

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 463**

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: **02.06.2010** **E 10723936 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015** **EP 2437874**

54 Título: **Dispositivo para cultivar células**

30 Prioridad:

05.06.2009 EP 09007457

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

19.08.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JENZSCH, MARCO;
LECHNER, MAX;
POHLSCHIEDT, MICHAEL;
REESE, CHRISTOPH;
SCHOLZ, ALEXANDER y
TEBBE, HERMANN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 543 463 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

Dispositivo para cultivar células

En el presente documento se describe un agitador, un dispositivo que comprende el agitador y el uso del agitador para el cultivo de células. El agitador comprende al menos un elemento de transporte axial y al menos un elemento de transporte radial, tal como la combinación de un impulsor de tipo ancla como elemento de transporte radial y uno o más impulsor o impulsores de palas inclinadas como elemento de transporte axial. El uso del agitador da como resultado un mezclado mejorado y en particular una menor bioincrustación en procesos de diálisis, así como una mayor tasa de transferencia de masa.

Antecedentes tecnológicos

La producción de proteínas recombinantes, vacunas y anticuerpos con ayuda de células procariotas y eucariotas desempeña un papel esencial en la producción farmacéutica moderna. Para producir complejas proteínas modificadas de forma postraducciona y anticuerpos, se usan principalmente células de origen animal. Sin embargo, el uso de células de origen animal establece exigencias elevadas para el proceso de fermentación debido a las específicas características de estas células tales como, por ejemplo, el medio de cultivo, la sensibilidad hacia limitación e inhibidores (por ejemplo mediante lactato, CO₂, amonio etc.), la membrana externa sensible (tensión de cizallamiento), las bajas tasas específicas y la sensibilidad hacia variaciones en las condiciones de cultivo (por ejemplo debido a inhomogeneidades locales, variaciones de pH, variaciones de pO₂, etc.). Estas propiedades deben tenerse en cuenta cuando se diseñan biorreactores y para controlar el proceso.

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: adecuada suspensión, así como homogeneización, adecuado transporte de material y de calor, así como una tensión de cizalla mínima sobre las células. El reactor de tanque agitado es especialmente adecuado para el uso industrial. En este reactor, la energía necesaria para cumplir las funciones básicas se introduce mediante agitación mecánica.

Para conseguir un elevado valor cuantitativo del producto y de calidad del producto que cumpla con las especificaciones, el modo operativo del reactor en particular, desempeña un papel importante además del desarrollo de la línea celular, la composición de los medios y el diseño del reactor. Generalmente, se emplean los siguientes modos operativos: procesos por lotes, procesos por lotes alimentados, procesos continuos con o sin retención celular (por ejemplo perfusión o quimiostato) así como procesos semicontinuos tales como, por ejemplo, diálisis interna o externa.

Para prevenir limitaciones de nutrientes, se añaden soluciones de alimentación al reactor en forma de soluciones concentradas (denominadas procesos por lotes alimentados). Para impedir la inhibición por productos finales del metabolismo de las células, los productos del metabolismo de las células tienen que eliminarse del reactor o del medio de cultivo en el reactor. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante perfusión o diálisis. En el caso de diálisis, se diferencia entre diálisis externa o interna.

El documento EP 1 474 223 describe un mezclador dinámico. En el documento DE 10 2005 053 333 se describe un dispositivo de cultivo de células animales que comprende, un depósito para la captación de una suspensión celular, un dispositivo para la alimentación y descarga de gas en la suspensión celular, y un dispositivo para la producción de una corriente en la suspensión celular. En el documento EP 0 224 800 se describe un método y un aparato para el cultivo celular. El aparato comprende un mezclador y una membrana semipermeable que separa una primera cámara y una segunda cámara dentro de un dispositivo para cultivar células. Nomura, T., et al., J. Chem. Eng. Jap. 29 (1996) 134-138 describen el desarrollo y las características de mezclado de plegar un impulsor de tipo ancla para un matraz de fondo redondo. En el documento WO 01/41919 se describe un sistema de agitación del tubo de aspiración del impulsor para mezclado gas-líquido en un reactor de tanque agitado. En el documento US 4.438.074, se describe un reactor de polimerización continua. En el documento EP-A 0 200 886 se describe un sistema de agitación y un método para la transferencia de gas al interior de líquidos. En el documento EP-B 0 049 229 se describe un aparato para cocinar que tiene un dispositivo de agitación.

Nienow et al. (Trends. Biotechnol. 8 (1990) 224-233) describen agitadores para fermentaciones miceliales. En el documento US 5.633.165 se describe un fermentador con árbol vertical.

Sumario de la invención

El agitador, tal como se describe en el presente documento al menos, i) permite el mezclado rápido de medios de cultivo en comparación con otros mezcladores, por ejemplo para introducir agentes de corrección tales como ácidos o bases mediante la superficie del líquido o el medio de cultivo, ii) reduce la formación de espuma, iii) reduce la bioincrustación en procesos de diálisis y iv) incrementa la transferencia de masa en procesos de diálisis debido al flujo ortogonal directo contra el módulo de diálisis como resultado de la combinación de elementos de transporte de forma diferente.

En el presente documento se describe un agitador (mezclador de combinación) que comprende al menos un elemento de transporte axial y al menos un elemento de transporte radial con respecto al árbol del agitador, en el que el diámetro más grande del al menos un elemento de transporte axial es igual a o menor que el diámetro interno d_i del elemento de transporte radial.

En el presente documento se describe un agitador, que comprende

- un elemento de transporte radial que comprende al menos dos palas de mezclador, y
- uno o más elementos de transporte axial que comprenden, cada uno, al menos dos palas de mezclador, en el que las palas de mezclador del elemento de transporte radial son paralelas entre sí y al eje del árbol del agitador, y en el que el diámetro externo de todos los elementos de transporte axial es igual a o menor que el diámetro interno del elemento de transporte radial, y en el que todos los elementos de transporte axial están conectados individualmente al elemento de transporte radial, y en el que todos los elementos de transporte axial están ubicados dentro del elemento de transporte radial, y en el que todos los elementos de transporte tienen una orientación espacial fija unos con respecto a otros y con respecto al eje del árbol del agitador.

En una realización, el agitador comprende de 1 a 5 elementos de transporte axial, o en otra realización de 1 a 3 elementos de transporte axial, o también en una realización 1 o 2 elementos de transporte axial. En una realización, el al menos un elemento de transporte axial está situado en los cuatro quintos superiores del agitador determinados desde la parte superior del agitador y está a una distancia máxima de $h_{4/5}$ hasta la parte superior del agitador. También en una realización, un elemento de transporte axial está ubicado a una distancia máxima del 80% desde la parte de arriba de las palas del elemento de transporte radial (es decir, a una distancia máxima de 0,8 h) y/o un elemento de transporte axial está ubicado a una distancia máxima del 20% desde la parte de arriba de las palas del elemento de transporte radial (es decir a una distancia máxima de 0,2 h). En una realización adicional, el al menos un elemento de transporte axial y el al menos un elemento de transporte radial forman juntos un único elemento. En otra realización, las palas de mezclador opuestas del elemento de transporte radial están unidas entre sí por dos palas de mezclador opuestas de un elemento de transporte axial. En una realización, el diámetro de todos los elementos de transporte axial es idéntico. En otra realización, los elementos de transporte axial se seleccionan, independientemente entre sí, entre un agitador de hélice, agitador de palas reviradas o agitador de palas inclinadas.

Si el diámetro del elemento de transporte axial es menor que el diámetro interno del elemento de transporte radial, la distancia espacial entre la punta de la pala de mezclador del elemento de transporte axial y el borde interno del elemento de transporte radial es franqueada por un conector. El conector se selecciona, en una realización, entre alambre, varilla, chapa y disco.

En una realización adicional, todos los elementos de transporte, es decir los elementos de transporte axial así como radial, giran con el mismo número de rotaciones por unidad de tiempo alrededor del eje del árbol del agitador cuando se hace funcionar al agitador en un recipiente de cultivo. En una realización, los elementos de transporte están permanentemente unidos entre sí y el agitador consta de una pieza, es decir ambos elementos son impulsados por el mismo árbol giratorio y tienen el mismo número de rotaciones por unidad de tiempo alrededor del eje del árbol del agitador.

La relación d/D de diámetro del agitador (d) con respecto a diámetro del recipiente de cultivo (D) es, en una realización, de 0,2 a 0,8, en otra realización de 0,3 a 0,6 y también en una realización de 0,33 a 0,5. En otra realización, la relación h/d de altura de la pala (h) con respecto a diámetro del agitador (d) es de 0,5 a 5, en otra realización de 1 a 4 y también en una realización de 1 a 3. En otra realización más, la relación b/d de anchura de la pala del agitador (b) con respecto al diámetro del agitador (d) es de 0,05 a 0,3, en otra realización de 0,1 a 0,25. La expresión "de ... a" indica un intervalo que incluye los valores extremos enumerados. En otra realización, el diámetro del mezclador (d) se selecciona entre 500 mm, 600 mm, 700 mm, 800 mm, 1000 mm, 1200 mm, 1400 mm, 1600 mm, 1800 mm y 2000 mm. En una realización adicional, la anchura de la pala del agitador (b) se selecciona entre, 42 mm, 60 mm, 89 mm, 108 mm, 133 mm.

En una realización, el un elemento de transporte radial es un impulsor de tipo ancla. En una realización adicional, los elementos que conectan las palas de mezclador individuales del elemento de transporte radial son las palas de mezclador del elemento de transporte axial (palas de mezclador de conexión). En una realización, las palas de mezclador de conexión actúan del 20% al 100% como un elemento de transporte axial, en otra realización del 50% al 100% como un elemento de transporte axial, y también en una realización de aproximadamente el 100% como un elemento de transporte axial. El término "aproximadamente" indica que el valor dado es el punto central de un intervalo que abarca más/menos el 10% alrededor del valor. Si este valor es un valor de porcentaje, entonces "aproximadamente" indica también medias más/menos el 10%, pero el valor del 100% no puede superarse.

En una realización adicional, el elemento de transporte axial es un mezclador de palas inclinadas. En otra realización, el elemento de transporte radial es un impulsor de tipo ancla y el elemento de transporte axial es un

- mezclador de palas inclinadas donde el mezclador de palas inclinadas está diseñado para actuar como un elemento de conexión de palas del impulsor de tipo ancla. En otra realización, todas las palas opuestas del elemento de transporte radial están conectadas entre sí mediante palas de un elemento de transporte axial. En una realización, los agitadores constan de una combinación de uno o dos elementos de transporte axial y un elemento de transporte radial con respecto al eje del árbol del agitador. En otra realización el elemento de transporte radial es un impulsor de tipo ancla y los elementos de transporte axial son dos mezcladores de palas inclinadas en los que las palas de los mezcladores de palas inclinadas están diseñados para actuar como elementos de conexión de palas opuestas del impulsor de tipo ancla.
- 10 La relación h_{SB}/b de la altura del elemento de transporte axial y la anchura de las palas del elemento de transporte radial es de 0,5 a 4, en otra realización de 0,8 y 3, y también en una realización de 1 a 2. En otra realización, el paso de las palas de mezclador del mezclador de palas inclinadas es de 10° a 80° , en una realización adicional de 24° a 60° , y también en una realización de 40° a 50° con respecto al eje del árbol del agitador.
- 15 En una realización, el elemento de transporte radial tiene de 1 a 8 palas de mezclador, en otra realización de 1 a 4 palas de mezclador y también en una realización 4 palas de mezclador. El elemento de transporte axial tiene, en una realización, de 1 a 10 palas de mezclador, en otra realización de 2 a 6 palas de mezclador y también en una realización 4 palas de mezclador. En otra realización, los elementos de transporte radial y de transporte axial tienen el mismo número de palas de mezclador.
- 20 En una realización, el dispositivo de bloqueo en el árbol del agitador está en el tercio inferior visto desde la parte superior del mezclador y también tiene una relación h_u/h_m de la altura de la parte de reducción (h_u) y la altura de la tapa hermetizante (h_m) de 0,05 a 1, en otra realización de 0,2 a 0,8, y también en una realización de 0,3 a 0,5.
- 25 En una realización, el agitador tiene una altura de al menos 200 mm, en otra realización de 200 mm a 5000 mm. En otra realización, la altura del agitador es la altura h de las palas del elemento de transporte radial.
- En el presente documento se describe como un aspecto un dispositivo que comprende el agitador tal como se describe en el presente documento, un módulo de diálisis y un recipiente de cultivo. En una realización, el agitador y el recipiente de cultivo forman una unidad funcional, es decir el agitador está dentro del recipiente de cultivo y puede girar dentro del recipiente de cultivo sin ninguna limitación espacial. En una realización, el recipiente de cultivo es un reactor de tanque agitado. En una realización adicional, el recipiente de cultivo es un reactor de tanque agitado de aireado o gaseado sumergido. En una realización, el recipiente de cultivo comprende de 2 a 4 deflectores. En otra realización, los deflectores están separados de forma equidistante alrededor de la circunferencia de la superficie interna del recipiente de cultivo.
- 30 La relación d/D de diámetro del agitador (d) con respecto al diámetro del recipiente de cultivo (D) es, en una realización, de 0,2 a 0,8, en otra realización de 0,3 a 0,6, y también en una realización de 0,33 a 0,5. En otra realización, la relación H/D de altura de llenado del recipiente de reacción (H) con respecto a diámetro del recipiente de cultivo (D) es de 1,0 a 2,5, en una realización adicional de 1,1 a 2,0, y también en una realización de 1,4 a 1,8. En una realización, el recipiente de cultivo tiene un volumen de trabajo de 5 l a 25.000 l.
- 40 En el presente documento también se describe como un aspecto, el uso del dispositivo tal como se describe en el presente documento. En una realización, el uso es para el cultivo de células para la producción de un polipéptido, es decir para el cultivo de células que expresan un polipéptido codificado por un ácido nucleico heterólogo. En una realización, el cultivo es una diálisis. En una realización adicional, el cultivo se lleva a cabo en un reactor de tanque agitado de gaseado sumergido. En otra realización, la célula es una célula eucariota. También en una realización, la célula es una célula de mamífero. En una realización adicional más, la célula se selecciona entre una célula CHO, una célula BHK, una célula NS0, una célula COS, una célula PER.C6, una célula Sp2/0 y una célula HEK 293. En una realización, el polipéptido es un anticuerpo. En una realización adicional el anticuerpo es un anticuerpo contra CD20, CD22, HLA-DR, CD33, CD52, EGFR, G250, GD3, HER2, PSMA, CD56, VEGF, VEGF2, CEA, antígeno Y de Lewis, el receptor de IL-6 o el receptor de IGF-1.
- 50 En el presente documento se describe además como un aspecto, un método para la producción de un polipéptido que comprende
- 55 a) proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido,
b) proporcionar un dispositivo tal como se describe en el presente documento,
c) cultivar la células en el dispositivo en un medio de cultivo en el que el agitador proporciona un flujo turbulento dentro del recipiente de cultivo, y
60 d) recuperar el polipéptido de las células o el medio de cultivo y producir, de este modo, un polipéptido.
- En una realización, el método es para el cultivo de una célula que expresa un polipéptido codificado por un ácido nucleico heterólogo. En una realización, el cultivo es una diálisis. En una realización adicional, el cultivo se lleva a cabo en un reactor de tanque agitado de gaseado sumergido. En otra realización, la célula es una célula eucariota. También en una realización, la célula es una célula de mamífero. En una realización adicional más, la célula se
- 65

selecciona entre una célula CHO, una célula BHK, una célula NS0, una célula COS, una célula PER.C6, una célula Sp2/0 y una célula HEK 293. En una realización, el polipéptido es un anticuerpo. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo contra CD20, CD22, HLA-DR, CD33, CD52, EGFR, G250, GD3, HER2, PSMA, CD56, VEGF, VEGF2, CEA, antígeno Y de Lewis, el receptor de IL-6 o el receptor de IGF-1.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se describe un agitador, que es un mezclador de combinación, que comprende un elemento de transporte radial con uno o más elementos de transporte axial definidos e integrados. El término "elemento" indica una unidad (funcional) de palas de mezclador que están en una configuración espacial fija unas con respecto a otras en cuanto a distancia y ángulo. Un elemento de transporte radial indica un mezclador cuyas palas de mezclador no tienen ningún paso con respecto al eje del árbol. Un elemento de transporte axial indica un mezclador cuyas palas de mezclador tienen un paso con respecto al eje del árbol. Las palas de mezclador de los elementos de transporte son, en una realización rectangular, placas aunque pueden usarse otras formas geométricas. La dirección de transporte de un elemento se indica con respecto al eje del árbol del agitador. Los elementos de transporte axial, especialmente las palas individuales de los mismos, están dispuestos como piezas de conexión entre las palas del elemento de transporte radial. En el presente documento también se describe un dispositivo que comprende el agitador y un recipiente de cultivo. También se describe el uso del agitador y el dispositivo en el cultivo de células, en particular en un proceso semicontinuo tal como, por ejemplo, diálisis interna o externa. Realizaciones ejemplares de los agitadores, tal como se describen en el presente documento, se muestran en la figura 1.

Cada uno de los elementos de transporte consta de un número definido de palas de mezclador. Cada pala está conectada directamente al árbol giratorio o está conectada al árbol giratorio mediante un buje. Cada pala de mezclador independiente del elemento de transporte tiene un borde externo y un borde interno. La parte de cada pala de mezclador que tiene la máxima distancia hasta el eje del árbol se indica como 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 mezclador opuestas y el diámetro interno de un elemento de transporte radial es la mínima distancia entre bordes internos de palas de mezclador opuestas. En el agitador, tal como se describe en el presente documento, el elemento o elementos de transporte axial está o están ubicados dentro del elemento de transporte radial. Por lo tanto, el diámetro externo del o los (todos) elemento o elementos de transporte axial es o son iguales a o menores que el diámetro interno del elemento de transporte radial, permitiendo que el elemento o elementos de transporte axial se coloquen dentro del elemento de transporte radial. Algunas palas de mezclador de (cada uno de) el elemento o elementos de transporte axial conectan palas de mezclador opuestas del elemento de transporte radial. Dado que los elementos de transporte radial no están directamente conectados entre sí por esta conexión (cada uno de) el elemento de transporte axial está individualmente, es decir por sí mismo, conectado al elemento de transporte radial. No es necesario que las palas de mezclador de conexión del elemento de transporte axial estén formadas como palas de mezclador durante toda la distancia entre las palas de mezclador del elemento de transporte radial. Por lo tanto, no es necesario que las palas de conexión del elemento de transporte axial tengan la función de un transporte axial durante toda la distancia, es decir no tienen que estar formadas como una pala de mezclador durante toda la distancia. Es decir, la pala de mezclador del elemento de transporte axial puede ser más corta que la distancia espacial hasta el borde interno de la pala de mezclador del elemento de transporte radial. Esta separación espacial se llena mediante un conector que no tiene ninguna forma especial pero permite la conexión de la punta de la pala del elemento de transporte axial con el borde interno de la pala del elemento de transporte radial.

La altura h del elemento de transporte radial es más de 10 veces la altura h_{SB} de los elementos de transporte axial. De este modo, cada uno de los elementos de transporte axial puede estar colocado en diferentes posiciones con respecto a la altura del elemento de transporte radial. En una realización, un elemento de transporte axial está ubicado, es decir está colocado, dentro de una distancia máxima de 80% de la altura total h del elemento de transporte radial con respecto a la parte superior K del agitador. Esto indica que el elemento de transporte axial tiene una máxima distancia desde la parte superior del agitador de $0,8 h$.

El árbol giratorio (también denominado árbol motor) se extiende a través del eje longitudinal del recipiente de cultivo en el que se usa el agitador.

La modificación con respecto a un impulsor principalmente de transporte radial, por ejemplo a un impulsor de tipo ancla, es el mezclador de palas inclinadas de transporte hacia abajo (axial) que está integrado en la región superior y/o media y/o inferior del elemento de transporte radial. El agitador, tal como se describe en el presente documento, permite, entre otras cosas, un mezclado mejorado de soluciones líquidas, por ejemplo para introducir agentes correctores tales como, por ejemplo, un ácido o una base, soluciones de nutrientes, agentes antiespumantes o también CO_2 o O_2 mediante la superficie del líquido. Además, el agitador reduce la formación de espuma y, en un proceso de diálisis, reduce la bioincrustación e incrementa la transferencia de masa mediante un flujo ortogonal directo contra el módulo de diálisis. Se ha descubierto que el elemento o elementos de transporte axial adicionales sorprendentemente no incrementan la tensión de cizallamiento mientras que, al mismo tiempo, mejoran el mezclado y el transporte de masa en el módulo de diálisis.

En procesos de cultivo semicontinuos, tales como, por ejemplo, diálisis externa o interna, los sustratos son alimentados al reactor a través de una membrana y, al mismo tiempo, componentes inhibidores / productos metabólicos de las células cultivadas son retirados. Este intercambio de material es por difusión. Los principales factores de influencia son, por lo tanto, la diferencia de concentración prevalente, el material de la membrana, la superficie de la membrana, los coeficientes de difusión de los respectivos compuestos dentro del material de la membrana y el grosor de la interfaz de fase que es determinado por el flujo contra la membrana.

Cuando se emplea diálisis en fermentación a alta densidad celular, es un proceso semicontinuo similar a perfusión en el que un módulo de diálisis (de fibra hueca) fijado en el reactor proporciona el área de intercambio entre el medio de cultivo y medio nutriente fresco. El medio nutriente es bombeado desde un depósito de almacenamiento a través del módulo de diálisis y seguidamente es devuelto de nuevo al interior del depósito de almacenamiento (para un diagrama esquemático véase la figura 2). El módulo de diálisis puede estar ubicado fuera del reactor (diálisis externa) o dentro del reactor (diálisis interna). Las mismas leyes físicas se aplican a ambos modos operativos.

Por lo tanto, en el presente documento se describe un dispositivo que comprende un agitador tal como se describe en el presente documento y un recipiente de cultivo. En una realización, el dispositivo también comprende un módulo de diálisis. Los componentes del dispositivo están dimensionados de tal manera que puedan ejercer su función pretendida, es decir el recipiente de cultivo puede recoger el medio de cultivo, el agitador puede mezclar el medio y dispersar un compuesto añadido en su interior y el módulo de diálisis puede proporcionar medio fresco y retirar compuestos metabólicos secretados por las células cultivadas. Por lo tanto, el agitador tiene un diámetro que permite una rotación sin trabas dentro del recipiente en presencia y ausencia del módulo de diálisis. Se ha descubierto que, con el dispositivo tal como se describe en el presente documento, un cultivo con alta densidad celular tal como cultivo por perfusión o como cultivo por diálisis puede llevarse a cabo ventajosamente. El cultivo se lleva a cabo en una realización a una velocidad de rotación del agitador a la que puede conseguirse una potencia absorbida 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 tal como se describe en el presente documento, cultivar células de mamífero sensibles al cizallamiento a una velocidad de rotación inferior del agitador pero a la misma potencia absorbida en comparación con mezcladores conocidos.

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 agitado. 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 nutriente fresco se difunden desde el interior del módulo de diálisis a través de la membrana de fibra hueca semipermeable al interior del reactor y, al mismo tiempo, metabolitos de las células cultivadas se difunden en la dirección opuesta desde el reactor al interior del medio nutriente de acuerdo con la diferencia de concentración. El objetivo es mantener la concentración absoluta de metabolitos inhibidores en el reactor lo más baja posible (dilución) y, al mismo tiempo, mantener la concentración de nutrientes esenciales durante el mayor tiempo posible a un nivel óptimo para el cultivo. Esto da como resultado condiciones de cultivo mejoradas en comparación con un proceso sin diálisis que permite conseguir mayor densidad celular máxima o valor cuantitativo del producto.

Los procesos de transporte en el módulo de diálisis pueden describirse de manera equivalente a la transferencia de masa en una burbuja de gas mediante la teoría de dos películas junto con la primera ley de Fick. Por lo tanto, suponiendo gradientes lineales basados en el área de intercambio A_H del módulo de diálisis de fibra hueca, el flujo de difusión transferido efectivo J_{eff} es de acuerdo con la ecuación 1:

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

La fuerza motriz de la difusión es la diferencia de concentración Δc_i entre el interior y el exterior del módulo de diálisis con respecto a la trayectoria de difusión eficaz z_{eff} . Esta trayectoria de difusión eficaz está compuesta por las trayectorias individuales a través de la capa límite laminar interna en el lado interno 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 en el lado externo de la membrana de fibra hueca en el reactor δ_{HI} (véase la figura 3). Éstas dependen generalmente del tamaño y la forma de la molécula de difusión, las propiedades del medio circundante y la temperatura. Pueden definirse coeficientes de transferencia de masa diferentes para las secciones individuales respectivas y, a partir de la suma de sus recíprocos, la resistencia a la transferencia de masa total $1/k$ puede darse de acuerdo con la ecuación 2:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_{HI}} + \frac{1}{k_M} + \frac{1}{k_{BI}} \quad (\text{Ecuación 2}).$$

Las resistencias al transporte en las capas limítrofes laminares en el lado interno y externo de la membrana de fibra hueca también dependen del flujo contra la membrana de fibra hueca. Cuanto mejor, es decir más perpendicular, es el flujo hacia la membrana más estrechas se vuelven las capas limítrofes laminares y menores son las resistencias al transporte correspondientes.

Para un módulo de diálisis en un reactor existe una dependencia directa de la resistencia al transporte de la capa limítrofe laminar externa de, entre otras cosas, los siguientes factores:

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

La resistencia de la capa limítrofe laminar en el lado interno de la membrana de fibra hueca puede despreciarse debido al corto diámetro interno y las elevadas velocidades de flujo concomitantes. En esta solicitud, la expresión "lado interno de la membrana de fibra hueca" indica el lado de la membrana de fibra hueca que se enfrenta al depósito de almacenamiento. La expresión "lado externo de la membrana de fibra hueca" indica el lado de la membrana de fibra hueca que se enfrenta al reactor. La resistencia a la transferencia de masa total es, de este modo, una resistencia en serie a la que contribuyen principalmente la resistencia dentro de la membrana y la resistencia de la capa limítrofe laminar externa (Rehm, et. al., Biotechnology - volumen 3: Bioprocessing, VCH Weinheim, 1993). El coeficiente de transferencia de masa total k resulta de la resistencia a la transferencia de masa total recíproca y puede estar relacionado con el área superficial mediante multiplicación con la superficie específica de volumen a del módulo de diálisis de fibra hueca (valor ka).

La siguiente ecuación 3 puede usarse para describir las evoluciones temporales de concentración para los espacios de equilibrio del reactor y el recipiente de almacenamiento:

$$\frac{dc_R}{dt} = ka \cdot (c^* - c_R) \quad (\text{Ecuación 3}).$$

Las evoluciones temporales de concentración típicas en el reactor c_R y el depósito de almacenamiento c_V se muestran en la figura 4.

En general, en el cultivo celular se usan reactores de gaseado sumergido. En estos casos, se usa principalmente un sistema mezclador de transporte axial de una fase o dos fases. Esto genera un perfil de flujo que es esencialmente paralelo al árbol giratorio del mezclador empleado. Por lo tanto, en la disposición tal como se muestra en la figura 2 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 limítrofe 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 conseguirse, por ejemplo, mediante un impulsor de tipo ancla convencional. Este impulsor genera un flujo que es dirigido directamente sobre el módulo o módulos de diálisis en el reactor y reduce, de este modo, la capa limítrofe laminar sobre la superficie del módulo o módulos de diálisis. Este flujo radial simple es, sin embargo, desventajoso para las otras funciones del proceso técnicas básicas en particular con respecto a mezclado en el reactor y transferencia de masa especialmente en reactores de gaseado sumergido. El gas puede introducirse en el recipiente de cultivo por ejemplo mediante un rociador de tubería o un rociador de anillo.

Se ha descubierto que el agitador (mezclador de combinación), tal como se describe en el presente documento, permite un flujo ortogonal directo contra o hacia el módulo de diálisis y, al mismo tiempo, es adecuado para mezclado en líquidos en/desde la superficie del medio de cultivo y para mezclado total rápido del medio de cultivo, con lo que la tensión de cizallamiento para las células en el reactor casi no se ha incrementado en comparación con otros sistemas de agitación. Ha resultado que el flujo axial generado por el elemento o elementos de transporte axial, es decir por ejemplo mediante mezcladores de palas inclinadas, garantiza un mezclado del medio de cultivo en un tiempo corto. Además células sensibles al cizallamiento tales como células de mamífero pueden cultivarse a la misma tensión de cizallamiento con eficiencia de mezclado incrementada usando el agitador tal como se describe en el presente documento.

El agitador, tal como se describe en el presente documento, combina o integra las propiedades de un elemento de transporte radial, es decir por ejemplo de un impulsor de tipo ancla, que son importantes para una aplicación en procesos de diálisis con las de un elemento de transporte axial, tal como por ejemplo un mezclador de palas inclinadas, que son importantes para cumplir los requisitos o funciones técnicas básicas del proceso. Realizaciones ejemplares del agitador, tal como se describen en el presente documento, se muestran en las figuras 1a) a 1f) en las que uno o más de los elementos de conexión de un elemento de transporte radial (impulsor de tipo ancla) están diseñados como elemento de transporte axial (mezclador de palas inclinadas). Realizaciones específicas se muestran en las figuras 1a) a 1f).

La velocidad de rotación del mezclador n se usa como una velocidad característica y la anchura del mezclador d se usa como una longitud característica.

En dinámica de fluidos el número de Reynolds describe la relación de fuerza inercial con respecto a fuerza friccional interna en un sistema hidrodinámico. A partir de éste, también pueden realizarse afirmaciones acerca del grado de turbulencia del medio desplazado. Para líquidos agitados, en la ecuación 4 se define que el número de Reynolds del mezclador se define es:

$$Re = \frac{n \cdot d^2}{\nu} = \frac{n \cdot d^2 \cdot \rho}{\eta} \quad . \quad (\text{Ecuación 4})$$

El número de Newton (también denominado como número de potencia) describe la relación de fuerza de resistencia con respecto a fuerza de flujo y es, por lo tanto, una medida para la resistencia al flujo de un mezclador en un material agitado y se describe en la ecuación 5:

$$Ne = \frac{P}{\rho \cdot n^3 \cdot d^5} \quad . \quad (\text{Ecuación 5})$$

Los agitadores con un número de Newton bajo, tales como mezcladores de hélice o de palas inclinadas, convierten la potencia absorbida de forma más eficiente en salida hidrodinámica, es decir movimiento del fluido, que aquellos con un número de Newton elevado, tales como turbinas Rushton.

Un criterio para evaluar los procesos de agitación en procesos de cultivo es el tiempo de mezclado. El "tiempo de mezclado" en una mezcla líquido-líquido no homogénea indica el tiempo que se requiere para conseguir una homogeneidad definida en el medio de cultivo. Factores que influyen en el tiempo de mezclado son el grado de mezclado y el punto de observación. El grado de mezclado, a su vez, depende de la geometría del reactor, la geometría del mezclador, la frecuencia de rotación del mezclador y las sustancias de los materiales agitados.

Es importante para procesos de cultivo que, en la medida de lo posible, todas las células sean óptima y uniformemente suministradas con los sustratos necesarios (tales como medio nutriente, O_2) y que los metabolitos (tales como productos sobrantes, CO_2) son retirados de forma concomitante. Esto significa que los repositorios y sumideros que pueden producirse espacial así como temporalmente en el reactor tienen que evitarse o minimizarse para evitar daños a las células. Esto puede conseguirse por ejemplo usando un sistema de agitación adaptado para mezclar el contenido del reactor. Los procesos de mezclado pueden dividirse en los subprocesos micromezclado y macromezclado. El micromezclado se define como el ajuste de concentración molecular debido a la difusión o microturbulencias; en contraste el macromezclado se define como el mezclado grosero convectivo causado por el agitador (véase por ejemplo Houcine, I., et al., Chem. Eng. Technol. 23 (2000) 605-613; Zlokarnik, M., "Rührtechnik Theorie und Praxis", Springer Publishers, Berlín Heidelberg, 1999). El grado de mezclado puede, de acuerdo con Henzler (Henzler, H.-J., "Homogenisieren: Referenz-Rührsysteme und Methoden zur Erfassung der Homogenisierungseigenschaften von Rührsystemen", GVC Fachausschuß Mischvorgänge, 1998) definirse de la siguiente manera en la ecuación 6:

$$\chi_1 = 1 - \frac{\Delta a}{\bar{a}} \quad . \quad (\text{Ecuación 6}).$$

En esta ecuación $\bar{a}$ corresponde a la concentración de la sustancia indicadora después de un mezclado teóricamente completo y Δa corresponde a la máxima diferencia entre las concentraciones locales de la sustancia

indicadora a un tiempo t . En general, un grado de entremezclado de $X_1 = 0,95$ se considera suficiente (véase Henzler, *supra*). El coeficiente de mezclado $C_{H,0,95}$ tal como se describe en la ecuación 7 se basa en este grado de mezclado y es el producto del tiempo de mezclado $\theta_{0,95}$ y la velocidad de rotación del mezclador n que se usó. Por lo tanto, corresponde al número de revoluciones del mezclador que se requieren después de añadir un agente corrector para conseguir un grado de intermezclado de 0,95 y resulta de la ecuación 7:

$$C_{H,0,95} = \Theta_{0,95} \cdot n \quad . \quad (\text{Ecuación 7}).$$

Los coeficientes de mezclado tal como se muestra en la tabla 1 y en extractos en la figura 5 se determinaron usando el método de decoloración y resultan las investigaciones del tiempo de mezclado (características de mezclado véase la ecuación 7). Un error relativo máximo de $\pm 15\%$ se determinó mediante múltiples mediciones.

Tabla 1: Coeficientes de mezclado.

Mezclador	H/D	d/D	$C_H(\text{Re})$
agitador tal como se describe en el presente documento (KR)	1,6	0,4	31
mezclador con un mezclador de disco convencional (1SSR)	1,0	0,33	42
mezclador con tres mezcladores de palas inclinadas diferentes (3SBR)	1,6	0,33	64
mezclador con tres mezcladores de disco convencionales diferentes (3SSR)	1,6	0,33	77

A partir de los datos presentados en la tabla 1, puede verse que el agitador tal como se describe en el presente documento (KR) permite un índice de mezclado promedio considerablemente más corto de aproximadamente 31 a un número de Reynolds constante, por ejemplo en comparación con un mezclador de combinación que consta de tres mezcladores de palas inclinadas diferentes (3SBR) con un coeficiente de mezclado promedio de 64. En los experimentos puede verse que el tiosulfato sódico es rápidamente aspirado al interior del líquido cerca del árbol del agitador.

Otro parámetro relevante para el proceso 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 es, por un lado, causada por el propio mezclador y, por otro lado, 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, en su mayoría, predominantes en reactores de tanque agitado, la tensión hidrodinámica viene dada por el enfoque de tensión de Reynolds de acuerdo con la ecuación 8 (Henzler, H.J. y Biedermann, A., Chem. Ing. Tec., 68 (1996) 1546-1561):

$$\tau_{turb} = \rho \cdot u'^2 \quad . \quad (\text{Ecuación 8}).$$

De acuerdo con la ecuación 8, puede deducirse que la tensión principal se debe a la fluctuación de velocidad turbulenta u' de los elementos del fluido.

La caracterización de tensión de cizallamiento se llevó a cabo en estado no gaseoso con un módulo de diálisis incorporado. Los diámetros de partícula de referencia d_{VF} que se determinaron se muestran en la figura 6.

Puede verse que, con el agitador tal como se describe en el presente documento, puede obtenerse uno de los mayores diámetros de partícula de referencia y, por lo tanto, éste es el sistema con el cizallamiento más bajo a una potencia absorbida constante. Por lo tanto, a las mismas fuerzas de cizallamiento por ejemplo para las células cultivadas, es posible conseguir una mayor potencia absorbida que, debido a un número mayor de revoluciones, causa mayores turbulencias y un flujo mayor contra el módulo de diálisis, así como un mejor mezclado completo.

Además de NaCl, también se usó glucosa como sustancia indicadora para determinar de forma experimental los coeficientes de transferencia de masa. En general, podía mostrarse que la transferencia de masa del módulo de diálisis está, por un lado, influida por la potencia absorbida y, por otro lado, por la geometría del mezclador, es decir el modo de flujo generado primario. Los perfiles de flujo tangencial o radial han demostrado ser particularmente adecuados con respecto a reducir las capas limítrofes laminares externas alrededor de las membranas de diálisis de fibra hueca (mayores tasas de transferencia de masa). Los mayores coeficientes de transferencia de masa pueden conseguirse, en cada caso, mediante el agitador tal como se describe en el presente documento.

La figura 7 muestra una comparación de los números de Newton. Tal como puede verse, el agitador tal como se describe en el presente documento permite un número de Newton considerablemente más elevado. Al mismo

tiempo, puede verse que el número de potencia es independiente del número de Reynolds. Por lo tanto, el agitador permite un número de potencia incrementado independiente del número de Reynolds cuando se le hace funcionar para producir un flujo turbulento dentro del recipiente de reacción.

La figura 8 muestra que los coeficientes de transferencia de masa más elevados del módulo de diálisis a una potencia absorbida específica de volumen constante pueden conseguirse con el agitador tal como se describe en el presente documento. Esto es debido al flujo radial generado por el mezclador tal como se describe en el presente documento que, en comparación con los sistemas mezcladores convencionales, permite un mejor flujo contra el módulo de diálisis de fibra hueca.

En comparación con sistemas agitadores convencionales, el agitador tal como se describe en el presente documento permite ventajas considerables en el mezclado (figura 5, tabla 1), la tensión de cizallamiento generada (figura 6), así como en los coeficientes de transferencia de masa en diálisis (figura 8). Es particularmente destacable que, a pesar de las modificaciones introducidas, no puedan medirse un número significativamente más elevado de tensiones de cizallamiento (véase por ejemplo Pohlscheidt, M., et. al., Chem. Ing. Tec. 80 (2008) 821-830).

Las abreviaturas usadas en esta 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 mezclador del elemento de transporte radial

h_m : altura del manguito de fijación

h_{SB} : altura de un elemento de transporte axial

h_u : altura del reductor

Δh : diferencia de altura de dos elementos de transporte axial

l: longitud de las palas de mezclador de un elemento de transporte axial

α : paso de pala de las palas de un elemento de transporte axial

z: número de palas de mezclador por mezclador

d_i : distancia interna entre las palas de mezclador del elemento de transporte radial

$h_{4/5}$: 4/5 de altura desde encima de h

K: parte superior del mezclador, es decir el punto más alto del mezclador cuando éste no está fijado a un árbol giratorio

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 axial con respecto al diámetro del recipiente de cultivo (D) es al menos 0,75.

En el presente documento, se describe el uso del agitador tal como se describe en el presente documento para el cultivo de células para la producción recombinante de proteínas o anticuerpos como un aspecto. En una realización, el cultivo es una diálisis. En una realización adicional, el cultivo se lleva a cabo en un reactor de tanque agitado de gaseado sumergido. En otra realización, la célula es una célula eucariota, en otra realización una célula de mamífero. En una realización adicional más, 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 se selecciona entre *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 delbruekii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus luteus*, células MDCK, *Paenobacillus macerans*, *P. pastoris*, *Pseudomonas species*, *S. cerevisiae*, *Rhodobacter species*, *Rhodococcus erythropolis*, *Streptomyces species*, *Streptomyces anulatus*, *Streptomyces hygroscopicus*, células Sf-9 y *Xantomonas campestris*. En una realización adicional más, el anticuerpo es un anticuerpo contra CD20, CD22, HLA-DR, CD33, CD52, EGFR, G250, GD3, HER2, PSMA, CD56, VEGF, VEGF2, CEA, antígeno Y de Lewis, receptor de IL-6 o receptor de IGF-1.

El siguiente ejemplo y figuras se proporcionan para ilustrar el asunto de la invención. El alcance protector está definido por las reivindicaciones de patente adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1

Diagrama esquemático de diversas realizaciones: del mezclador de combinación tal como se describe en el presente documento; b: anchura de la pala de mezclador; d: diámetro del mezclador; d_w : diámetro del árbol giratorio; h: altura de la pala de mezclador del mezclador de transporte radial; h_m : altura del manguito de fijación; h_{SB} : altura del mezclador de transporte axial; h_u : altura del reductor; l: longitud de la pala de mezclador del mezclador de transporte axial; α : paso de pala del mezclador de transporte axial; z: número de palas de mezclador por mezclador; d_i : distancia interna entre las palas de mezclador del mezclador de transporte radial; $h_{4/5}$: 4/5 de altura desde encima de h; K: parte superior del mezclador;

5		a) esquema general del agitador tal como se describe en el presente documento; b) a f) realizaciones del agitador tal como se describe en el presente documento; g) esquema de un elemento de transporte radial visto desde arriba a lo largo del eje del árbol; h) esquema de un elemento de transporte axial visto desde arriba a lo largo del eje del árbol; i) esquema de una realización del agitador tal como se describe en el presente documento visto desde arriba a lo largo del eje del árbol que muestra la conexión de palas de mezclador opuestas del elemento de transporte radial mediante palas de mezclador de conexión del elemento de transporte axial; j) esquema de una realización del agitador tal como se describe en el presente documento visto desde arriba a lo largo del eje del árbol que muestra la conexión de palas de mezclador opuestas del elemento de transporte radial mediante palas de mezclador de conexión del elemento de transporte axial en el que el diámetro del elemento de transporte axial es menor que el diámetro interno del elemento de transporte radial y la distancia espacial es franqueada por un conector.
10		
15	Figura 2	Diagrama esquemático de un dispositivo para cultivo por diálisis.
	Figura 3	Diagrama esquemático de los gradientes de concentración en las fibras huecas del módulo de diálisis.
	Figura 4	Evolución temporal de concentración típica en el reactor (C_R) y el recipiente de almacenamiento (C_V).
20	Figura 5	Comparación de los coeficientes de mezclado C_H para diferentes mezcladores en función del número de Reynolds (Re); KR = mezclador de combinación tal como se describe en el presente documento; SSR = mezclador de disco convencional; SBR = mezclador de palas inclinadas.
25	Figura 6	Diámetro de escama de referencia d_{VF} en función de la potencia absorbida específica de volumen y la configuración el mezclador; KR = mezclador de combinación tal como se describe en el presente documento; SSR = mezclador de disco convencional; SBR = mezclador de palas inclinadas; Pohlscheidt, M., et al. = Chem. Ing. Tec. 80 (2008) 821-830.
	Figura 7	Diagrama del coeficiente de potencia Ne de diferentes mezcladores en función del número de Reynolds (Re); KR = mezclador de combinación tal como se describe en el presente documento; SSR = mezclador de disco convencional; SBR = mezclador de palas inclinadas.
30	Figura 8	Coefficiente de transferencia de masa k_a en la diálisis en función de la potencia absorbida específica; KR = mezclador de combinación tal como se describe en el presente documento; SBR = mezclador de palas inclinadas.
35	Ejemplo 1	
	Recipiente de cultivo	
40		Todas las investigaciones se llevaron a cabo en un depósito modelo de Plexiglas® de 100 l (denominado como DN 440 en lo sucesivo).
	Ejemplo 2	
	Potencia absorbida	
45		La potencia absorbida de diferentes agitadores se determinó midiendo el par de torsión sobre el árbol giratorio. Un sistema de procesamiento de datos modelo GMV2 junto con el sensor de par de torsión modelo DRFL-II-5-A (ambos de la compañía "ETH Messtechnik", Gschwend, Alemania) se usaron para registrar el par de torsión. Para cada sistema mezclador, el par de torque se registró en primer lugar a diversas velocidades de revolución en el estado no lleno ($M_{vacío}$) y posteriormente por medio de una determinación por triplicado en el estado lleno (M_{carga}) de acuerdo
50		con la ecuación 9:
		$M = M_{carga} - M_{vacío} \quad \text{(Ecuación 9)}$
55		Seguidamente, el número de Newton (número Ne) y el número de Reynolds (número Re) correspondientes se calcularon para cada punto. Dado que los números de Newton para un sistema mezclador 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,). Esta media representa el número de Newton total del mezclador respectivo.
60	Ejemplo 3	
	Homogeneización	
65		La homogeneización se determinó usando el método del cambio de color, así como usando el método de conductividad.

El método del cambio de color se basa en la decoloración de una solución de almidón teñida con yodo-yoduro potásico mediante adición de tiosulfato sódico (I, KI, almidón, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ obtenidos de la compañía Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Alemania). Se usaron una solución uno molar tiosulfato sódico y una solución uno molar de yodo-yoduro potásico (solución de Lugol) así como una solución de almidón a una concentración de 10 g/l como las soluciones de partida. En correspondencia con los experimentos de conductividad, se examinaron al menos cuatro tramos escalonados de velocidad por mezclador (determinaciones por cuadruplicado por tramo escalonado de velocidad) en las que se llevaron a cabo un máximo de cuatro experimentos por cantidad de llenado del depósito. En cada caso, la solución de almidón se añadió una vez por llenado del depósito. Para cada medición individual, el volumen correspondiente de la solución de yodo-yoduro potásico se añadió en primer lugar y posteriormente se añadió el tiosulfato sódico. El tiempo de mezclado ha sido determinado de forma manual a partir del punto temporal en el que se añadió el tiosulfato sódico y se restó un segundo en cada caso para tener en consideración el tiempo de adición. Una vez completada la medición, el volumen de llenado del depósito se valoró (neutralizó) con yodo-yoduro potásico para compensar el exceso del tiosulfato sódico añadido previamente.

En el método de conductividad, el tiempo de mezclado se define como el tiempo desde la adición de una solución de electrolito hasta el momento en el que las fluctuaciones de conductividad medidas para el último momento superan 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 mezclado más prolongado detectado en cada caso se considera representativo de todo el sistema.

Se usó una solución de NaCl al 30% (p/v) (NaCl cristalino, compañía Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) como solución de electrolito para determinar el tiempo de mezclado mediante el método de conductividad. Ésta puede añadirse en pulsos sobre la superficie del líquido en el árbol giratorio del mezclador y el volumen por adición se seleccionó de modo que los saltos de conductividad que daban como resultado un estado estacionario no superaban los 200 mS/cm.

Para cada mezclador, se examinaron al menos cuatro tramos de velocidad escalonados. El tiempo de mezclado se determinó al menos ocho veces por tramo escalonado de velocidad y estos ocho valores se promediaron. El coeficiente de mezclado de los sistemas mezcladores respectivos se da como la media de los coeficientes de mezclado promediados por tramo escalonado de velocidad. La conductividad se midió en cada caso mediante tres sondas de conductividad tetrapolar (TetraCon, compañía WTW, Weilheim) en diversas posiciones radiales o axiales en el depósito. Las señales de conductividad se leyeron en línea mediante el amplificador de medición que se usó (Cond813, Knick compañía "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 (Knick compañía "Elektronische Messgeräte GmbH & Co, KG", Berlín, Alemania) a una tasa de muestreo de 5 segundos. Después de que se completó la serie de mediciones, los datos se evaluaron por separado para cada sonda.

Ejemplo 4

Tensión de cizallamiento

Un sistema de partículas modelo, el sistema de escamas de polímero de arcilla azul, se usó para determinar la tensión de cizallamiento. Éste es un sistema de partículas modelo que consta de un polímero catiónico (Praestol BC 650) y un mineral de arcilla (arcilla azul) que se coloca en el recipiente. Una reacción de floculación se inicia añadiendo Praestol BC 650 que genera escamas de un tamaño definido. Estas escamas posteriormente se deshacen mediante la tensión mecánica e hidrodinámica del sistema mezclador. En el caso de sistemas gaseados con burbujas se deshacen adicionalmente por la disipación de energía cuando las burbujas se forman y estallan. 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 del tamaño de partícula se midió in situ mediante una sonda *Focused Beam Reflectance Measurement Probe* (sonda de medición de reflectancia con haz enfocado) de la compañía Mettler Toledo (denominada como FBRM® en lo sucesivo). Las tasas de cambio del tamaño de partícula que se determinaron son una medida para la tensión de cizallamiento que prevalece en el sistema modelo. El gradiente de la tasa de cambio del tamaño de partícula se vuelve más pequeño en el transcurso del experimento pero no se forma un estado de equilibrio (desmenuzamiento de partículas hasta un diámetro de las partículas primarias de la arcilla azul de $\approx 15 \mu\text{m}$). Por esta razón, un diámetro de escama final d_{P50}' para el sistema de escamas de polímero de arcilla azul se determinó de acuerdo con el siguiente criterio (ecuación 10):

$$\frac{d(d_{P50})}{dt} \leq 0,0055 [\mu\text{m} / \text{s}] \rightarrow d_{P50} = d_{P50}' \quad (\text{Ecuación 10}).$$

Para garantizar la comparabilidad de los diámetros de escama finales a diferentes potencias absorbidas y entre diferentes mezcladores, el diámetro de escama de referencia se calculó de la siguiente manera (ecuaciones 11 a 13):

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

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

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

5 Tabla 2: Sustancias usadas para determinar la tensión de partículas (las concentraciones se basan en el volumen de llenado del depósito).

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

El primer lugar, el depósito 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 mediante valoración cuantitativa con una solución de CaCl₂. La conductividad se midió mediante una sonda de conductividad tetrapolar (sonda: TetraCon, WTW Co. Weilheim; amplificador de medición: Cond813, Knick compañía "Elektronische Messgeräte GmbH & Co, KG", Berlín, Alemania). Seguidamente, se añadieron la arcilla azul y el NaCl en cantidades apropiadas a la solución. Posteriormente, tuvo lugar una fase de homogeneización a la velocidad más elevada con una duración de al menos 20 minutos. La sonda FBRM® (FBRM® Lasentec® D600L, Mettler-Toledo GmbH Co., Giessen, Alemania) se montó en el depósito perpendicular desde arriba (profundidad de inmersión 300 mm) a una distancia radial de 70 mm hasta la pared. La reacción de floculación se 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 escama de referencia se determinó a partir de los datos de medición. Al menos tres potencias absorbidas se midieron para cada mezclador. En cada caso, se llevaron a cabo tres mediciones por potencia absorbida.

Ejemplo 5

25 Diálisis (transferencia de masa líquido - líquido)

Una solución de NaCl (NaCl cristalino, compañía Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) se usó como sustancia indicadora para determinar la semivida de concentración del módulo (DIADYN-DP 070 F1 OL; compañía MICRODYN-NADIR GmbH, Wiesbaden, Alemania) en relación con el sistema mezclador que se usó y la potencia absorbida específica de volumen. La sustancia indicadora se ajustó en el depósito de almacenamiento al comienzo de cada ronda experimental a una conductividad inicial de 1500 µS/cm. El reactor se llenó con agua completamente desmineralizada para cada ronda experimental. El volumen de llenado del reactor era 100 l (H/D = 1,6) y el del depósito de almacenamiento era 400 l (H/D = 2,0) y ambos depósitos se mantuvieron a una temperatura de 20°C al comienzo de cada experimento. La conductividad en ambos depósitos se midió mediante una sonda de conductividad tetrapolar (sonda: TetraCon, WTW Co. Weilheim, Alemania; amplificador de medición: Cond813, Knick compañía "Elektronische Messgeräte GmbH & Co, KG", Berlín, Alemania). La tasa de muestreo de los amplificadores de medición que se usaron era de 5 segundos y los valores de medición se almacenaron en línea y simultáneamente para todas las sondas por medio del software Paraly SW 109 (Knick compañía "Elektronische Messgeräte GmbH & Co, KG", Berlín, Alemania). La solución de NaCl se hizo circular por medio de una bomba peristáltica entre el depósito de suministro y el módulo de diálisis (bomba con carcasa 520 U, compañía Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen, Alemania) a un caudal 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 depósito de almacenamiento. Los datos de estas dos sondas se evaluaron mediante una rutina de evaluación. En cada caso se investigaron al menos seis potencias absorbidas diferentes en el reactor por mezclador.

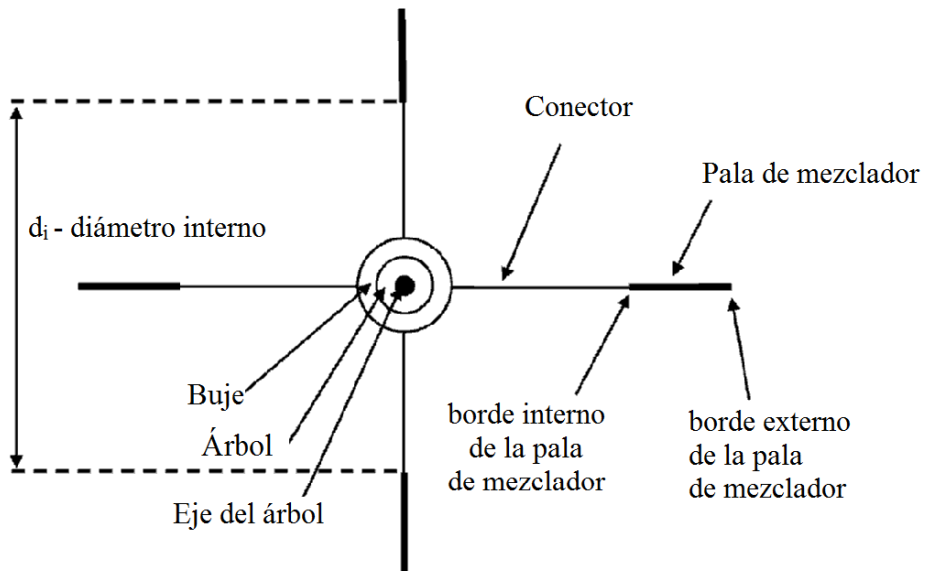
- 5 Para comparar las características de transferencia de masa determinadas por medio de la solución de NaCl, se llevaron a cabo mediciones adicionales con una solución de glucosa como sustancia indicadora. La configuración experimental no se cambió para esto. Una concentración de glucosa definida (glucosa sólida, compañía Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a una concentración de 3 g/l se proporcionó en el depósito de almacenamiento. La concentración de glucosa se determinó de forma manual y simultáneamente para el depósito de almacenamiento y el reactor a un intervalo de tiempo de 10 minutos por medio de un instrumento de medición de la glucemia (ACCU-CHEK® Aviva, compañía Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo que comprende un agitador y un módulo de diálisis dentro de un recipiente de cultivo, caracterizado por que el agitador comprende
 - un elemento de transporte radial que comprende al menos dos palas de mezclador, y
 - uno o más elementos de transporte axial que comprenden, cada uno, al menos dos palas de mezclador, en el que las palas de mezclador del elemento de transporte radial son paralelas entre sí, en el que el diámetro externo de todos los elementos de transporte axial es igual a o menor que el diámetro interno del elemento de transporte radial,
 - en el que todos los elementos de transporte axial están conectados individualmente al elemento de transporte radial,
 - en el que todos los elementos de transporte axial están ubicados dentro del elemento de transporte radial, y
 - en el que todos los elementos de transporte tienen una orientación espacial fija unos con respecto a otros.
2. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el número de elementos de transporte axial es 1 o 2 o 3.
3. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que palas de mezclador opuestas del elemento de transporte radial están unidas entre sí por dos palas de mezclador opuestas de un elemento de transporte axial.
4. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el elemento de transporte radial es un impulsor de tipo ancla.
5. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el elemento de transporte axial es un mezclador de palas inclinadas.
6. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que el paso de las palas de mezclador del mezclador de palas inclinadas está entre 10° y 80° con respecto al eje del árbol del agitador.
7. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el elemento de transporte radial tiene una altura de al menos 200 mm.
8. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la relación d/D de diámetro del agitador (d) con respecto al diámetro del recipiente de cultivo (D) es de 0,2 a 0,8
9. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la relación H/D de altura de llenado del recipiente de cultivo (H) con respecto a anchura del recipiente de cultivo (D) es de 1,0 a 2,5.
10. Uso de un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para cultivar una célula que expresa un polipéptido.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado por que la célula es una célula de mamífero.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por que la célula de mamífero se selecciona entre 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.
13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado por que el polipéptido es un anticuerpo.
14. Método para la producción de un polipéptido que comprende
 - a) proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido,
 - b) proporcionar un dispositivo tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
 - c) cultivar la células en el dispositivo en un medio de cultivo en el que el agitador proporciona un flujo turbulento dentro del recipiente de cultivo, y
 - d) recuperar el polipéptido de las células o el medio de cultivo y producir, de este modo, un polipéptido.
15. Método de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado por que la célula es una célula de mamífero.
16. Método de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado por que la célula de mamífero se selecciona entre 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.
17. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, caracterizado por que el polipéptido es un anticuerpo.

Figura 1

g)



h)

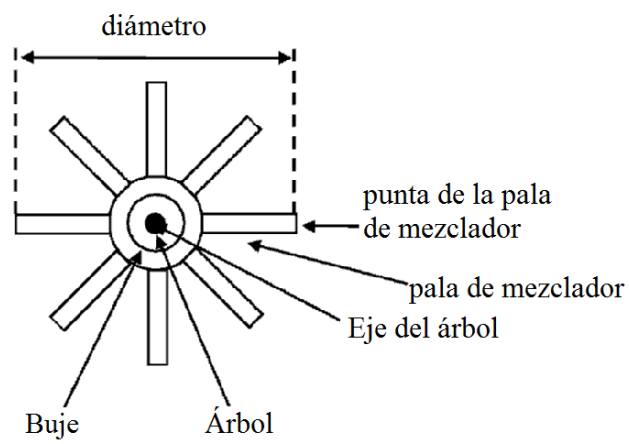
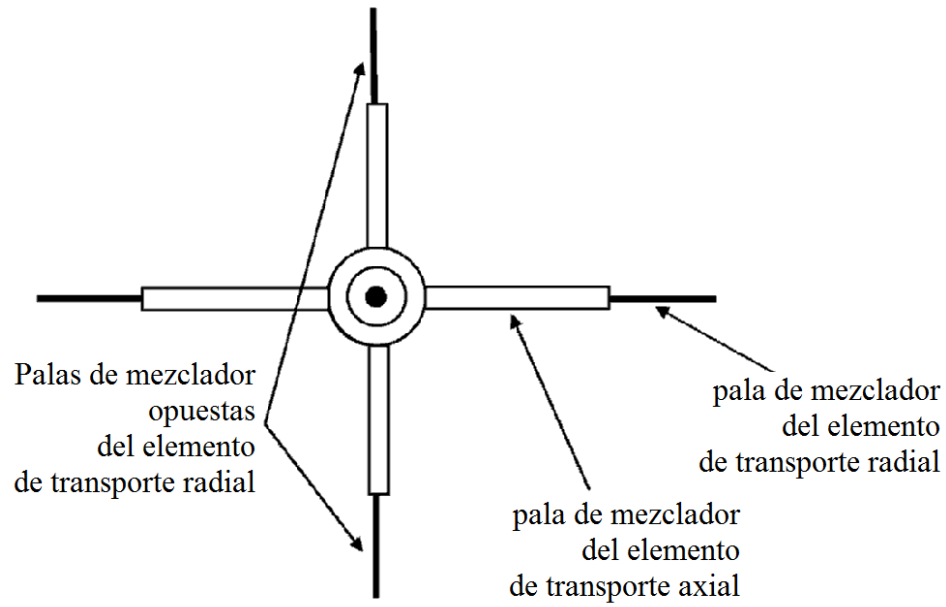


Figura 1

i)



j)

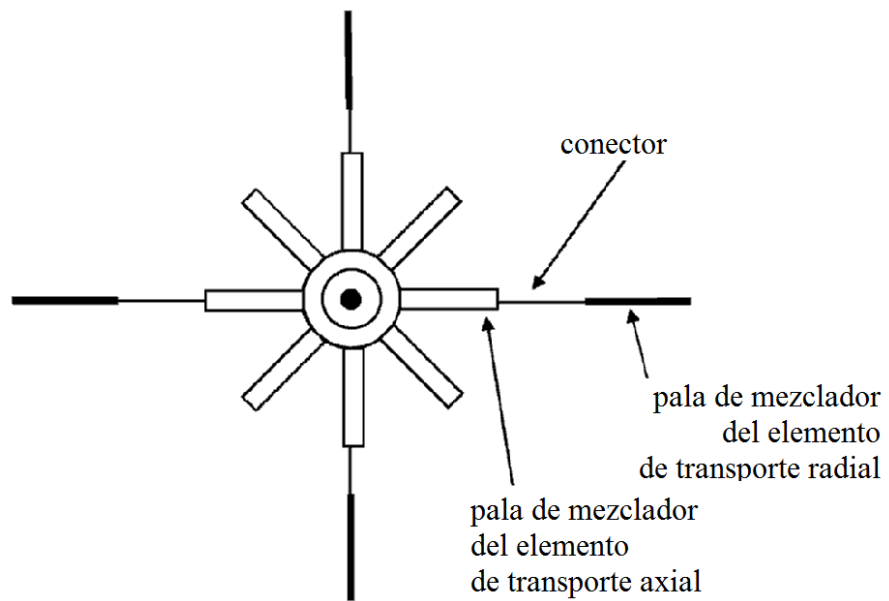


Figura 2

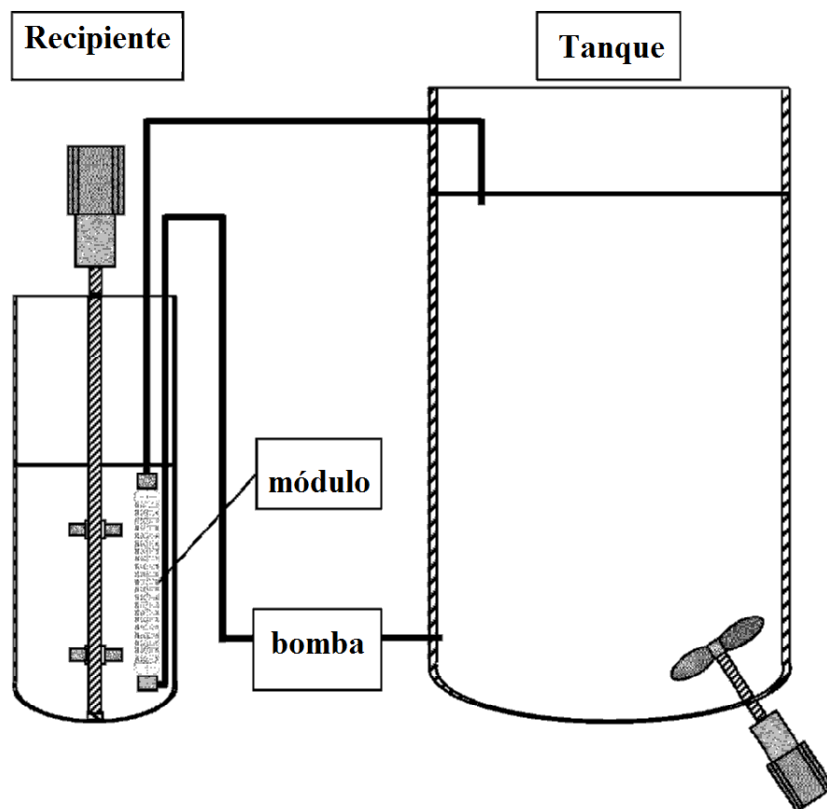


Figura 3

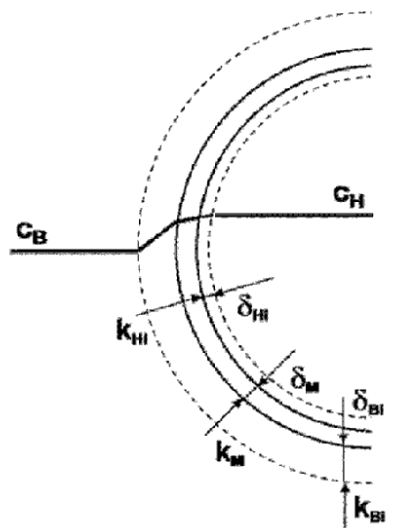


Figura 4

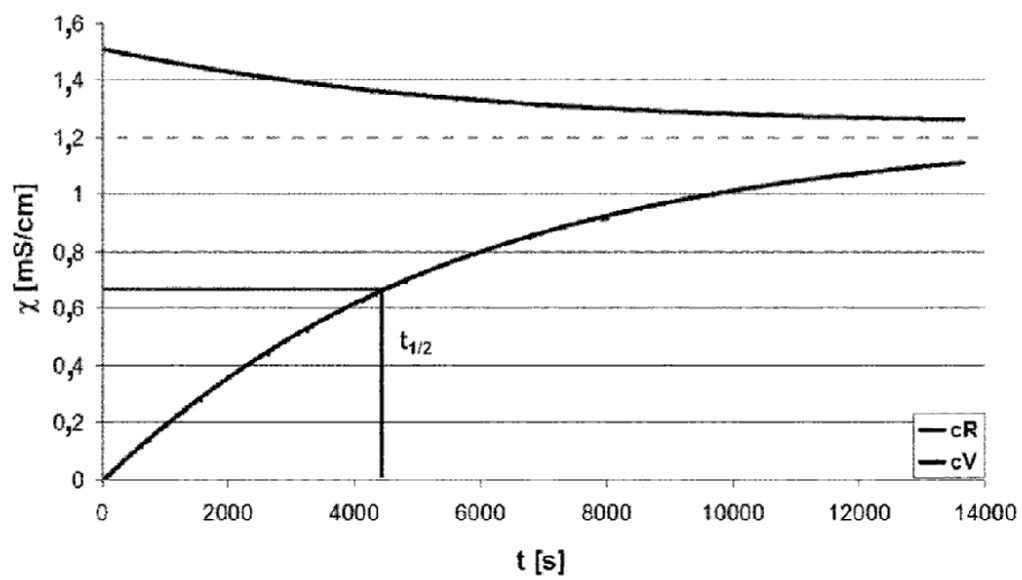


Figura 5

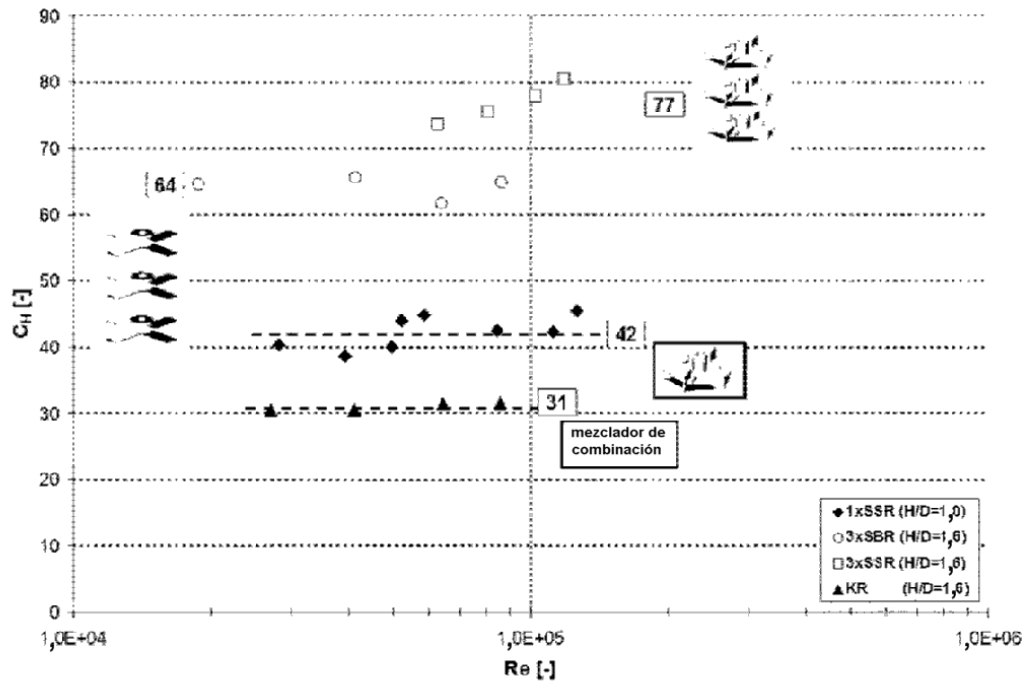


Figura 6

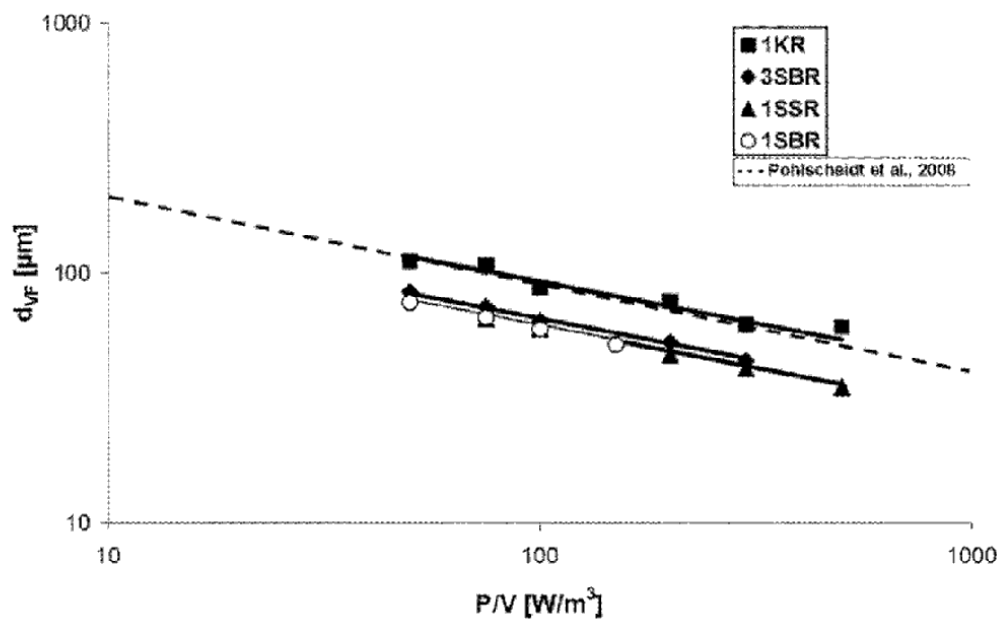


Figura 7

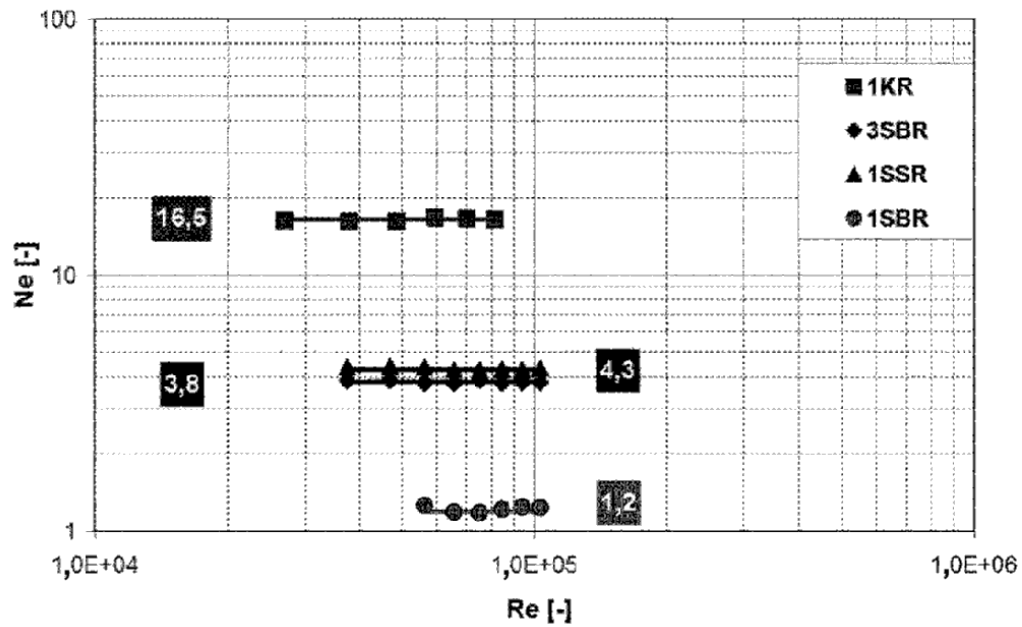


Figura 8

