que secreta anticuerpos anti-CD20 se produjo y se cultivó según los datos publicados en la solicitud de patente internacional WO 2005/0044859 y por medio de procedimientos generalmente conocidos.

Ejemplo 8

55 Anticuerpo anti-HER2

La línea celular que secreta anticuerpos anti-HER2 se produjo y se cultivó según los datos publicados en las solicitudes de patente internacional WO 92/022653 y WO 99/057134 y por medio de procedimientos generalmente conocidos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de cultivo de células de mamífero, caracterizado porque las células de mamífero se cultivan en un dispositivo que comprende un sistema de agitador y un recipiente de cultivo,
 5 en el que el sistema de agitador consiste en dos elementos de agitador de transporte radial y un elemento de agitador de transporte axial dispuestos los unos sobre los otros en un árbol de agitador vertical, en el que el elemento de agitador de transporte axial está dispuesto por encima de los elementos de agitador de transporte radial.
- 10 2. Procedimiento de producción de un polipéptido que comprende las siguientes etapas:
- a) cultivar una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido en un dispositivo que comprende un sistema de agitador y un recipiente de cultivo,
 15 en el que el sistema de agitador consiste en dos elementos de agitador de transporte radial y un elemento de agitador de transporte axial dispuestos los unos sobre los otros en un árbol de agitador vertical, en el que el elemento de agitador de transporte axial está dispuesto por encima de los elementos de agitador de transporte radial,
 b) recuperar el polipéptido del medio de cultivo o de las células,
 20 c) purificar el polipéptido y así producir el polipéptido.
3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el sistema de agitador tiene, cuando se usa en el recipiente de cultivo que comprende un medio de cultivo, un número de Newton de 5,5 a 8,0 a un número de Reynolds de $5 \cdot 10^4$ a $5 \cdot 10^5$.
- 25 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el sistema de agitador tiene, cuando se usa en el recipiente de cultivo que comprende un medio de cultivo, un tiempo de mezcla $\theta_{0,95}$ de aproximadamente 20 segundos a una entrada de potencia de aproximadamente 0,05 W/kg y de aproximadamente 10 segundos a una entrada de potencia de aproximadamente 0,3 W/kg.
- 30 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el sistema de agitador consiste en dos agitadores de disco o dos turbinas Rushton como elementos de agitador de transporte radial y un agitador de pala inclinada como elemento de agitador de transporte axial.
- 35 6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque los elementos de agitador de transporte radial tienen entre 2 y 8 palas de agitador y el elemento de agitador de transporte axial tiene entre 2 y 10 palas de agitador.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque todos los elementos de transporte tienen el mismo diámetro d.
- 40 8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la relación del diámetro d de los elementos de agitación con respecto al diámetro D del recipiente de cultivo está en el intervalo de 0,32 a 0,35.
- 45 9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el paso de las palas de agitador del elemento de agitador de transporte axial está entre 10° y 80° con respecto al árbol de agitador.
10. Uso de un sistema de agitador que consiste en dos elementos de agitador de transporte radial y un elemento de agitador de transporte axial dispuestos los unos sobre los otros en un árbol de agitador vertical, en el que el elemento de agitador de transporte axial está dispuesto por encima de los elementos de agitador de transporte radial para la mezcla del medio de cultivo de células de mamífero.
- 50 11. Dispositivo de cultivo de células animales, caracterizado porque el dispositivo comprende:
- 55 a) un recipiente de cultivo,
 b) un árbol vertical a lo largo del eje central del recipiente de cultivo,
 c) un sistema de agitador que consiste en dos elementos de agitador de transporte radial y un elemento de agitador de transporte axial dispuestos los unos sobre los otros en un árbol de agitador vertical, en el que el elemento de agitador de transporte axial está dispuesto por encima de los elementos de agitador de transporte radial,
 60 d) una alimentación de gas en la parte inferior del recipiente de cultivo, y
 e) al menos una entrada en el área por encima de la superficie del líquido para añadir disoluciones correctoras y/o de alimentación.

12. El uso según la reivindicación 10 o el dispositivo según la reivindicación 11, caracterizado porque el sistema de agitador tiene, cuando se usa en un recipiente de cultivo que comprende un medio de cultivo, un número de Newton de 5,5 a 8,0 a un número de Reynolds de $5 \cdot 10^4$ a $5 \cdot 10^5$.
- 5 13. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 12 o el dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, caracterizado porque el sistema de agitador tiene, cuando se usa en un recipiente de cultivo que comprende un medio de cultivo, un tiempo de mezcla $\theta_{0,95}$ de aproximadamente 20 segundos a una entrada de potencia de aproximadamente 0,05 W/kg y de aproximadamente 10 segundos a una entrada de potencia de aproximadamente 0,3 W/kg.
- 10 14. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 12 a 13 o el dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado porque el sistema de agitador consiste en dos agitadores de disco o dos turbinas Rushton como elementos de agitador de transporte radial y un agitador de pala inclinada como elemento de agitador de transporte axial.
- 15 15. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 12 a 14 o el dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, caracterizado porque los elementos de agitador de transporte radial tienen entre 2 y 8 palas de agitador y el elemento de agitador de transporte axial tiene entre 2 y 10 palas de agitador.
- 20 16. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 12 a 15 o el dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, caracterizado porque todos los elementos de transporte tienen el mismo diámetro d.
- 25 17. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 12 a 16 o el dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, caracterizado porque la relación del diámetro d de los elementos de agitación con respecto al diámetro D del recipiente de cultivo está en el intervalo de 0,32 a 0,35.
- 30 18. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 12 a 17 o el dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, caracterizado porque el paso de las palas de agitador del elemento de agitador de transporte axial está entre 10° y 80° con respecto al árbol de agitador.

Fig. 1

a)

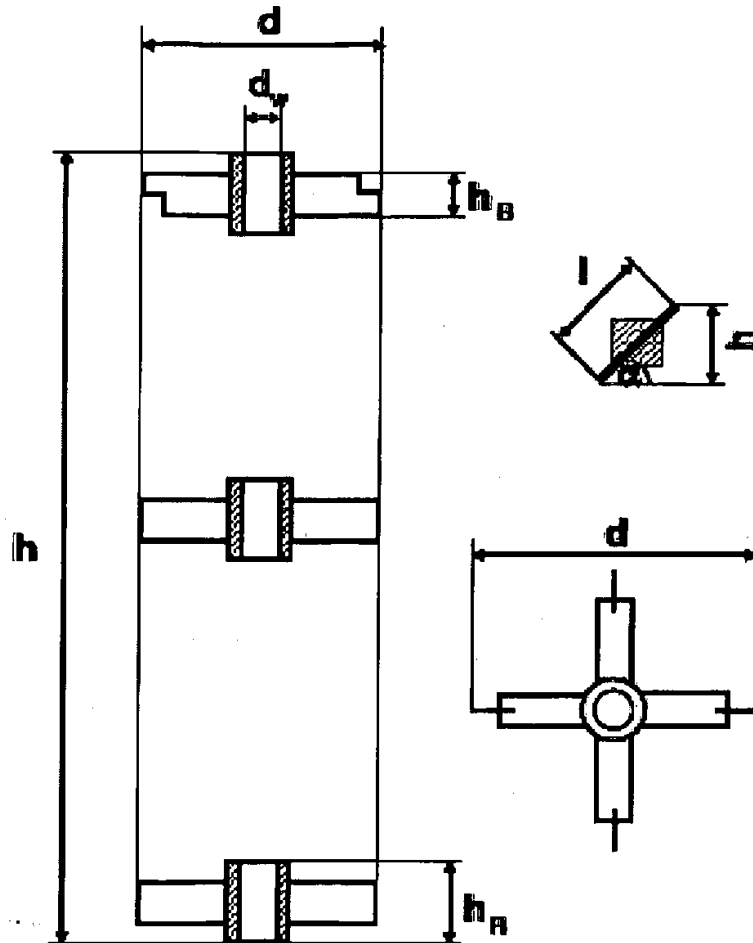


Fig. 1

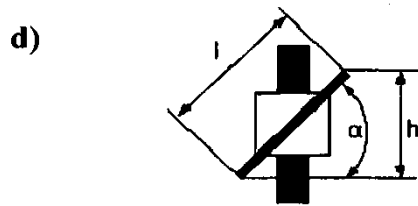
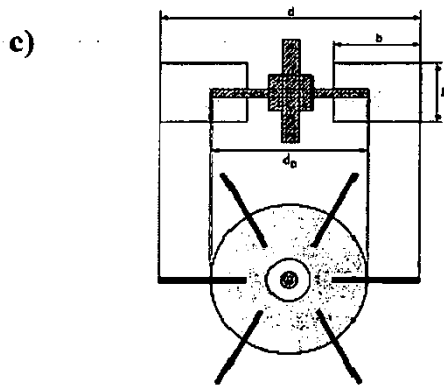
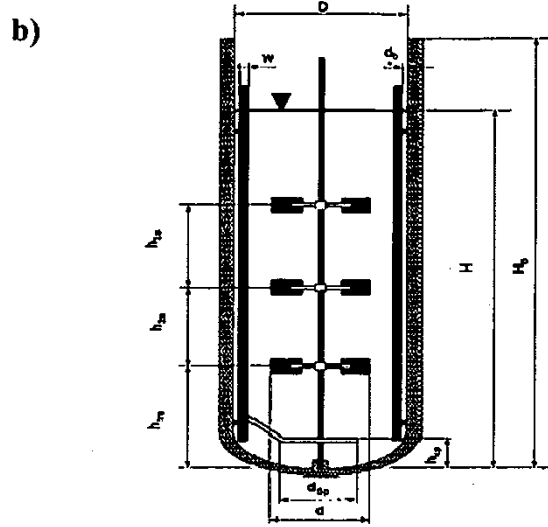
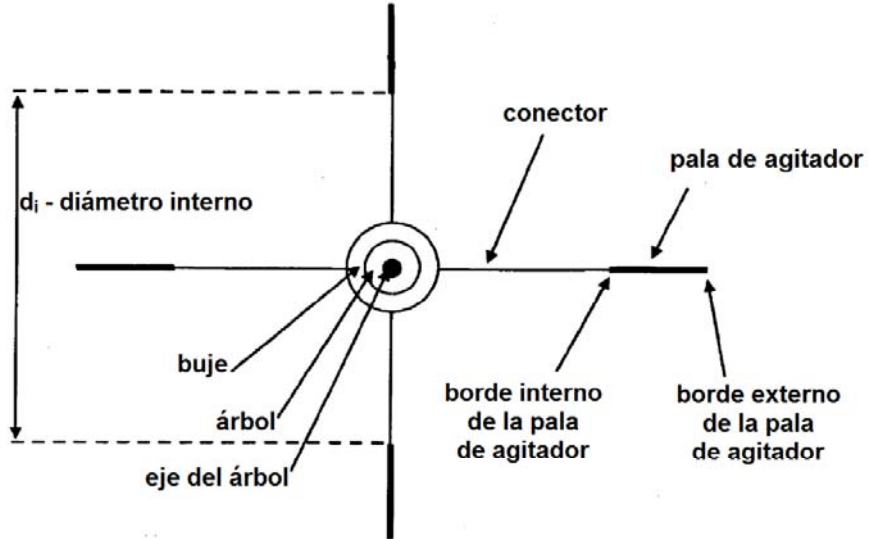


Fig. 1

e)



f)

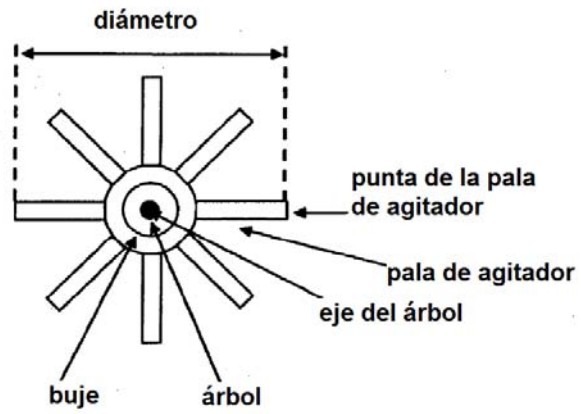


Fig. 2

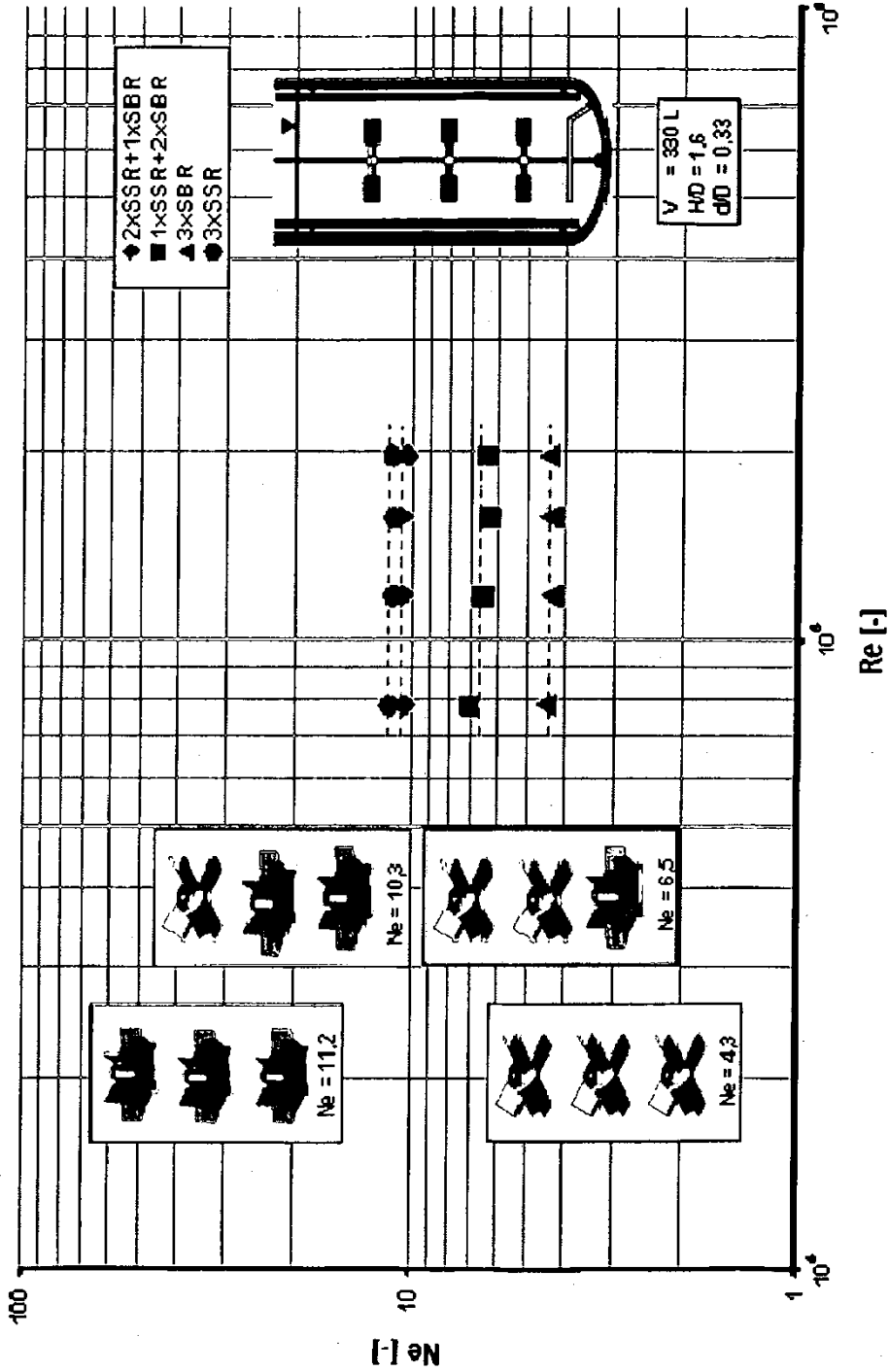


Fig. 3

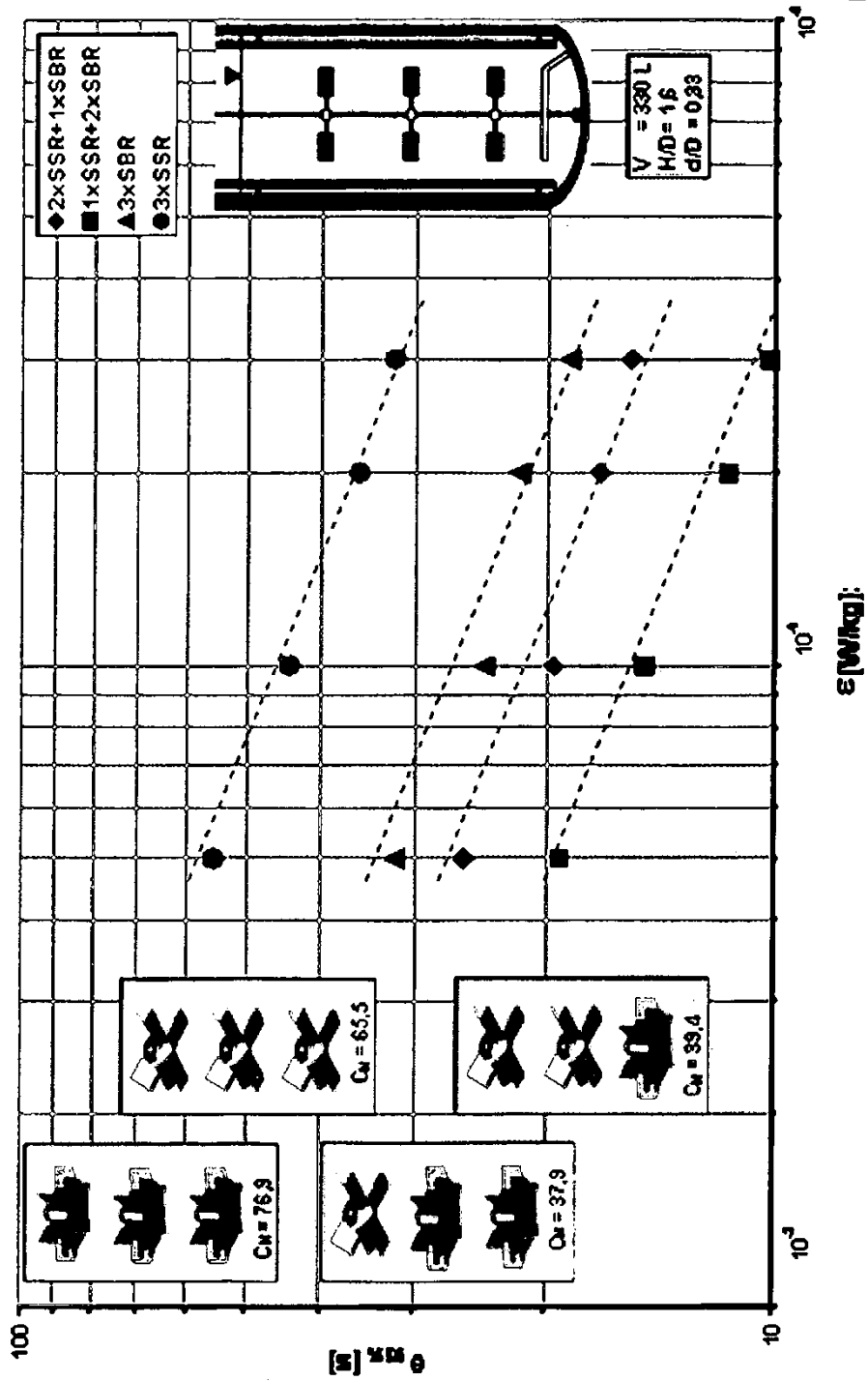


Fig. 4

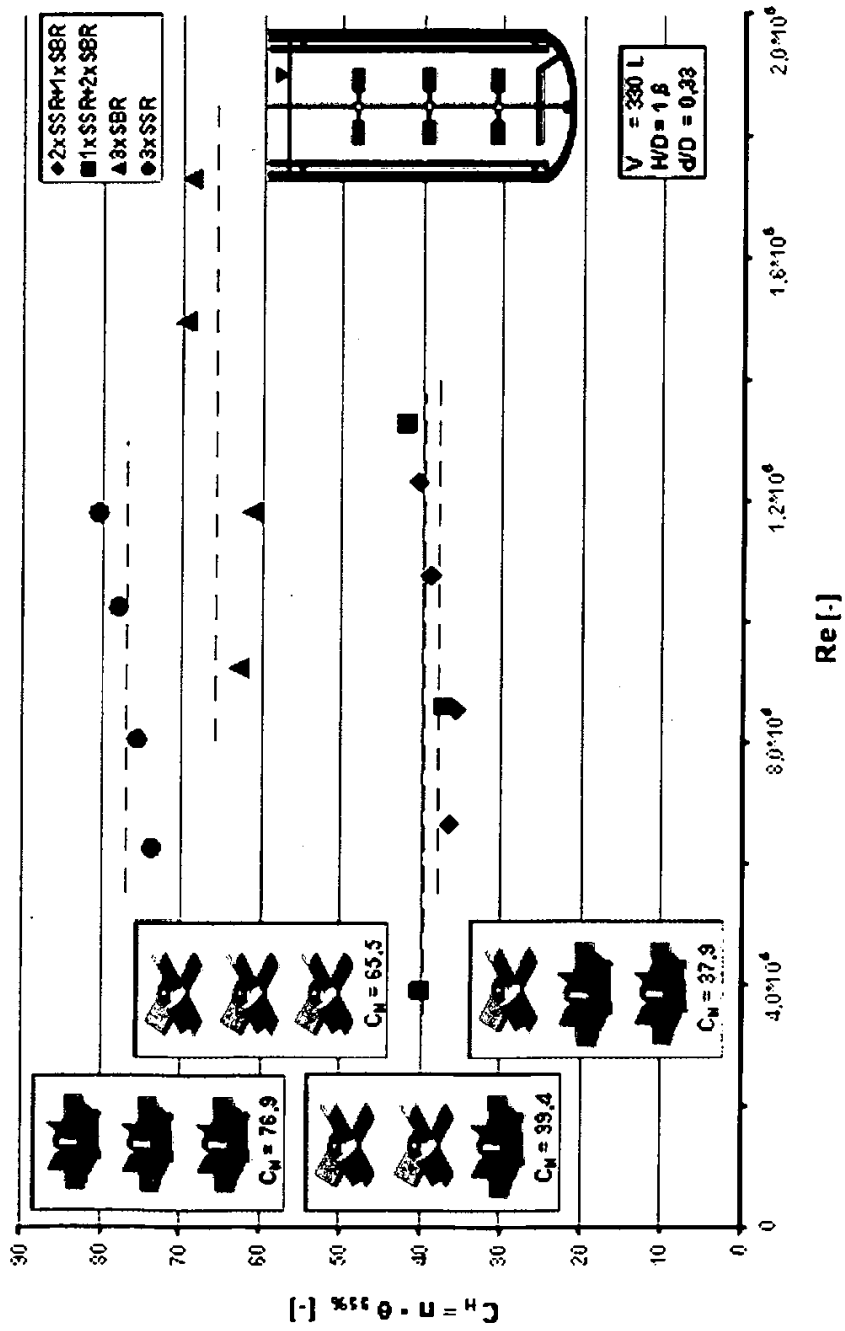


Fig. 5

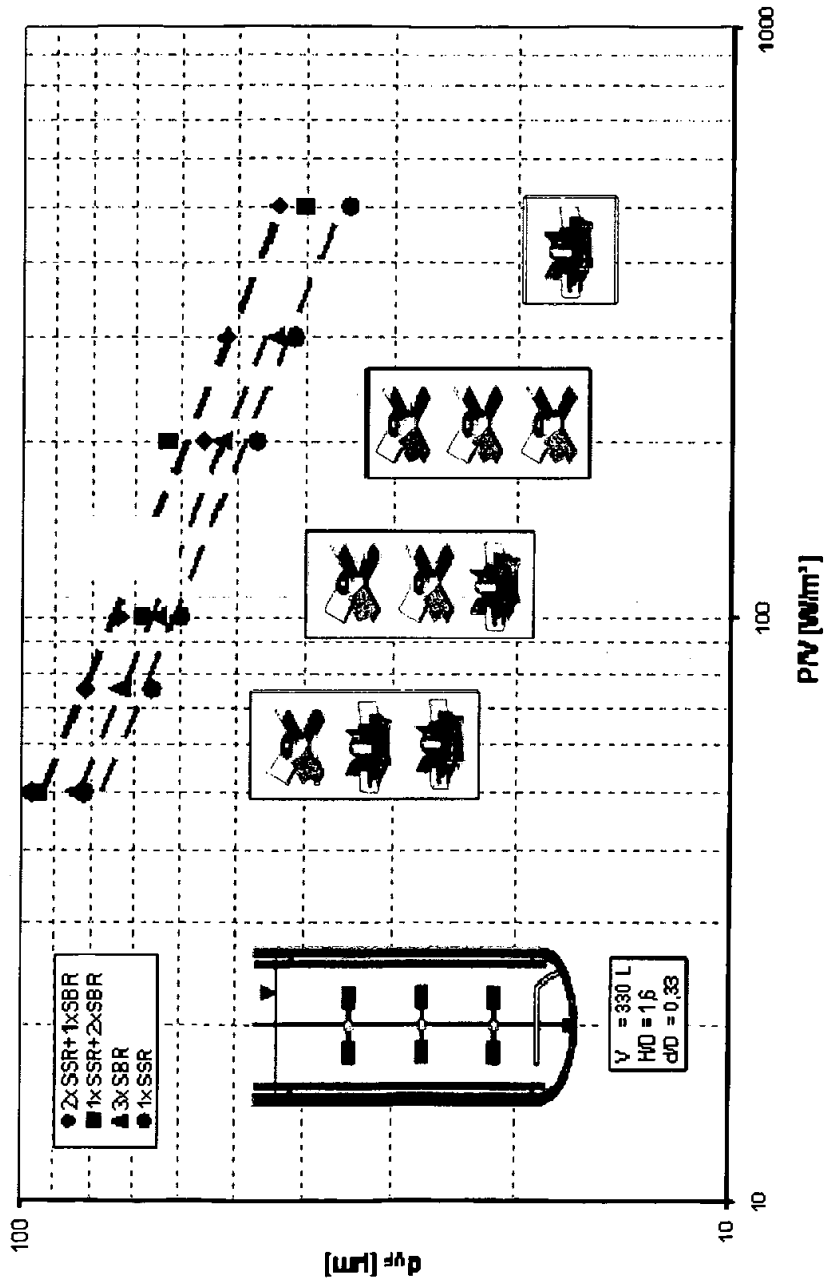


Fig. 6

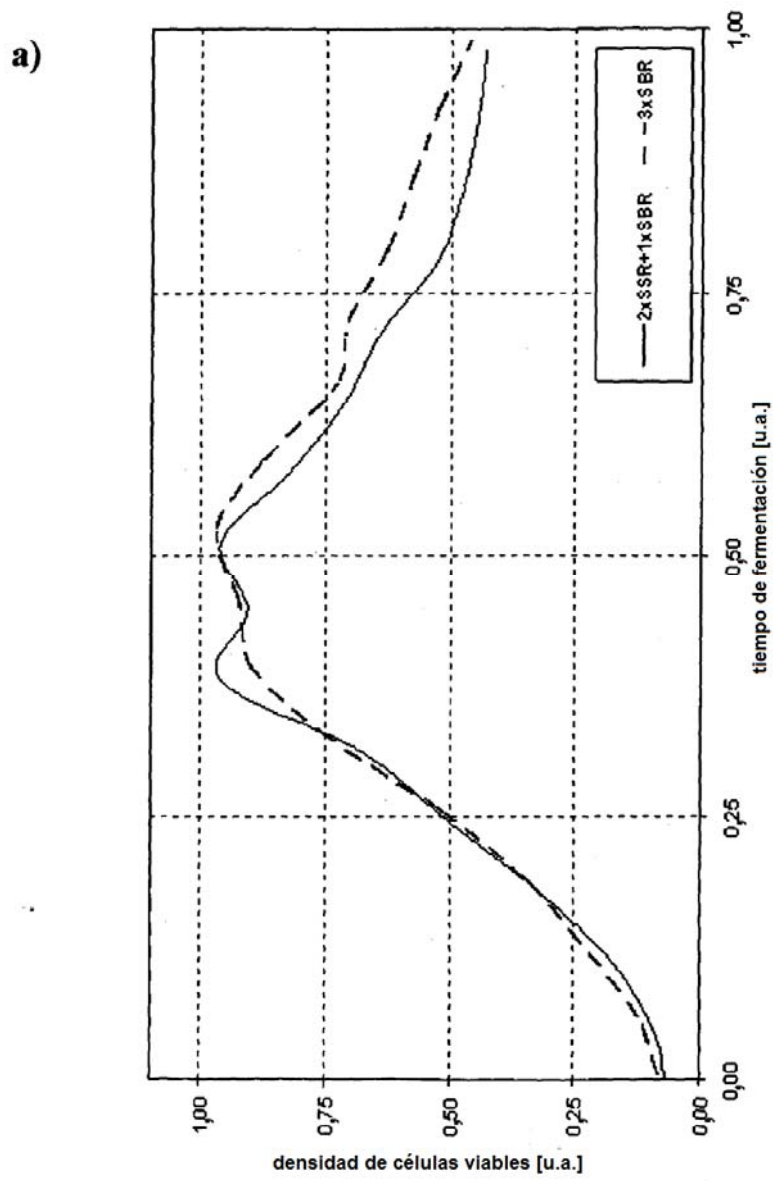


Fig. 6

b)

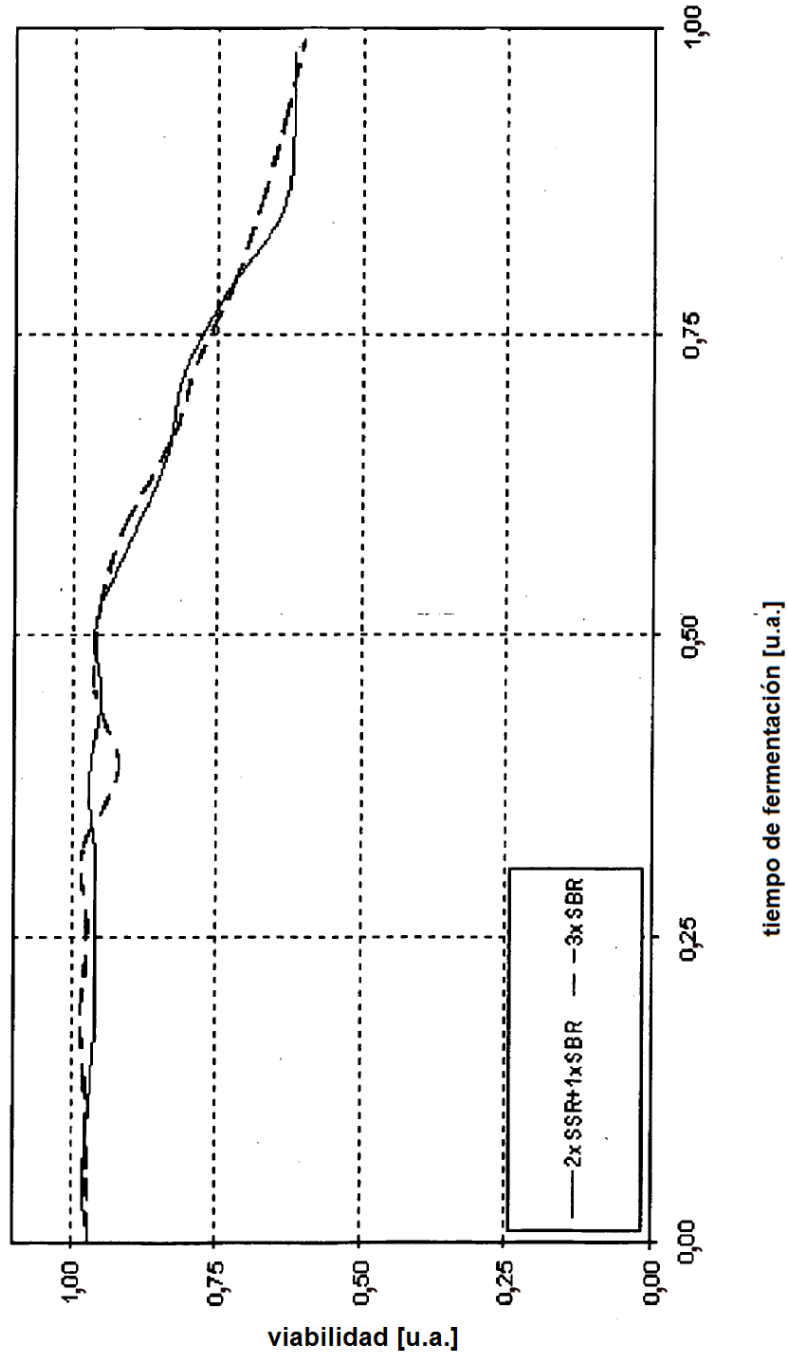


Fig. 7

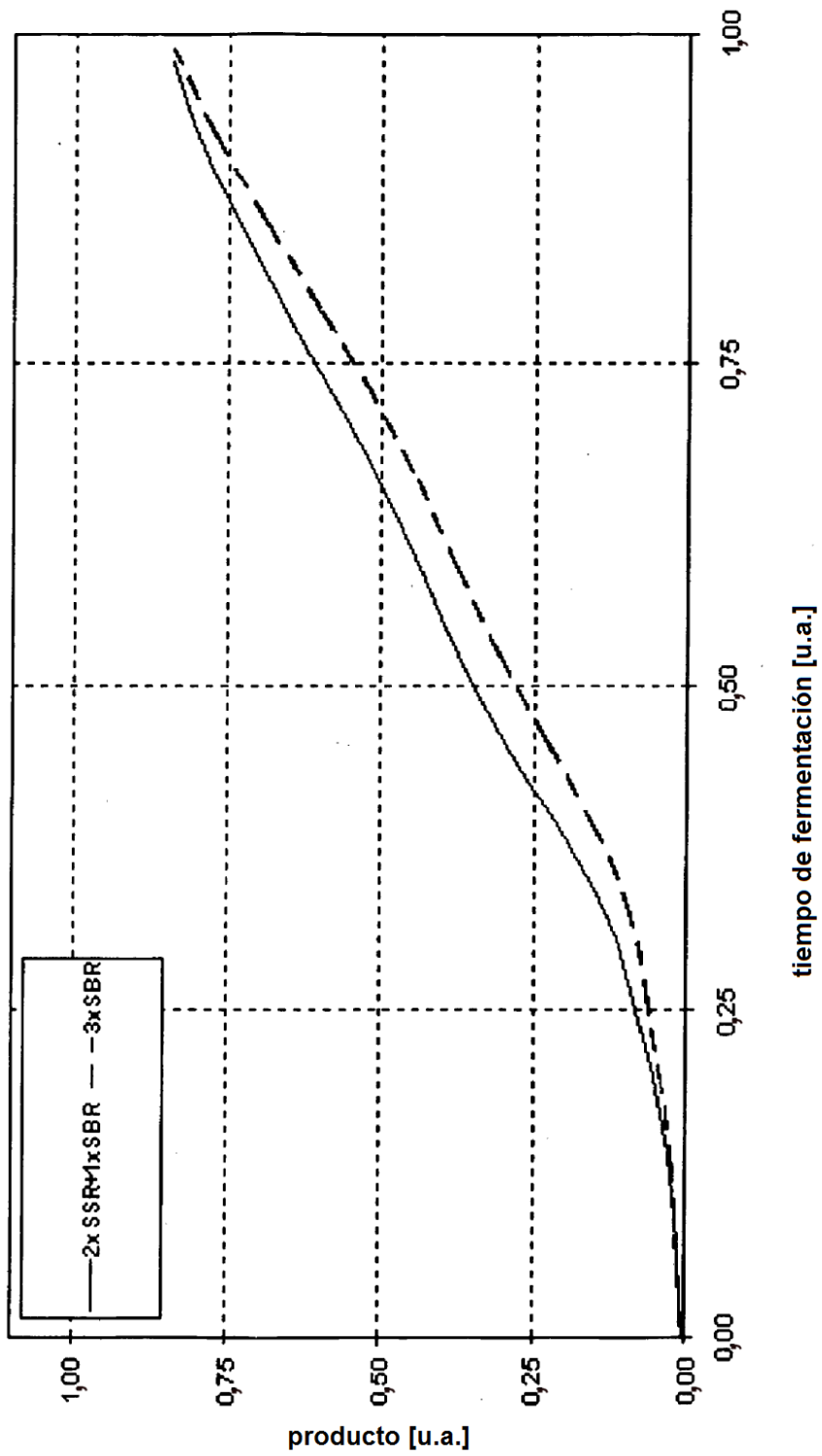


Fig. 8

a)

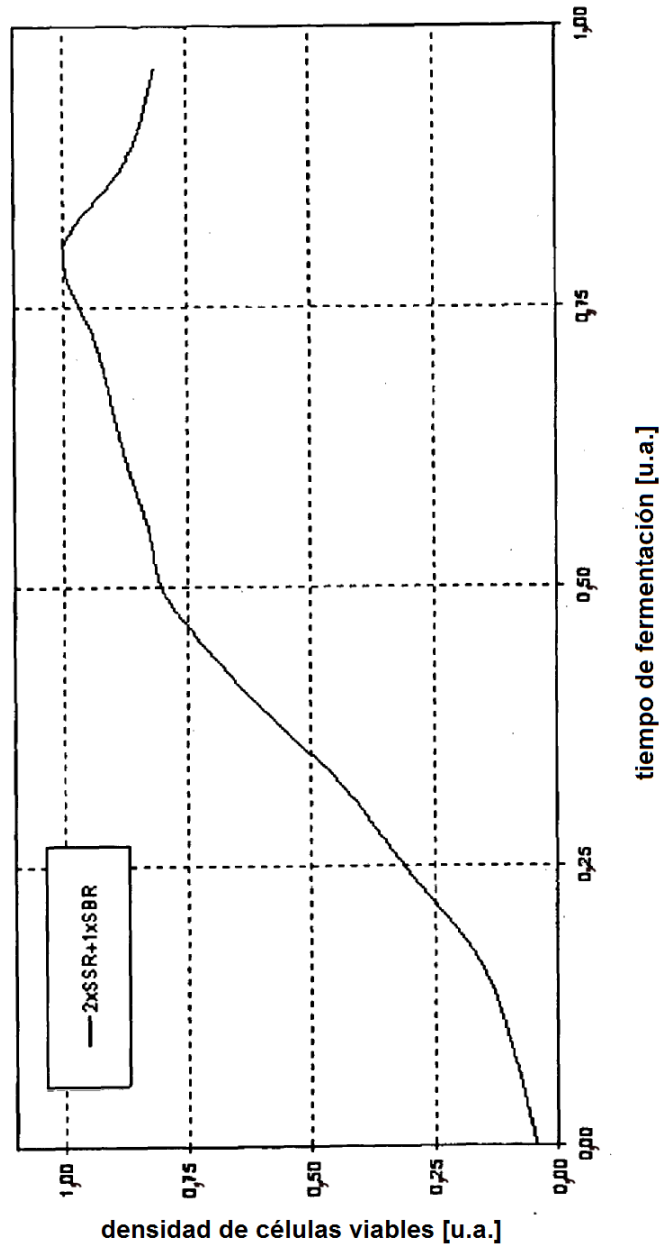


Fig. 8

b)

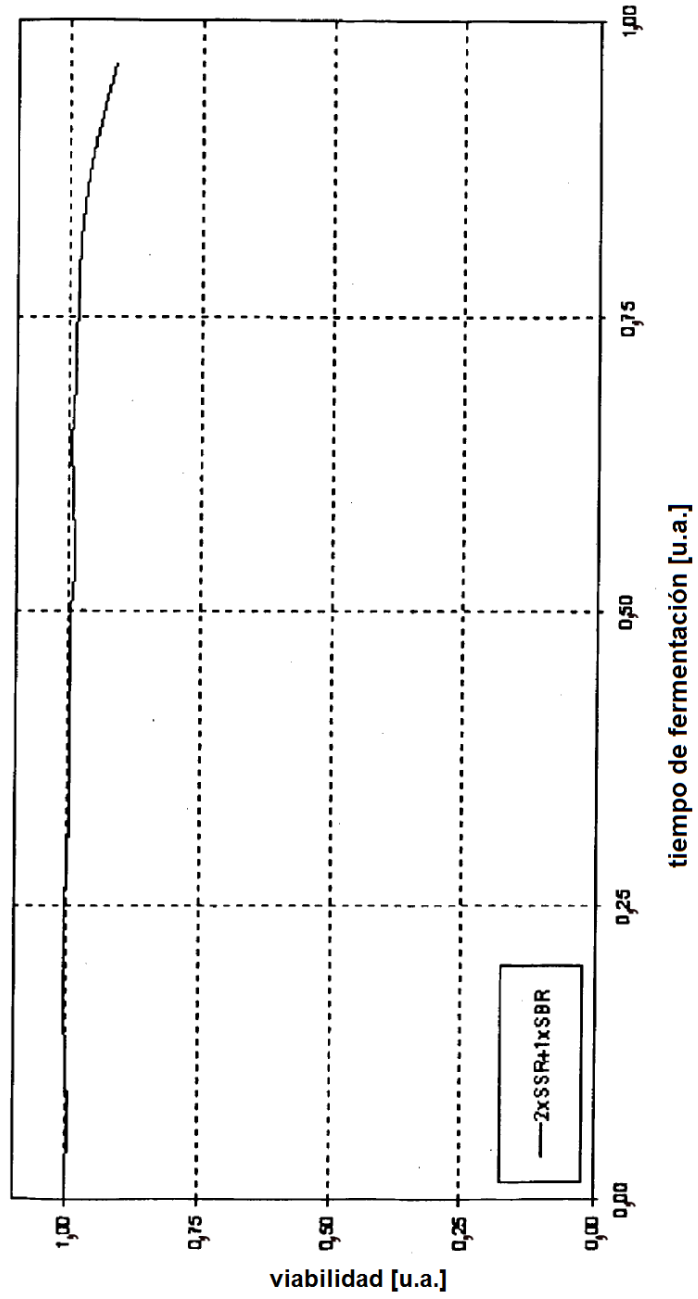


Fig. 9

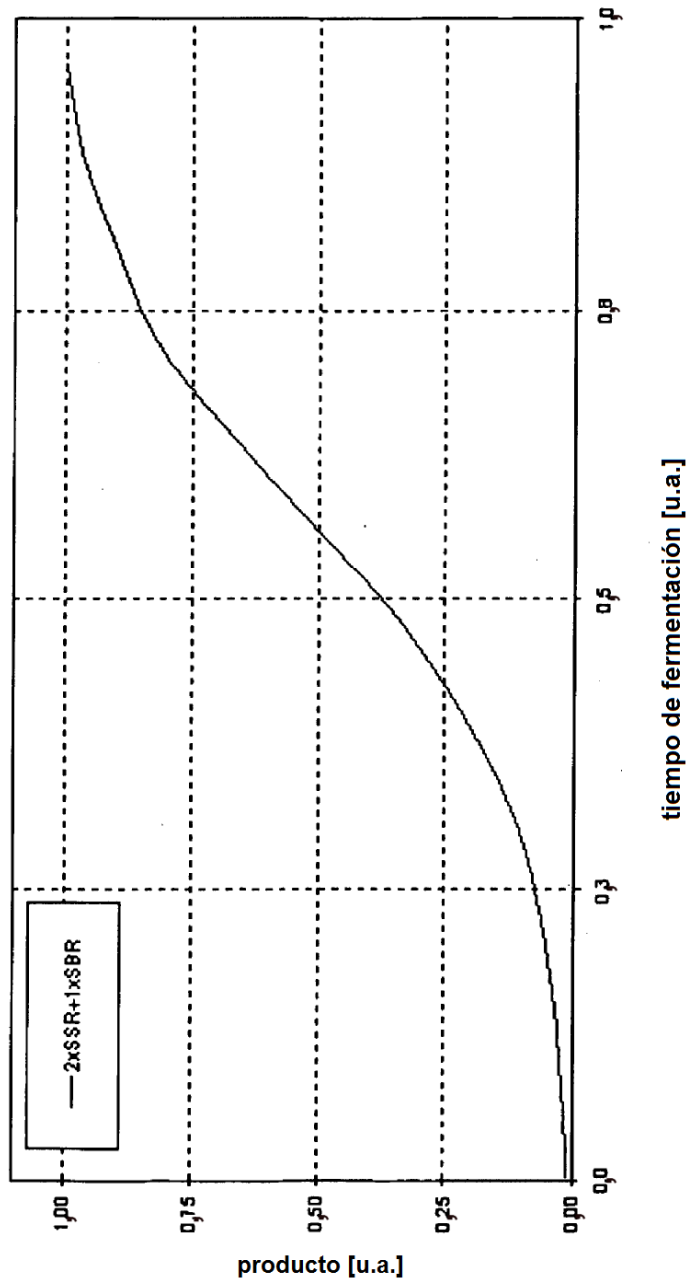


Fig. 10

a)

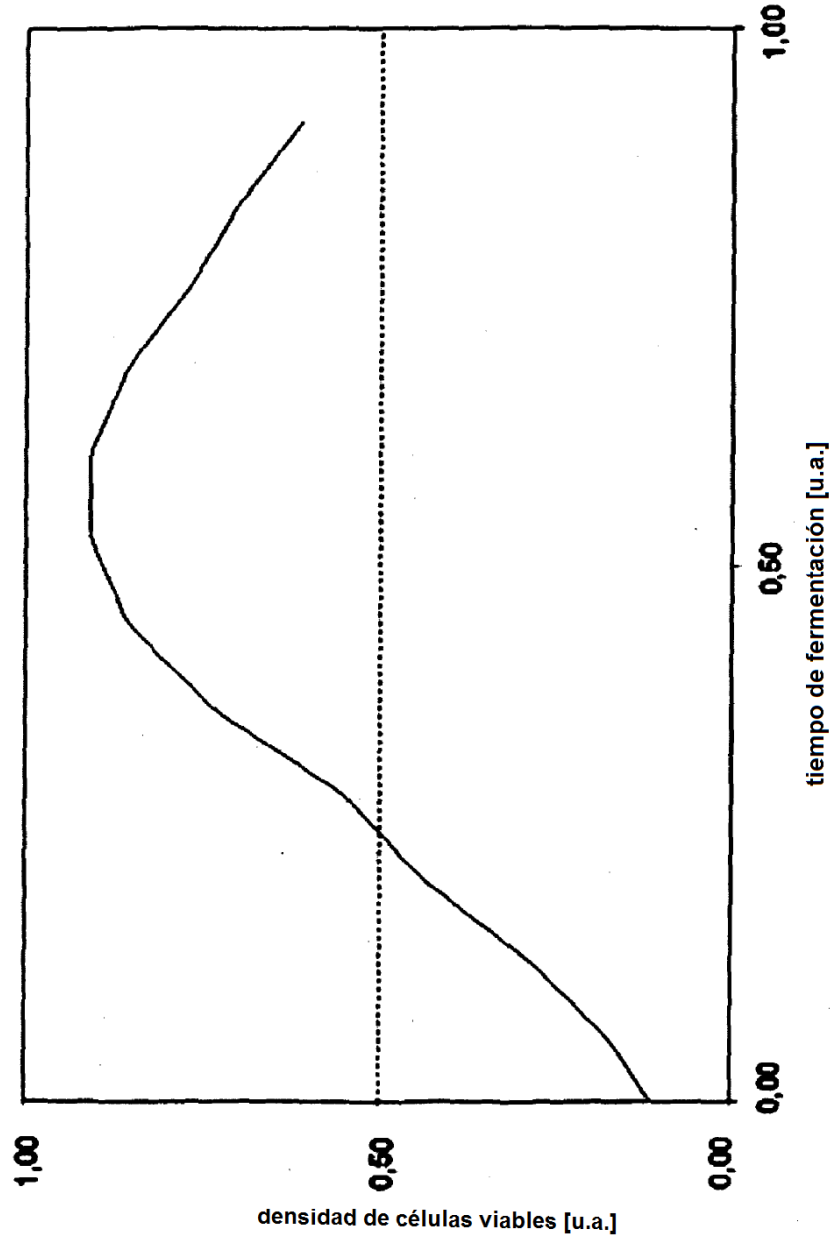


Fig. 10

b)

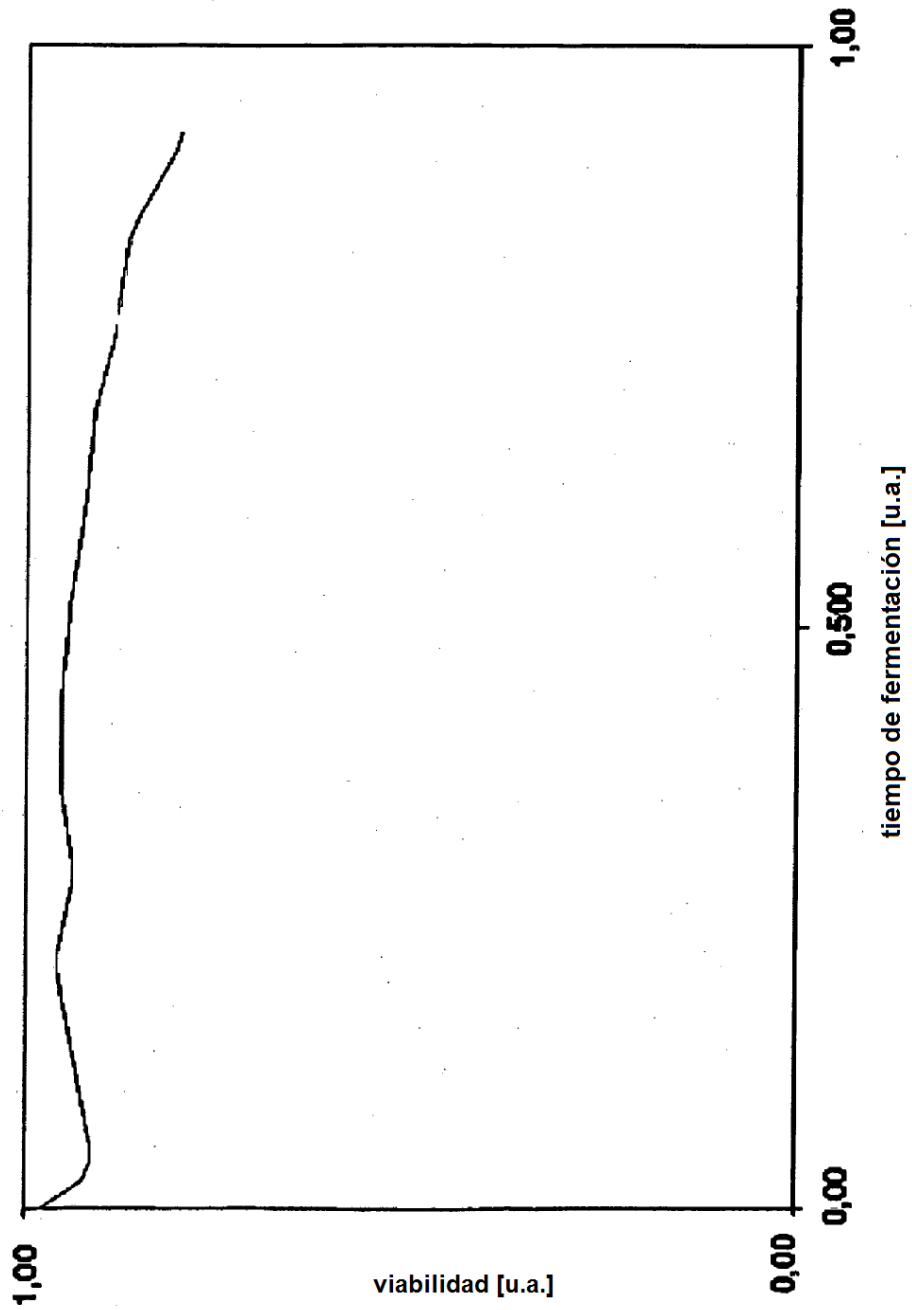


Fig. 11

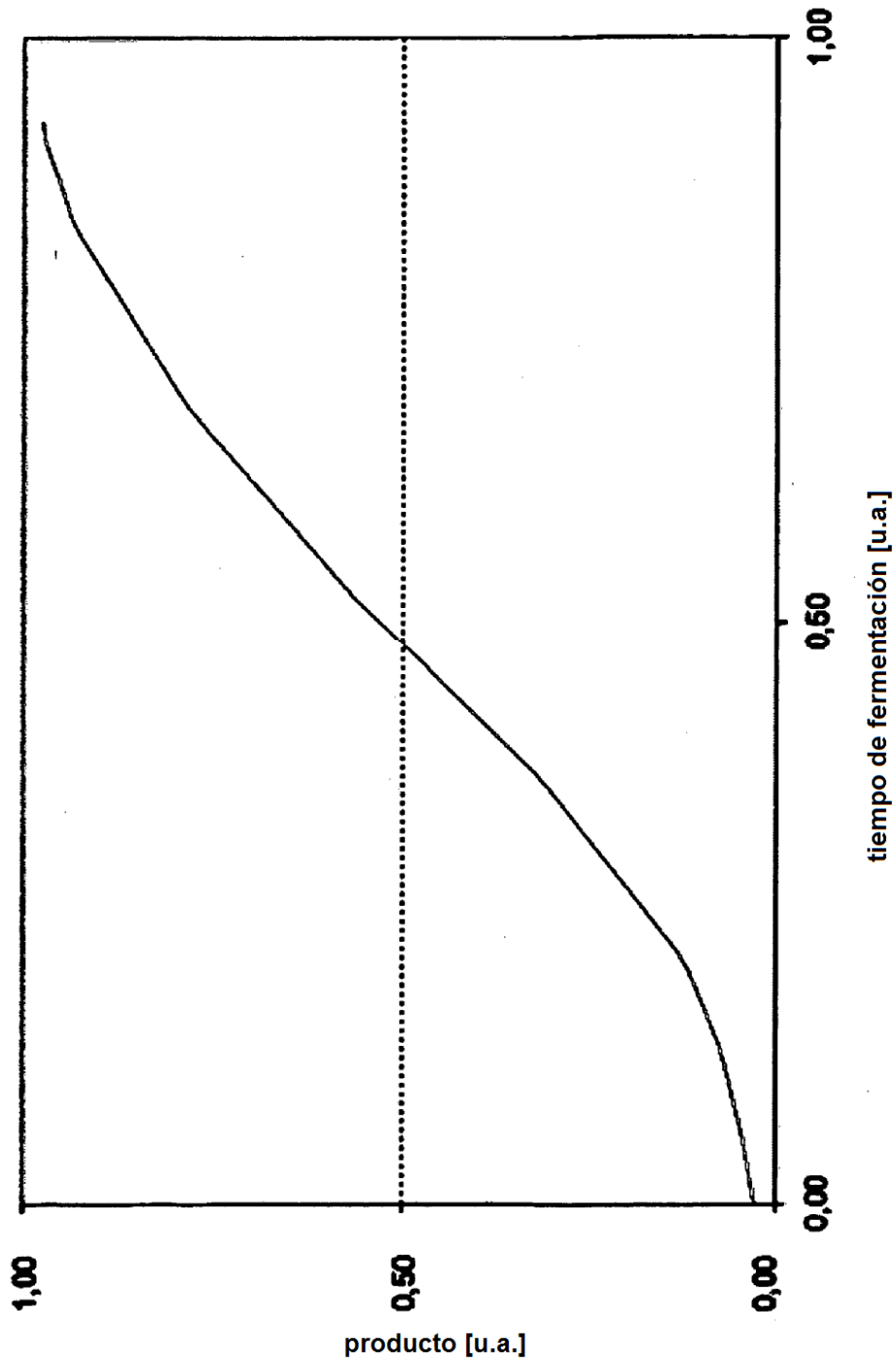


Fig. 12

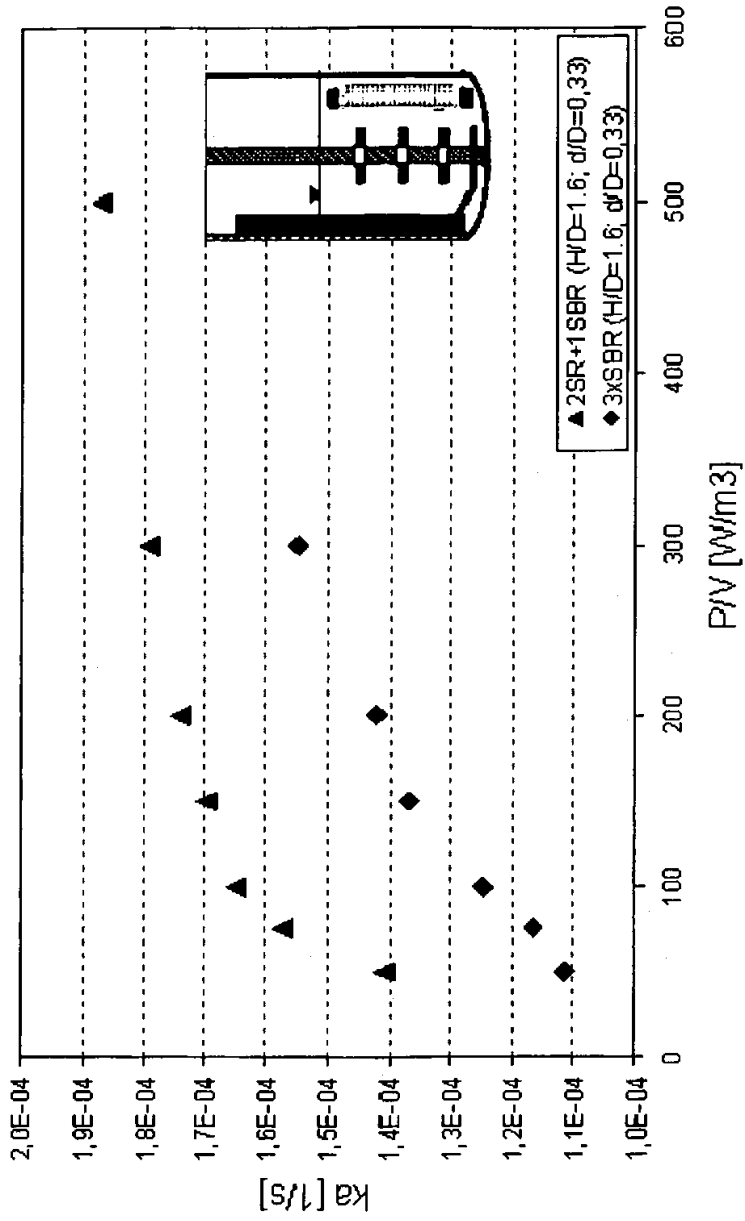


Fig. 13

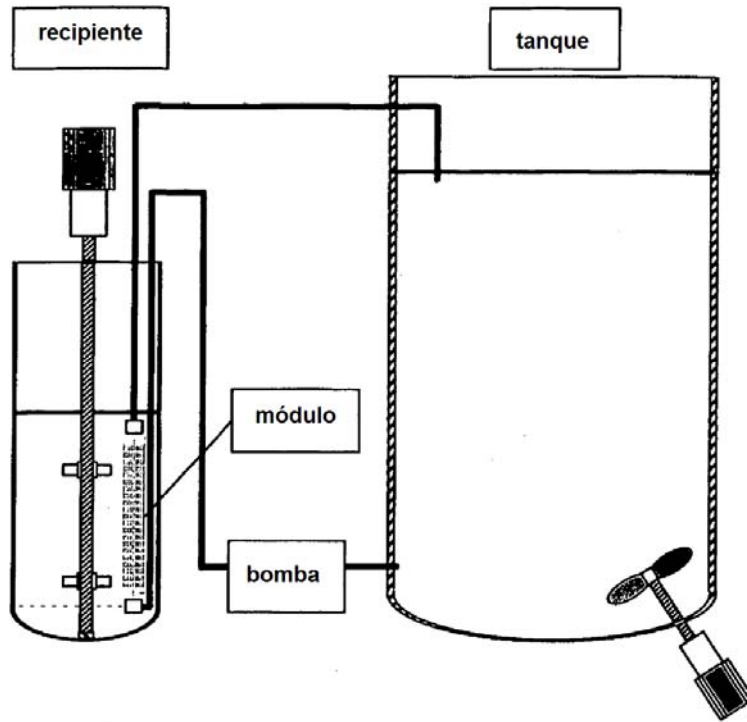


Fig. 14

