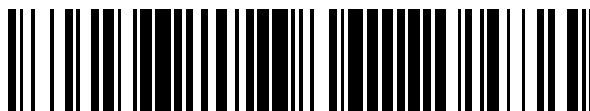


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 667**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/00** (2006.01)

**C12M 1/04** (2006.01)

**C12M 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2008 PCT/IL2008/000614**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2008 WO08135991**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2008 E 08738315 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2150608**

54 Título: **Biorreactor desechable a gran escala**

30 Prioridad:

**07.05.2007 US 924273 P**

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

**23.03.2018**

73 Titular/es:

**PROTALIX LTD. (100.0%)  
2 SNUNIT STREET SCIENCE PARK  
20100 CARMIEL, IL**

72 Inventor/es:

**SHAALTIEL, YOSEPH;  
KIRSHNER, YAIR;  
SHTAINIZ, ALON;  
NAOS, YARON y  
SHNEOR, YFTACH**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 660 667 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**

Biorreactor desechable a gran escala

**Campo de la invención**

5 La invención es de un biorreactor desechable a gran escala para cultivos de células/tejidos y, en particular, de un biorreactor a gran escala para el cultivo de células vegetales.

**Antecedentes de la invención**

Los cultivos de células y tejidos son rutinariamente utilizados para la producción a escala comercial de diversos compuestos que incluyen, por ejemplo, hormonas, enzimas, proteínas, antígenos, aditivos alimenticios y plaguicidas naturales.

10 La tecnología actualmente utilizada para la producción de cultivos de células y/o tejidos a escala industrial está basada en sistemas de biorreactores de vidrio o acero inoxidable reutilizables que son costosos de ajustar y mantener. Estos sistemas de biorreactores requieren limpieza y desinfección entre tandas, y una limpieza más intensa entre cambios de cargas de productos debido a la necesidad de una validación costosa y que requiere tiempo en cuanto a la limpieza y la presencia de residuos de agentes de limpieza a continuación de la limpieza.

15 Además, estos tipos de biorreactores industriales emplean tecnologías de mezcla complicadas y costosas como propulsores accionados a través de cierres herméticos costosos y complicados; algunos biorreactores costosos comprenden una construcción de múltiples partes con elevadores, diseñada para proporcionar una mezcla y saturación gaseosa del medio a través del burbujeo de gas en el biorreactor. Sin embargo, la presión del gas, el tamaño de las burbujas y la creación de fuerzas de cizallamiento no deseables en el medio necesita la puesta en  
20 práctica de tecnologías de aireación complicadas. Además, estos biorreactores están diseñados según la capacidad de volumen pico que es requerida en el momento. Por tanto, surgen problemas cuando se llevan a escala a partir de un biorreactor de planta piloto hasta un biorreactor a gran escala, o cuando surge la necesidad de aumentar la producción más allá de la capacidad de los biorreactores existentes. La alternativa actual para hacer funcionar un biorreactor de gran capacidad es combinar un cierto número de biorreactores de vidrio o acero inoxidable modulares más pequeños cuya capacidad de volumen total coincide con los requisitos, mientras que ofrecen un grado de  
25 flexibilidad para aumentar o reducir la capacidad global. Sin embargo, el uso de varios biorreactores más pequeños aumenta el costo y el tiempo de mantenimiento y, por tanto, el uso de varios biorreactores pequeños es más costosos y requiere más trabajo que el uso de un único biorreactor más grande.

30 Debido a estas limitaciones, el cultivo de células vegetales en el interior de biorreactores da lugar a productos extraíbles relativamente costosos, que incluyen tanto metabolitos secundarios como proteínas recombinantes, que no pueden competir comercialmente con productos comparables producidos mediante sistemas de producción alternativos.

35 Actualmente, el producto farmacéutico de proteínas recombinantes basado solo en cultivo producido en biorreactores de células vegetales es una vacuna antiviral no comercial para uso veterinario en el tratamiento del virus de Newcastle. Sin embargo, aparte de esta vacuna, actualmente hay solo unos pocos productos de metabolitos secundarios producidos mediante cultivo de células en biorreactores, como los metabolitos de vegetales paclitaxel (Taxol) y Shikonin.

40 A escala comercial, los sistemas de biorreactores emplean clásicamente cámaras de crecimiento permanentes o semipermanentes. Aunque las cámaras de crecimiento desechables son bien conocidas en la técnica, estas cámaras de crecimiento normalmente son utilizadas para volúmenes de producción a escala pequeña, como en fermentaciones domésticas y para el trabajo en laboratorios experimentales. Los biorreactores de escala pequeña emplean normalmente una bolsa desechable que puede ser utilizada en ajustes de laboratorio.

45 Han sido propuestos también biorreactores desechables adecuados para ser usados con volúmenes mayores. Los requisitos de agitación y aireación del medio de cultivo, que resultan más críticos con el ajuste a escala del volumen del reactor, son abordados en un cierto número de formas en los sistemas de la técnica anterior. Las entidades Applikon Biotechnology (Holanda) y Stedim Inc (Francia) ofrecen el sistema de biorreactor de uso único Appliflex® que usa bolsas de cultivo flexibles de 50 litros, que están diseñadas para ser colocadas en una plataforma motorizada que balancea la bolsa para proporcionar aireación y agitación al medio de cultivo. Un dispositivo de biorreactor desechable similar es ofrecido por la entidad Wave Biotech, LLD (Somerset, NJ), que proporciona bolsas de cultivo para volúmenes de hasta 1.000 l, que son aireadas y agitadas por medio de una plataforma motorizada.  
50 La entidad Hyclone Inc. (Logan, UT), conjuntamente con Baxter Biosciences, ofrece una bolsa de cultivo desechable (biorreactor de uso único "SUB"), diseñada para el cultivo de células de animales de hasta 250 l, que está diseñada para recipientes de biorreactores de acero inoxidable de readaptación. La aireación y la agitación son proporcionadas mediante un accionamiento de propulsor no desechable, que está asociado a una unidad propulsora complicada integrada en la bolsa de cultivo. La solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0272146 de Hodge *et al.*  
55 describe un biorreactor desechable de 150 litros que tiene paletas propulsoras u otros medios mecánicos para mezclar. Todavía, otro tipo de biorreactor desechable tiene una bolsa en forma de U y requiere un aparato de tipo

grúa para agitar y airear el medio de cultivo a través de la elevación recíproca de los lados. Todavía, otra solución está basada en una envoltura presurizada que rodea la bolsa de cultivo flexible, que está hecha para inflarse y desinflarse a intervalos regulares, proporcionando un tipo de movimiento de mezcla por contracción.

5 En todos los sistemas anteriormente mencionados, los sistemas de soporte y aireación/agitación son complicados, costosos, especializados y de capacidad limitada. Por tanto, aunque el propio recipiente del reactor puede ser desechable y estar destinado a un uso único, el uso de estos sistemas requiere una instrumentación y mantenimiento costosos.

10 Se han descrito también dispositivos de biorreactores desechables que usan aire para la agitación y aireación del medio de cultivo, sin embargo, la adaptación de la aireación basada en burbujas de aire y la mezcla para volúmenes grandes es problemática. Muchos biorreactores de volumen más pequeño proporcionan una aireación suficiente con una única entrada de gas y un rociador, u otro tipo de difusor de las burbujas de gas [véase, por ejemplo, el biorreactor Zeta ofrecido por la entidad Osmotec, Israel, (Agritech Israel, artículo nº 1, otoño de 1997, página 19)]. Una desventaja de estos sistemas es que la aireación realizada mediante la introducción de burbujas de aire muy pequeñas (desde el difusor) da lugar al deterioro de las células, particularmente en el caso de cultivos de células  
15 vegetales que son particularmente sensibles a las fuerzas de cizallamiento.

20 Las proteínas para un uso farmacéutico han sido producidas clásicamente en sistemas de mamíferos o de expresión bacteriana. Sin embargo, debido a la simplicidad relativa de la introducción de genes en vegetales y células vegetales para la producción en masa de proteínas y péptidos, usando, por ejemplo, sistemas de biología molecular como el método de *Agrobacterium*, la tecnología de células vegetales se está haciendo crecientemente conocida como un sistema de expresión de proteínas alternativo (Ma, J. K. C, Drake, P.M. W., y Christou, P. (2003) Nature reviews 4, 794-805).

25 El cultivo de células vegetales difiere del cultivo bacteriano o de células de mamíferos no solamente en términos de requisitos metabólicos, sino también como una función de la fragilidad extrema de las células vegetales de tamaño generalmente grande respecto a las fuerzas de cizallamiento que se encuentran en un biorreactor industrial convencional. Por tanto, por una parte, es importante proporcionar una mezcla adecuada en los cultivos de células vegetales para asegurar una aireación suficiente de todos los aspectos del cultivo de células vegetales pero, por otra parte, esto se debe hacer de una manera adecuada para las células vegetales frágiles que crecen en el cultivo.

30 Por tanto, hay una necesidad constante de mejorar los sistemas y dispositivos existentes para el cultivo de células/tejidos desechables, con el fin de proporcionar un mayor rendimiento y calidad del producto, así como una eficacia mejorada de los costes. La presente invención proporciona un biorreactor desechable pero reutilizable de volumen elevado, eficaz para ser usado con una diversidad de cultivos de células/célula para la producción de proteína recombinante, en el que han sido abordados los problemas inherentes al ajuste a escala del volumen de reactor desechable.

### Sumario de la invención

35 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo desechable para cultivar y recolectar tejidos y/o células vegetales que comprende un recipiente no rígido que tiene un volumen de al menos 400 litros y que está configurado con orificios de intercambio de gases y un orificio de recolección que hace posible que dicho dispositivo se use continuamente durante al menos dos ciclos consecutivos de cultivo/recolección, en que los orificios de intercambio de gases incluyen una pluralidad de orificios de entrada de gases colocados en una  
40 superficie de recipiente en la parte inferior de la mitad de una altura del recipiente configurada para mezclar y airear el medio en el recipiente, en que el dispositivo no tiene una agitación mecánica para mezclar el medio en el recipiente ni un rociador para distribuir gas cuando está presente el medio y en que el dispositivo está diseñado y construido para mantener una saturación de oxígeno y fuerzas de cizallamiento adecuadas para cultivar dichos tejidos y/o células.

45 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para cultivar un tejido vegetal y/o células vegetales en un volumen de más de 400 litros, comprendiendo el método: (a) proporcionar un recipiente no rígido desechable que tiene un volumen de al menos 400 litros y que está configurado con orificios de intercambio de gases y un orificio de recolección que hace posible que dicho dispositivo se use continuamente durante al menos dos ciclos consecutivos de cultivo/recolección, en que los orificios de intercambio de gases incluyen una pluralidad  
50 de orificios de entrada de gases colocados en una superficie de recipiente en la parte inferior de una mitad de la altura del recipiente configurada para mezclar y airear el medio en el recipiente, en que el dispositivo no tiene una agitación mecánica para mezclar el medio en el recipiente ni un rociador para distribuir gas cuando el medio está presente en el mismo y en que el dispositivo está diseñado y construido para mantener una saturación de oxígeno y fuerzas de cizallamiento adecuadas para cultivar dicho tejido y/o células vegetales; y (b) proporcionar un inoculante a través de dicho orificio de recolección; (c) proporcionar medio de cultivo esterilizado y/o aditivos esterilizados; (d) opcionalmente, iluminar dicho recipiente con luz externa y (e) permitir que dichas células y/ tejido crezcan en dicho medio hasta un rendimiento deseado.  
55

Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, dicha saturación de

oxígeno y dichas fuerzas de cizallamiento adecuadas para cultivar dicho tejido y/o células vegetales se mantienen mediante una combinación de valores o intervalos de valores de los siguientes parámetros:

- (a) una relación de altura a volumen;
- (b) una presión del gas de entrada;
- 5 (c) una densidad de las entradas de gases por área seccional transversal;
- (d) una velocidad de aireación en la entrada;
- (e) un volumen de burbujas gaseosas en la entrada.

10 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de cultivo de células vegetales que comprende el dispositivo desechable de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para cultivar y recolectar tejido y/o células vegetales y cultivar un medio adecuado para el cultivo de dicho tejido y/o células vegetales y una suspensión de células vegetales o cultivo de tejido que crece en dicho medio.

Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, el cultivo de células vegetales comprende células vegetales obtenidas a partir de una raíz de vegetal.

15 Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, las células vegetales se seleccionan entre el grupo que consiste en célula de raíz transformada de *Agrobacterium Rhizogenes*, célula de apio, célula de jengibre, célula de rábano picante y célula de zanahoria.

Según otras características en algunas realizaciones de la presente invención, las células vegetales son células de tabaco, más preferentemente células de *Nicotiana Tabaccum*.

20 Según otras características en algunas realizaciones de la presente invención, las células de tabaco expresan acetilcolinesterasa recombinante humana. La acetilcolinesterasa recombinante humana puede ser acetilcolinesterasa-R. La acetilcolinesterasa-R puede tener una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID N° 9.

Según otras características en algunas realizaciones de la presente invención, las células de tabaco comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido como se expone en la SEQ ID N° 9.

25 Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, los valores o intervalo de valores de parámetros se seleccionan a partir de al menos uno de los siguientes valores o intervalos de valores:

- a) una relación de altura a volumen de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 1 centímetro por litro;
- b) una presión del gas de entrada de aproximadamente 1 bar a 5 bares;

30 c) una densidad de entradas de gases por área seccional transversal de aproximadamente 20 entradas por metro cuadrado a aproximadamente 70 entradas por metro cuadrado;

d) una velocidad de aireación de aproximadamente 0,05 a 0,12 volúmenes de gas por medio volumétrico por minuto; y

35 e) un volumen de burbujas de gas en la entrada de aproximadamente 20 milímetros cúbicos a aproximadamente 1800 milímetros cúbicos.

Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la saturación de oxígeno es de al menos 15% en volumen por volumen en un líquido contenido en dicho recipiente.

40 Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la combinación es de una relación de altura a volumen de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 1 centímetro por litro y una presión del gas de entrada de aproximadamente 1 bar a 5 bares.

Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la combinación es de una relación de altura a volumen de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 1 centímetros por litro y una densidad de entradas de gases por área seccional transversal de aproximadamente 20 entradas por metro cuadrado a aproximadamente 70 entradas por metro cuadrado.

45 Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la combinación es de una relación de altura a volumen de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 1 centímetro por litro y una velocidad de aireación en la entrada de aproximadamente 0,05 a 0,12 volúmenes de gas por medio volumétrico por minuto.

- Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la combinación es de una relación de altura a volumen de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 1 centímetro por litro y un volumen de burbujas gaseosas en la entrada de aproximadamente 20 milímetros cúbicos a aproximadamente 1.800 milímetros cúbicos.
- 5 Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la combinación comprende adicionalmente el parámetro de un volumen de burbujas gaseosas en la entrada de aproximadamente 20 milímetros cúbicos a aproximadamente 1.800 milímetros cúbicos.
- Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la combinación comprende adicionalmente el parámetro de una presión del gas de entrada de aproximadamente 1 bar a 5 bar.
- 10 Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la combinación comprende adicionalmente el parámetro de una densidad de entradas de gases por área seccional transversal de aproximadamente 20 entradas por metro cuadrado a aproximadamente 70 entradas por metro cuadrado.
- Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la combinación comprende adicionalmente el parámetro de una velocidad de aireación en la entrada de aproximadamente 0,05 a 0,12 volúmenes de gas por medio volumétrico por minuto.
- 15 Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la combinación comprende una relación de altura a volumen de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 1 centímetro por litro, una presión de gas de entrada de aproximadamente 1 bar a 5 bar, una densidad de entradas gaseosas por área seccional transversal de aproximadamente 20 entradas por metro cuadrado a aproximadamente 70 entradas por metro cuadrado y un volumen de burbujas gaseosas en la entrada de aproximadamente 20 milímetros cúbicos a aproximadamente 1.800 milímetros cúbicos.
- 20 Según todavía otras características en realizaciones preferidas en la invención descrita a continuación la combinación es de una relación de altura a volumen de aproximadamente 0,06 a aproximadamente 1 centímetro por litro, una presión de gas de entrada de aproximadamente 1 bar a 5 bar, una densidad de entradas gaseosas por área seccional transversal de aproximadamente 20 entradas por metro cuadrado a aproximadamente 70 entradas por metro cuadrado, una velocidad de aireación en la entrada de aproximadamente 0,05 a 0,12 volúmenes de gas por medio volumétrico por minuto; y un volumen de burbujas gaseosas en la entrada de aproximadamente 20 milímetros cúbicos a aproximadamente 1.800 milímetros cúbicos.
- 25 Según otras características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la relación de altura a volumen es de aproximadamente 0,1 cm por litro a aproximadamente 0,5 cm por litro.
- 30 Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la relación de altura a volumen es de aproximadamente es de aproximadamente 0,44 cm por litro.
- Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la presión de gas de entrada es de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4 bar.
- 35 Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la presión de gas de entrada es de aproximadamente 1,5 bar a aproximadamente 2,5 bar.
- Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la densidad de entradas gaseosas por área de sección transversal es de aproximadamente 40 por metro cuadrado a aproximadamente 60 por metro cuadrado.
- 40 Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la densidad de entradas de gases por área de sección transversal es de 55 por metro cuadrado.
- Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la velocidad de burbujas gaseosas es de aproximadamente 20 litros por minuto a aproximadamente 50 litros por minuto, más preferentemente 30 litros por minuto.
- 45 Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, el volumen de burbujas gaseosas en la entrada es de aproximadamente 300 milímetros cúbicos.
- Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, el recipiente desechable es transparente y/o translúcido.
- 50 Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, el recipiente está hecho de un material seleccionado entre el grupo que comprende polietileno, policarbonato, un copolímero de polietileno y nylon, PVC y EVA.

Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, el recipiente está hecho de un producto estratificado de más de una capa de dichos materiales.

Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, el dispositivo comprende adicionalmente una estructura de soporte para soportar dicho dispositivo.

- 5 Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, la estructura de soporte comprende un marco cilíndrico rígido que tiene una base cónica.

Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, el orificio de recolección está colocado en la parte inferior de dicho extremo inferior del recipiente.

- 10 Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, dicho orificio de recolección está colocado cerca de la parte inferior del extremo inferior de dicho recipiente, de forma que al final de cada ciclo de recolección dicho resto de dicho medio que contiene células y/o tejido permanece automáticamente en dicho extremo inferior de dicho recipiente hasta un nivel por debajo del nivel de dicho recolector.

Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, dicha parte inferior es sustancialmente cónica.

- 15 Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, dicha parte inferior es sustancialmente frusta-cónica.

Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, dicho recipiente comprende un volumen rellenable interno entre aproximadamente 400 litros y aproximadamente 30.000 litros, preferentemente entre aproximadamente 500 litros y 8.000 litros y, preferentemente, aproximadamente 1.000 litros.

- 20 Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, el método comprende adicionalmente verificar los contaminantes y/o la calidad de las células/tejidos que son producidos en dicho recipiente: si se encuentran contaminantes o las células/tejidos que se producen son de escasa calidad, el dispositivo y su contenido son desechados; si no se encuentran contaminantes, se recolecta una parte de dicho medio que contiene células y/o tejido.

- 25 Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, mientras se recolecta dicha parte, se deja un resto de medio que contiene células y/o tejido en dicho recipiente, en que dicho resto de medio sirve como inoculante para un siguiente ciclo de cultivo/recolección.

- 30 Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, el método comprende adicionalmente: proporcionar un medio de cultivo esterilizado y/o aditivos esterilizados para el siguiente ciclo de cultivo/recolección; y repetir el ciclo de crecimiento hasta que se encuentra que dichos contaminantes o las células/tejidos que son producidos son de escasa calidad, tras lo cual el dispositivo y su contenido son desechados.

Según todavía otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, se suministra aire esterilizado a través de dichos orificios de intercambio de gases continuamente a través de al menos un ciclo de cultivo/recolección.

- 35 Según otras características en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, el aire esterilizado es suministrado a través de dicha pluralidad de entradas de gases en impulsos durante al menos un ciclo de cultivo/recolección.

Según la invención descrita a continuación el dispositivo no tiene medios mecánicos para mezclar y airear el medio de cultivo.

- 40 La presente invención aborda satisfactoriamente los inconvenientes de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando un biorreactor desechable pero reutilizable de volumen elevado, eficaz para ser usado con una diversidad de células/cultivos celulares para la producción de una proteína recombinante y métodos y sistemas para su uso.

#### **Breve descripción de los dibujos**

- 45 La invención se describe en la presente memoria descriptiva, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos que se acompañan. Haciendo referencia específicamente ahora a los dibujos en detalle, se resalta que las características particulares mostradas lo son a modo de ejemplo y para fines de una exposición ilustrativa de realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y se presentan con el fin de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprendida de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se hace intento de mostrar detalles estructurales de la invención más en detalle que lo que es necesario para una comprensión fundamental de la invención, haciendo evidente la descripción tomada conjuntamente con los dibujos para los expertos en la técnica el modo en que se pueden realizar diversas formas de la invención en la práctica.
- 50

En los dibujos:

La fig. 1 ilustra los componentes principales de un ejemplo de realización del dispositivo de la presente invención en una vista lateral de sección transversal;

5 La fig. 2 ilustra los componentes principales de un ejemplo de realización del dispositivo de la presente invención y un ejemplo de estructura de soporte en elevación frontal;

10 La fig. 3 es un histograma que muestra la saturación de oxígeno superior conseguida en cultivos de células vegetales usando el biorreactor desechable a gran escala. Se inocularon células de zanahoria en medios de cultivos en biorreactores de diferentes volúmenes: matraces Erlenmeyer (columnas azules); reactores de 10 litros (PX-10, columnas rojas); reactores de 100 litros (PX-100, columnas blancas) y reactores de 400 litros (PX-400, columnas naranjas) y se cultivaron durante 3-4 días bajo condiciones óptimas de cada sistema (véase la sección de materiales y métodos con posterioridad). Cada reactor está equipado con un chip de silicio esterilizado [(número de Cat. SFPST3 YOPSUP (Presens Precision Sensing GmbH)] para determinar la saturación de O<sub>2</sub> en los días indicados [el O<sub>2</sub> es medido usando un dispositivo Fibox 3 (Presens Precision Sensing GmbH)]. Deben apreciarse los niveles superiores de saturación de O<sub>2</sub> en los biorreactores a gran escala (PX-100 y PX-400);

15 La fig. 4 es una fotografía de una transferencia Western que muestra la producción superior de GCD recombinante usando el biorreactor desechable a gran escala. Muestras de 5 µl de extractos en bruto en los extractos de cultivos celulares de 4 a 7 días de biorreactores de diferentes volúmenes, preparadas como se describe con posterioridad (véase la sección de materiales y métodos), se separaron sobre PAGE, se sometieron a transferencia en una membrana de transferencia de nitrocelulosa y se hicieron reaccionar con anticuerpo policlonal anti-GCD de conejo específico. Las bandas fueron visualizadas por medio de un sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico. Columna 1-reactor de 10 litros con rociado; columna 2-reactor de 10 litros con abertura de orificio de 8 mm; columna 3-reactor de 10 litros con oxígeno al 100% añadido desde el día 4; columnas 4 y 5-reactor de 400 litros, día 4; columna 6-reactor de 400 litros, día 7; columnas 7 y 8-reactor de 100 litros, día 7; columnas 9 y 10-patrón de prGCD 25 ng. Debe apreciarse el rendimiento significativamente superior de GCD en el biorreactor desechable a gran escala, en comparación con los reactores de 10 y 100 litros;

20 Las figs. 5a-5b son análisis de RP-HPLC que muestran la eliminación de Antifoam-C usando cromatografía de intercambio iónico. Se introdujo emulsión de Antifoam C al 0,075% (Dow Corning®, Corning, NY) en un medio de intercambio catiónico de 15 ml (Bio Rad, EE.UU.) y muestras de flujo en circulación, lavado y eluato gradiente de sales (NaCl 0,2 M; NaCl 1,2 M y EtOH al 12% en NaCl 1,2 M) verificada a 262 nm para la detección de Antifoam-C. La fig. 5a muestra la detección del Antifoam-C en la solución introducida en la columna. La fig. 5b muestra la detección del Antifoam-C en el flujo en circulación de la columna. Debe apreciarse la ausencia de retención de Antifoam-C en la columna;

30 La fig. 6 es un análisis SDS-PAGE que muestra la identidad de GCD producida en biorreactores desechables a gran escala. Muestras de GCD de reactores de 400 litros (columna 1, 10 µg), reactores de 80 litros (columnas 2 y 3, 10 µg y 20 µg, respectivamente) y coenzima glucocerebrosidasa comercialmente preparada (10 ng y 20 ng) (columnas 4 y 5, 10 µg y 20 µg, respectivamente) se separaron en el análisis SDS-PAGE. Las bandas fueron visualizadas tiñendo con azul de Coomassie. La columna 6 son marcadores del peso molecular. Debe apreciarse la identidad electroforética de la GCD a partir de los biorreactores a gran escala y pequeña escala y la preparación de glucocerebrosidasa comercial;

40 La fig. 7 es una transferencia Western que muestra la identidad de GCD producida en biorreactores desechables a gran escala. Muestras de GCD de reactores de 400 litros (columnas 1 y 2, 50 ng y 100 ng, respectivamente), reactores de 80 litros (columnas 3 y 4, 50 ng y 100 ng, respectivamente) y glucocerebrosidasa Cerezyme® comercialmente preparada (columnas 5 y 6, 50 ng y 100 ng, respectivamente) fueron separadas en el análisis SDS-PAGE, sometidas a transferencia Western en una membrana de transferencia de nitrocelulosa y se hicieron reaccionar con anticuerpo policlonal anti-GCD de conejo específico. Las bandas fueron visualizadas mediante sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico. Debe apreciarse la identidad electroforética e inmunológica de la GCD de biorreactores a gran escala y a pequeña escala y la preparación glucocerebrosidasa comercial (Cerezyme®);

50 Las figs. 8a-8d son gráficos que muestran el mapeo de péptidos (digestotriptico) de glucocerebrosidasa producida en biorreactores desechables a gran escala. Muestras glucocerebrosidasa recolectadas a partir de biorreactores desechables a pequeña escala (80 litros) y biorreactores desechables a gran escala (400 litros) fueron digeridas con proteasa, separadas en una columna RP- HPLC Jupiter 4u Proteo 90A (Phenomenex, 00G-4396-E0) para producir una "huella" de aminoácidos y los fragmentos se verificaron a 214 nm y 280 nm. Las figs. 8a y 8b son los perfiles de glucocerebrosidasa producida en biorreactores de 10 litros (8a, detección a 214 nm; 8b, detección a 280 nm). Las figs. 8c y 8d son los perfiles de glucocerebrosidasa producida en biorreactores de 400 litros (fig. 8c-detección a 214 nm, fig. 8d-detección a 280 nm). Debe apreciarse la identidad del producto para el biorreactor desechable a gran y a pequeña escala;

Las figs. 9a-9b son gráficos que muestran un análisis RP-HPLC de glucocerebrosidasa producida en biorreactores

desechables a gran escala. La glucocerebrosidasa recolectada a partir de biorreactores desechables a gran escala (400 litros) se purificó como se detalla con posterioridad y se analizó en una columna C-4 RP-HPLC y se verificó a 214 nm (fig. 9a) y 280 nm (fig. 9b). Debe apreciarse que el prGCD aparece en forma de un pico único con un tiempo de retención de 64,12 minutos, similar al patrón de prGCD (64,70 minutos);

5 La fig. 10 es una fotografía de un gel IEF que muestra la pureza superior del prGCD producida usando un biorreactor desechable a gran escala. Muestras de prGCD producidas en el biorreactor desechable a gran escala (400 litros) y purificadas en el procedimiento de purificación de 5 columnas descrito con posterioridad se separaron en un gel de isoelectroenfoque junto con prGCD purificado a partir de un biorreactor desechable a pequeña escala (10 litros).  
10 Columna 2- gran escala, 3ª fase de purificación; columna 3-gran escala, 4ª fase de purificación; columna 4-gran escala, 5ª fase de purificación; columna 5-pequeña escala; columnas 1 y 6, patrones de IEF PI. Debe apreciarse la identidad y nivel elevado de pureza del prGCD a partir del biorreactor desechable a gran escala en todas las fases de purificación;

La fig. 11 es una transferencia Western que muestra la pureza de prGCD producida usando un biorreactor desechable a gran escala. Muestras de GCD de reactores de 400 litros (columnas 1 y 2, 50 ng y 100 ng, respectivamente), reactores de 80 litros (columnas 3 y 4, 50 ng y 100 ng, respectivamente), glucocerebrosidasa Cerezyme comercialmente preparada (columnas 5 y 6, 50 ng y 100 ng, respectivamente) y proteínas hospedantes de zanahoria (CHP) (columnas 7 y 8, 50 ng y 100 ng, respectivamente) fueron separadas en SDS-PAGE, sometidas a transferencia Western y se hicieron reaccionar con anticuerpo policlonal anti-CHP específico. Las bandas fueron visualizadas mediante sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico. Debe apreciarse la ausencia de impurezas en el biorreactor desechable a gran escala, como en todas las otras preparaciones de prGCD;

La fig. 12 es una fotografía del extremo inferior de un ejemplo de biorreactor desechable de la presente invención, que muestra múltiples entradas de gases para proporcionar aireación y mezcla del medio de cultivo y un ejemplo de estructura de soporte rígida cónica.

La fig. 13 es una fotografía que muestra una batería de ejemplos de biorreactores desechables a gran escala de la presente invención;

La fig. 14 es una fotografía de un ejemplo de biorreactor de la presente invención que muestra un orificio de recolección reutilizable:

La fig. 15 es una fotografía de transferencia Western que muestra la inmunodetección de AChE recombinante humana expresada en vegetales. 50 (columnas 3 y 7), 100 (columnas 2 y 6) y 200 ng (columnas 1 y 5) de AChE-R humana recombinante producido en un biorreactor desechable a gran escala según una realización de la presente invención (columnas 1-3) y AChE-S humana recombinante disponible en el comercio (columnas 4-6) fueron detectados usando un anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad surgido contra un péptido en el N terminal de AChE de origen humano (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) (idéntico en AChE-R y AChE-S). La columna 4 son patrones de pesos moleculares. La unión fuerte de anticuerpo es evidente en todas las muestras;

La fig. 16 es una fotografía de la tinción de proteína no específica Flamingo® de gel de SDS-PAGE de AChE-R recombinante humana expresado en vegetales, producido en un biorreactor desechable a gran escala según una realización de la presente invención, en comparación con el perfil de AChE-S disponible en el comercio. La AChE-R expresada en vegetales (columnas 1-3) y la AChE-S producida a partir de células de mamífero (columnas 5-7) se separaron como en la figura 13, y el gel fue teñido con reactivos Flamingo® como se describe en la presente memoria descriptiva. Debe apreciarse que el perfil de desplazamiento de AChE-R se corresponde con el de AChE-R detectada mediante inmunoensayo usando anticuerpos anti-AChE (figura 13 anterior). Además, la banda única observada sobre el gel como se muestra en la figura 13 indica la eficacia de la purificación;

La fig. 17 es un gel de ensayo de Karnovsky teñido para detectar la actividad catalítica de acetilcolinesterasa en células vegetales cultivadas en un biorreactor desechable a gran escala. Se purificó acetilcolinesterasa-R catalíticamente activa a partir de células BY-2 recolectadas a partir de tandas reunidas de células, cultivadas en un biorreactor desechable a gran escala de 400 l según una realización de la presente invención. Se separaron cantidades decrecientes de proteína purificada a partir de células (columnas 1 y 4 =200 ng; columnas 2 y 5 =100 ng; columnas 3 y 6 = 50 ng) en un gel de poliacrilamida nativo al 10% bajo condiciones no desnaturalizantes, se lavaron y se trataron para revelar la actividad catalítica de acetilcolina (tinción de Karnovsky). Se incluyeron como testigos cantidades correspondientes de acetilcolina-S (columnas 4-6). La electroforesis de AChE-R y AChE-S se realizó en gel de poliacrilamida nativa al 10% bajo condiciones no desnaturalizantes. Los geles se realizaron a 4°C, se aclararon 3 veces con H<sub>2</sub>O y se incubaron durante 1 h con agitación en tampón que contenía acetiltiocolina (0,5 mg/ml; Sigma), acetato de sodio (65 mM, pH 6,0; Sigma), citrato de sodio (5 mM; Sigma), sulfato cúprico (3 mM; Sigma) y ferricianuro de potasio (0,5 mM; Riedel De Haen). La actividad catalítica se detectó visualmente. La flecha superior indica el desplazamiento del tetrámero de AChE-S. La flecha inferior indica el desplazamiento de AChE monómera.

#### Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención es de un dispositivo desechable y reutilizable para cultivar y recolectar tejido y/o células



vegetales que comprende un recipiente no rígido que tiene un volumen de al menos 400 litros y que está configurado con orificios de intercambio de gases y un orificio de recolección que hacen posible que dicho dispositivo sea usado continuamente durante al menos dos ciclos consecutivos de cultivo/recolección, en que los orificios de intercambio de gases incluyen una pluralidad de orificios de entrada de gases colocados en una superficie del recipiente en la parte inferior de una mitad de una altura del recipiente configurado para mezclar y airear medio en el recipiente, en que el dispositivo no tiene agitación mecánica para mezclar el medio en el recipiente ni un rociador para distribuir gas cuando está presente medio en el mismo y en que el dispositivo está diseñado y construido para mantener la saturación de oxígeno y fuerzas de cizallamiento adecuadas para cultivar dicho tejido/células vegetales. Este dispositivo puede ser usado para cultivar células vegetales transformadas para la producción de materiales biológicamente activos derivados de vegetales, recombinantes (por ejemplo, productos farmacéuticos) a partir de las células y/o medio de cultivo. También se proporciona un sistema de cultivo de células vegetales usando el dispositivo de la presente invención.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención se pueden comprender mejor con referencia a los dibujos y descripciones que se acompañan.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la descripción que sigue o ilustrados mediante los ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser puesta en práctica o llevada a cabo de diversas maneras. También, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en la presente memoria descriptiva son para los fines de la descripción y no deben ser consideradas como limitantes.

Como se describe con anterioridad, el ajuste a escala de grandes volúmenes de biorreactores desechables requiere soluciones únicas a los problemas de aireación y mezcla. Algunos biorreactores de la técnica anterior han empleado un gas para estos fines. La solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0282269 de Proulx *et al.* describe un biorreactor desechable que tiene múltiples entradas de gases con difusores de gases integrados y filtros en los orificios de entrada, colocados en el extremo inferior del recipiente, con el fin de proporcionar aireación y mezcla. Esta configuración está limitada en cuanto que los filtros que están en contacto con el medio líquido tenderían a quedar bloqueados e interferir con el suministro adecuado de gases. No se describen capacidad o dimensiones volumétricas.

Otro tipo de biorreactor desechable que usa gas para la aireación y agitación es ofrecido por la entidad Cellexus Biosystems, PCC (Cambridge, Inglaterra). Este biorreactor es una bolsa flexible que tiene un tubo rociador integral fijado o colocado a lo largo del extremo inferior interior del dispositivo, para introducir aire o gas para aireación y mezcla. Las bolsas del biorreactor de Cellexus están diseñadas según una geometría asimétrica única, que concentra la mayoría del volumen de fluido de la bolsa en la mitad superior del biorreactor. Este diseño requiere un recinto de soporte especialmente diseñado (Cellmaker Lite® para el funcionamiento.

La patente de EE.UU. n° 6.432.698 de Gaugler *et al.* describe una bolsa de cultivo desechable y flexible para el cultivo de nematodos. La bolsa de cultivo está equipada con una entrada de gases y un difusor, en la forma de un tubo, para la aireación y mezcla del medio de cultivo. Están previstos volúmenes de hasta 200 litros, aunque no se proporciona una reducción para la práctica. No se describen dimensiones específicas.

La solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0272146 de Hodge *et al.* describe un biorreactor desechable de 150 litros que tiene paletas propulsoras integradas para la mezcla. La mezcla del medio de cultivo en biorreactores mediante propulsores se conoce que crea fuerzas de cizallamiento inadecuadas para cultivar células vegetales.

La patente de EE.UU. n° 6.391.683 de Shaaltiel *et al.* describe dispositivos de cultivo desechables que comprenden bolsas no rígidas que tienen orificios de entrada y salida de gases, diseñadas para un uso único o para ciclos múltiples de cultivo y recolección. El dispositivo emplea una presión de aire a través de un volumen y número de burbujas cuidadosamente regulados para mezclar y airear el cultivo. El cultivo eficaz de células vegetales transformadas que expresan exactamente una diversidad de proteínas recombinantes heterólogas (de mamíferos y no mamíferos) ha sido descrito usando los biorreactores descritos por Shaaltiel (véase la patente de EE.UU. 6.391.683, solicitud de patente de EE.UU. n° 10/784.295, publicaciones de patentes internacionales PCT n°s WO 2004/091475, WO 2005/080544 y WO 2006/040761). Sin embargo, Shaaltiel *et al.*, en el documento 6.691.683, describen un diseño adecuado para volúmenes de tamaño más pequeños y medios, que limitan los rendimientos de las proteínas recombinantes sintetizadas en los mismos.

Al reducir la presente invención a la práctica, los presentes inventores han diseñado un biorreactor desechable y reutilizable a gran escala construido de materiales no rígidos transparentes o translúcidos. El biorreactor tiene orificios de toma de muestras que posibilitan un uso durante al menos dos ciclos consecutivos de cultivo, dimensiones específicas y orificios de intercambio de gases que proporcionan gas de una manera suficiente para mezclar y airear un cultivo celular en el biorreactor con una concentración de oxígeno disuelto adecuada y fuerzas de cizallamiento para un crecimiento eficaz de células vegetales en volúmenes de más de 400 litros.

Por tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo desechable para cultivar y recolectar y/o células vegetales.

El dispositivo de la presente invención incluye un recipiente no rígido que tiene un volumen de al menos 400 litros y que está configurado con orificios de intercambio de gases y un orificio de recolección que hace posible que el dispositivo sea usado continuamente durante al menos dos ciclos consecutivos de cultivo/recolección.

5 Aunque el presente dispositivo puede ser usado para cultivar cualquier tipo de célula o tejido, está diseñado para hacer posible un cultivo eficaz a gran escala de células y tejido vegetales.

10 La saturación de oxígeno del medio es crucial para un crecimiento eficaz de células y la expresión de proteínas recombinantes y, por lo tanto, es crítica para el funcionamiento apropiado de biorreactores y su uso en la producción de productos celulares recombinantes. La saturación de oxígeno de biorreactores para un crecimiento de cultivo de células vegetales es incluso más importante, ya que las células vegetales son más sensibles a fluctuaciones en la saturación de oxígeno que las bacterias o células de mamíferos (véase la publicación de Schlatmann *et al*, Biotech. Bioeng., 1995; 45: 435-39). Además, las células vegetales son sensibles al entorno hidrodinámico en los biorreactores convencionales, debido lo más probablemente a un tamaño de células vegetales mayor, vasculización intensiva y modelos de agregación. Por tanto, aunque la aireación del medio de cultivo mediante la introducción de burbujas de gas en el recipiente proporciona también mezcla, se deben evitar fuerzas de cizallamiento perjudiciales para las células vegetales frágiles. Recientemente, las células vegetales en cultivo han mostrado que son susceptibles a fuerzas de cizallamiento subletales, que responden con una respuesta "sub-lítica" característica, que a su vez limita significativamente la eficacia de los biorreactores de células vegetales (Namdev y Dulop, App. Biochem and Biotech, Part A, Frontiers in Bioprocessing, 1995).

20 Por tanto, el dispositivo de la presente invención mantiene la saturación de oxígeno y las fuerzas de cizallamiento adecuadas para cultivar tejidos y/o células vegetales en volúmenes de 400 litros o más, empleando parámetros, o combinación de parámetros, críticos para determinar la saturación de oxígeno y las fuerzas de cizallamiento en cultivo.

25 La saturación de oxígeno y las fuerzas de cizallamiento adecuadas para cultivar tejidos y/o células vegetales en el dispositivo se mantiene mediante una combinación de valores o intervalos de valores de: a) una relación de altura a volumen; b) una presión de gas de entrada; c) una densidad de entradas de gases por área seccional transversal; d) una velocidad de aireación en la entrada; y e) un volumen de burbujas gaseosas en la entrada.

30 Relación de altura a volumen: Los métodos de mezcla mecánica son inadecuados para ser usados en biorreactores de células vegetales, especialmente cuando están siendo tratados volúmenes grandes de medio. La aireación y mezcla del medio de cultivo en un biorreactor a gran escala se pueden realizar mediante el movimiento de burbujas gaseosas a través del medio. Cuanto más intensivo sea el contacto del burbujeo gaseoso con el medio, mayor será la capacidad potencial de intercambio de gases y más eficaz será la acción de mezcla del gas en el medio. Por tanto, aunque la relación de altura a volumen de los biorreactores de volúmenes más pequeños puede permitir una mayor flexibilidad, la relación de altura a volumen de los dispositivos biorreactores que van a ser usados volúmenes grandes (por ejemplo, 400 litros o más) deben ser mantenidas en un intervalo de aproximadamente 0,06 a 1 centímetros por litro. La relación de altura a volumen se puede calcular a partir de la altura (longitud) del recipiente del dispositivo y el área de sección transversal media del dispositivo. Como se usa en la presente memoria descriptiva, el volumen del dispositivo es la altura dividida por el área seccional transversal. Por ejemplo, para un biorreactor que tiene una altura (longitud) de 200 centímetros y un volumen de 400 l (que tiene, por ejemplo, un radio medio de aproximadamente 25 cm), la relación de altura a volumen es 200/400 o 0,5; para un biorreactor que tiene una altura de 300 cm y un volumen de 3.000 l, la relación de altura a volumen es de 300/3.000, o 0,1. Ejemplos de intervalos de relaciones de altura a volumen adecuados para ser usados con el biorreactor de la presente invención son de aproximadamente 0,06 a 1 centímetro por litro, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5, lo más preferentemente de aproximadamente 0,44 cm por litro.

45 Además, se apreciará que la relación de altura a volumen puede ser calculada usando el volumen interno rellenable potencial total del recipiente o bien usando una parte designada del mismo, que es el volumen interno rellenable funcional en funcionamiento del recipiente, sin el "espacio vacío" que se encuentra normalmente por encima del nivel de fluido en un biorreactor.

50 Presión del gas de entrada: Con el fin de proporcionar suficiente gas (por ejemplo, aire u oxígeno) para la mezcla y aireación del medio de cultivo del biorreactor a gran escala, la presión de gases en la(s) entrada(s) necesita ser suficiente para superar la fuerza descendente de la columna de líquido en el biorreactor, y al mismo tiempo evitar las fuerzas de cizallamiento asociadas con la creación de demasiadas burbujas, o burbujas de tamaño inadecuado para el cultivo de células vegetales. Los biorreactores a gran escala de la presente invención, que tienen una relación de altura a volumen adecuada para el cultivo de células vegetales, necesitan una presión de gases mayor a la entrada de gases que en los biorreactores de volúmenes más pequeños. La presión gaseosa se expresa en unidades de bares, en que 1 bar es 100.000 pascales (Pa) o 1.000.000 dinas por cm<sup>2</sup>. Las presiones manométricas para verificar los reguladores de presión para el control de la presión gaseosa en la(s) entrada(s) de gases son bien conocidas en la técnica, y están ampliamente disponibles en el comercio. Ejemplos de intervalos de presiones de gases de entrada adecuados para el biorreactor de la presente invención están en el intervalo de aproximadamente 1,5 bar a aproximadamente 4 bar, más preferentemente de aproximadamente 1,5 bar a aproximadamente 2,5 bar.

Densidad de entradas de gases por área seccional transversal: Los biorreactores de volumen pequeño están limitados normalmente a una única entrada de gas o muy pocas, con el fin de proporcionar suficientes burbujas gaseosas, del volumen deseado, para la mezcla y aireación del medio de cultivo en el recipiente del biorreactor. Por otra parte, los biorreactores de volúmenes grandes, como los dispositivos de la presente invención, requieren una mayor densidad de entradas de gases con el fin de superar las fuerzas de compresión de la columna de medio de cultivo en el dispositivo, y conseguir los intervalos de presiones de gases de entradas necesarios para proporcionar la mezcla y aireación de una manera adecuada para ser usada en cultivos de células vegetales. Con el fin de proporcionar un control sobre la presión en la(s) entrada(s) de gases y mantener un tamaño de burbujas óptima para la mezcla y aireación del medio de cultivo en el biorreactor de volumen grande, se proporciona una pluralidad de entradas de gases, colocadas a una densidad dada en el recipiente no rígido y desechable del dispositivo. La densidad de entradas de gases se expresa como el número de entradas por metro cuadrado de superficie externa del recipiente del dispositivo. Ejemplos de intervalos de densidad de entradas de gases adecuadas para ser usadas en el biorreactor de la presente invención son de aproximadamente 20 entradas por metro cuadrado de la superficie del recipiente hasta aproximadamente 70 entradas por metro cuadrado. Preferentemente, la densidad de entradas de gases por área seccional transversal es de aproximadamente 40 a 60 entradas por metro cuadrado, más preferentemente 55 entradas por metro cuadrado.

Velocidad de aireación en la entrada: La aireación aumentada generalmente (es decir, la presencia de un intercambio de gases más rápido) y el oxígeno aumentado específicamente, aumentan ambos la velocidad de crecimiento de células en cultivo. Los biorreactores de volúmenes más pequeños para cultivos de células vegetales están provistos normalmente con una velocidad de aireación de 0,15-0,3 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto), en la entrada de gases, con una velocidad de aireación aumentada a medida que aumenta el volumen. Sin embargo, la eficacia de las burbujas de aire para favorecer la circulación celular es diferente en volúmenes cerrados más pequeños que en un volumen equivalente más grande, por tanto, se requiere una aireación no proporcional para favorecer la circulación de aire y la distribución de oxígeno en un volumen grande, en comparación con un número de volúmenes más pequeños que tienen el mismo volumen de medio combinado.

Al llevar a la práctica la presente invención, los inventores han encontrado sorprendentemente que en lugar de aumentar proporcionalmente la velocidad de aireación (vvm) con un volumen creciente, se consiguen resultados mejorados reduciendo el intervalo de la velocidad de aireación, medida como vvm, en biorreactores a gran escala. Ejemplos de intervalos de velocidades de aireación en la(s) entrada(s) de gases adecuados para cultivar células vegetales en un biorreactor de volumen grande son de aproximadamente 0,05-0,12 vvm y, preferentemente, de aproximadamente 0,07 vvm a aproximadamente 0,1 vvm. La ventaja de estas velocidades de aireación reducidas incluye un mayor rendimiento en los biorreactores de volumen grande y una eficacia energética mejorada, que es considerablemente significativa en cultivos a escala industrial.

Volumen burbujeo gaseoso en la entrada: La importancia de un aparato de mezcla adecuada en los reactores a gran escala no puede ser sobrevalorada. En algunos casos, particularmente relativos a células vegetales, el tamaño de las burbujas gaseosas es de gran importancia para el cultivo y crecimiento eficaces de células en un biorreactor. Las burbujas pequeñas pueden deteriorar realmente las células vegetales y un volumen de burbujas medias de no menos de 20 milímetros cúbicos resuelve sustancialmente este problema potencial. Por tanto, junto con la presión de gases y el número de entradas, es importante el control del volumen de burbujas gaseosas en la entrada para conseguir la mezcla y aireación del medio de cultivo eficaces para el crecimiento de células vegetales. Aunque el tamaño de las burbujas suministradas por la(s) entrada(s) de gases variará según el uso del dispositivo, ejemplos de intervalos adecuados de volumen de burbujas gaseosas en la entrada son de 20 a más de 1.800 milímetros cúbicos de volumen, preferentemente de aproximadamente 40 milímetros cúbicos a aproximadamente 1.000 milímetros cúbicos, más preferentemente de aproximadamente 100 milímetros cúbicos a aproximadamente 500 milímetros cúbicos, lo más preferentemente de aproximadamente 300 milímetros cúbicos. En los casos en que se deseen burbujas más pequeñas, se puede usar un rociador en la entrada de gases para reducir el tamaño de las burbujas, pero no por debajo del tamaño adecuado para biorreactores de células vegetales a gran escala.

El biorreactor desechable de la presente invención tiene por lo tanto un cierto número de ventajas sobre los dispositivos actualmente conocidos que incluyen, pero sin limitación, el proporcionar condiciones de cultivo para volúmenes grandes mientras se mantiene una aireación y mezcla no mecánica superiores del cultivo y medio de células vegetales, según los parámetros mencionados en la presente memoria descriptiva, consiguiendo así rendimientos y pureza superiores de las células cultivadas y los productos derivados de las células.

La figura 1 ilustra una realización del dispositivo de la presente invención que es indicada en la presente memoria descriptiva como dispositivo 10.

Como se muestra en la figura 1, el dispositivo 10 incluye un recipiente 12 que sirve para cultivar y recolectar tejido y/o células vegetales. El recipiente 12 se muestra parcialmente lleno con un líquido y, por tanto, está en un estado inflado (y relativamente rígido) en la figura 1, sin embargo, debe apreciarse que el recipiente 12 está construido preferentemente en forma de un recipiente no rígido (por ejemplo, construido a partir de materiales flexibles. Por tanto, la presión del contenido del recipiente 12 en las paredes del recipiente mantiene la forma del recipiente 12. Cuando está vacío, o parcialmente relleno, el recipiente 12, por la naturaleza de su diseño no rígido, puede derrumbarse parcial o completamente. Esta característica del recipiente 12 facilita el almacenamiento y transporte

cuando está vacío. El recipiente 12 tiene un volumen interno que puede ser acomodado entre aproximadamente 400 litros y aproximadamente 30.000 litros, más preferentemente entre aproximadamente 500 litros y 8.000 litros, lo más preferentemente entre aproximadamente 600 y 3.000 litros. El recipiente 12 tiene una relación típica de altura a volumen de aproximadamente 0,06-1 centímetros a litro.

5 El recipiente 12 está construido preferentemente a partir de un polímero como polietileno, policarbonato, un copolímero de polietileno y nylon, poli(cloruro de vinilo) (PVC), etil-acetato de vinilo (EVA) y etileno-alcohol vínlico (EVOH). Se pueden usar grados variables de densidades y tipos de polímeros, como polietileno de baja densidad (LDPE), polietileno de densidad muy baja (ULDPE), polietileno de densidad ultrabaja (ULDPE), polietileno lineal de densidad baja (LLDPE) y similares. El recipiente 12 puede ser construido mediante soldadura a partir de láminas de  
10 polímeros, moldeo por soplado a partir de polímeros fundidos o cualquier otro método estándar de fabricación de plásticos-polímeros conocido en la técnica.

En una configuración preferida, el recipiente 12 es construido a partir de un material estratificado de varias capas de uno o más tipos de polímeros. El material estratificado puede contener 2, 3, 4 y hasta 7, 9 o 15 o más capas, que pueden estar hechas de materiales flexibles similares o diferentes de grosor variable, siendo seleccionados los  
15 materiales y el grosor, por ejemplo, según el volumen de fluido del recipiente 12. Las capas pueden ser producidas mediante coextrusión. Los materiales estratificados pueden estar diseñados para proporcionar una suavidad específica o una textura rugosa a las superficies interna y externa del recipiente, una resistencia a la tracción mayor o menor, elasticidad, suavidad, flexibilidad, dureza, durabilidad, capacidad de tratamiento, etc. El material se puede seleccionar para que tenga niveles bajos o, preferentemente, esté desprovisto de agentes de tratamiento derivados  
20 de animales inactivados. Pueden ser incluidos agentes de deslizamiento y/o antibloqueo como sílice o tierra de diatomeas en las capas del material estratificado para reducir el rozamiento y/o evitar la autoadhesión.

El recipiente 12 de la presente invención puede estar hecho a partir de materiales diseñados para proporcionar un carácter transparente y/o translúcido al recipiente, en algunas realizaciones el material puede ser también no translúcido cuando la luz sea perjudicial para las células o el producto. Como se usa en la presente memoria  
25 descriptiva, transparente se define como claro, transmitiendo fácilmente la mayor parte si no la totalidad de la luz, mientras que translúcido se define como transmisor una parte, pero no toda la luz. En una realización, el dispositivo es para células vegetales en cultivo, que no tienen la capacidad de fotosíntesis. En otra realización, cuando el dispositivo es usado para el cultivo de otros tipos de células, por ejemplo, células de musgo o células de algas, se pueden hacer crecer bacterias fotosintéticas que tengan capacidades fotosintéticas en el dispositivo.  
30 Preferentemente, la luz transmitida en el volumen interno del recipiente es de longitudes de onda adecuadas para ser usadas por los pigmentos fotosintéticos y otros de contracción luminosa de las células vegetales cultivadas en el biorreactor. La luz puede ser necesaria también para la producción de metabolitos secundarios, por ejemplo, antocianina, mediante células de uva vinícola, más preferentemente, el recipiente 12 está diseñado a partir de materiales que permiten una observación visual o instrumental (por ejemplo, por espectrofotometría) y/o una  
35 verificación del volumen interno, con el fin de detectar los cambios en el cultivo y/o medio de cultivo que sean potencialmente indicativos del estado del cultivo (por ejemplo, color, coagulación celular, turbidez resultante de una contaminación).

El recipiente 12 puede ser fabricado en cualquier configuración deseable, siendo preferida una configuración de tipo de funda cónica que tiene una parte superior 14 y una parte inferior 16 (cónica en la figura 1) conectadas a través de  
40 dos paredes laterales 18 que son lisas cuando el recipiente 12 está vacío y proporcionan una sección transversal sustancialmente cilíndrica cuando el recipiente 12 está lleno. Otras formas de secciones transversales como rectangular o poliédrica, por ejemplo, pueden ser también adecuadas.

Se apreciará que la forma cilíndrica es la más adecuada para los recipientes de cultivos celulares, proporcionando una producción de flujo de fluido más uniforme y sin impedimento para una mezcla con una turbulencia y generación de fuerzas de cizallamiento mínimas que son perjudiciales para los cultivos de células vegetales. Preferentemente, la parte inferior 16 está adecuadamente conformada para minimizar la sedimentación. Por ejemplo, la parte 16 puede ser sustancialmente frusta-cónica (como se muestra en la figura 1), teniendo al menos una pared o paredes  
45 inclinadas hacia arriba. Al llevar a la práctica la invención, el inventor ha encontrado que esta forma es superior respecto a una forma cónica para evitar la sedimentación de células que puede aumentar el deterioro y la muerte celular, teniendo así una influencia sobre la viabilidad global del cultivo. Alternativamente, la parte inferior 16 puede ser sustancialmente cilíndrica o alternativamente convexa. Las configuraciones anteriormente mencionadas de la parte inferior 16 hacen posible que el gas sea suministrado al recipiente 12 cerca de la parte inferior 16 para inducir un movimiento de mezcla al contenido del recipiente que minimice eficazmente la sedimentación en el mismo. No obstante, la parte inferior 16 puede ser sustancialmente lisa en otras realizaciones de la presente invención.

55 El recipiente 12 puede estar fabricado mediante unión/soldadura de dos paneles (que forman las paredes laterales 18) de un material adecuado. Por ejemplo, dos láminas de un material polímero se pueden cortar en una forma aproximadamente rectangular y alargada y ser colocadas una sobre la otra. Las láminas son seguidamente conjuntamente unidas por fusión de una manera bien conocida en la técnica para formar cordones de unión a lo largo de los bordes de los dos lados más largos y a lo largo de la periferia de uno de los extremos más cortos y,  
60 nuevamente, de forma paralela e internamente desplazada al mismo para formar un cordón soldadura en la parte superior 14 del recipiente.

5 La parte inferior 16 del recipiente puede estar formada mediante unión por fusión del extremo corto restante de las láminas a lo largo de dos líneas de cordones de soldadura inclinadas, que convergen mutuamente desde los cordones de soldadura de los lados largos. Opcionalmente, los dos cordones de soldadura inclinados pueden estar unidos por encima de su vértice por otra línea de cordones de soldadura de fusión aproximadamente ortogonales respecto a los cordones de soldadura laterales largos. Antes de la soldadura por fusión de las dos láminas conjuntamente, pueden ser soldados por fusión los elementos de fijación de plástico en lugares correspondientes a los puntos de unión para los correspondientes orificios de entrada y salida (descritos en detalle con posterioridad).

10 El recipiente 12 puede ser fabricado también a partir de una envoltura continua de material polímero flexible, eliminando la necesidad de cordones de soldadura a lo largo los lados alargados del recipiente y proporcionando una sección transversal continua ininterrumpidamente circular a través de la mayor parte de la altura del recipiente. El uso de una envoltura de material para la fabricación es deseable ya que la ausencia de cordones de soldadura minimiza la turbulencia y las fuerzas de cizallamiento durante la aireación y mezcla del medio de cultivo.

15 Como se muestra en la figura 1, el recipiente 12 incluye adicionalmente un orificio de recolección 19I para recolectar al menos una parte del medio que contiene células y/o tejido haciendo posible así que el dispositivo 10 sea usado continuamente durante al menos dos ciclos consecutivos de cultivo o recolección, sin necesidad de limpieza, esterilización y/o ensayos entre los ciclos. Alternativamente, la recolección se puede efectuar a través de un orificio de recolección adicional (19II) colocado en la parte inferior del biorreactor para la purga de todo el contenido del biorreactor, haciendo posible así la recolección del cultivo completo en el biorreactor. Una segunda parte restante de medio que contiene células y/o tejido sirve como inoculante para un siguiente ciclo de cultivo y recolección, en que el medio de cultivo y/o los aditivos necesarios pueden ser proporcionados como se describe con posterioridad. El (los) orificio(s) de recolección 19 puede(n) ser usado(s) también para introducir el volumen original de inoculante en el recipiente, así como posibilitar que el material recolectado fluya en el interior y fuera del recipiente.

20 El (los) orificio(s) de recolección 19 incluye(n) un conducto de recolección 20 que tiene una entrada de recolección 22 que está en comunicación fluida con el volumen interno del recipiente 12 y una salida de recolección 24 que está colocada fuera del recipiente 12. Alternativamente el (los) orificio(s) de recolección 19 puede estar hecho de un orificio único, soldado en el recipiente 12, que entra en contacto con el volumen interno del lado interno y tiene una salida al lado externo del recipiente. El conducto de recolección 20 puede estar hecho de un material polímero o aleación, como es bien conocido en la técnica.

25 Como la recolección a menudo está obstaculizada por la presencia de aglomerados celulares, el conducto de recolección 20 es fabricado preferentemente con un diámetro interno ancho (por ejemplo, en el intervalo de 1-10 cm) y/o teniendo un grado de elasticidad que permita el vaciado de coágulos.

30 La posición del(os) orificio(s) de recolección 19 se selecciona según el volumen del recipiente 12, de forma que la parte del medio y células y/o tejido que permanece es una fracción predeterminada del volumen del recipiente 12 (por ejemplo, 5-35%).

35 El orificio de recolección 19 puede estar colocado en una posición cerca de la parte inferior del recipiente 12 que hace posible la recolección de la mayor parte del contenido del recipiente 12 mientras retiene una parte de medio que contiene células y/o tejidos para un uso como un inóculo.

40 De forma alternativa o adicional, un orificio de recolección 19II puede estar colocado adicionalmente debajo de la parte inferior 16 del recipiente 12 y el operario podría asegurar óptimamente de forma manual que una parte adecuada de medio que contiene células y/o tejido pudiera permanecer en el recipiente 12 después de recolectar una parte deseada de medio y células y/o tejido. El orificio de recolección 19II en una posición por debajo de la parte inferior 16 hace posible la separación de la totalidad o la mayor parte del medio.

45 Se apreciará que aunque dichas posiciones del(os) orificio(s) de recolección 19I y 19II se presentan como alternativas con anterioridad, pueden ser ambas incorporadas en un único dispositivo 10 que proporcione al operario orificios de recolección alternativos.

50 El (los) orificio(s) de recolección 19 incluye adicionalmente un regulador de flujo 26. El regulador de flujo 26 puede ser, por ejemplo, una válvula para regular el flujo de material dentro o fuera del recipiente 12 a través de orificio(s) de recolección 19. El flujo puede ser regulado también a través de un conector aséptico que está hecho de un material esterilizable y duradero como vidrio, acero inoxidable, plástico rígido y similares. El (los) orificio(s) de recolección 19 puede incluir también un supresor de la contaminación (no mostrado), como un separador de fluidos con el fin de evitar la introducción no intencionada de material en el recipiente 12 a continuación de la recolección.

55 El recipiente 12 puede incluir un orificio adicional de toma de muestras que es similar en construcción al(os) orificio(s) de recolección 19 y que puede estar colocado en las proximidades del orificio de recolección 19. El recipiente 12 incluye adicionalmente una entrada 51 de aditivo adicional y opcional para la introducción de medio u otros aditivos. En algunas realizaciones, la entrada 51 de aditivos está colocada en la parte superior del recipiente 12, en comunicación con el "espacio vacío" por encima del medio de cultivo. En otras realizaciones, la entrada 51 de aditivos está colocada más cerca de la parte media del extremo inferior del recipiente 12. En otras realizaciones, la entrada 51 de aditivos puede incluir también un supresor de la contaminación (no mostrado), como un separador de

fluidos, con el fin de evitar la introducción no intencionada de material en el recipiente 12 durante o con posterioridad a la adición de medios, etc.

5 El dispositivo 10 incluye adicionalmente orificios de intercambio de gases para comunicar los gases dentro y fuera del recipiente 12. Los orificios de intercambio de gases incluyen al menos un orificio de entrada de gases 28, para gas de filtración (como aire, oxígeno u otros gases) a través del medio, para la aireación y mezcla del cultivo de células vegetales y al menos un orificio 30 de gases de escape, para la evacuación del gas que se filtra a través del contenido del recipiente 12 (por ejemplo, medio de cultivo y células). Los orificios de entrada y los orificios de salida de gases pueden estar equipados con un filtro 49, descrito en detalle en la presente memoria descriptiva. En una realización, se proporciona una pluralidad de entradas de gases con el fin de distribuir mejor la presión de aire mientras se proporciona el flujo de entrada necesario para el flujo deseado de burbujas de aire.

El (los) orificio(s) de entrada de gases 28 puede estar conectado a un suministro de gas (por ejemplo, una bomba) a través de un tubo o tubos de suministro de gases.

15 El (los) orificio(s) de entrada de gases 28 puede estar hecho a partir de un material flexible (por ejemplo, silicona) o rígido (por ejemplo, acero inoxidable). El orificio de entrada de gases 34 (entrada de gases 34(I) corresponde al orificio de entrada de gases 28(I) en la posición I y la entrada 34(II) corresponde al orificio de entrada de gases 28(II) en la posición II) del(os) orificio(s) de entrada de gases 28 está diseñada para proporcionar burbujas gaseosas de volumen adecuado para airear y mezclar el medio de cultivo vegetal y evitar la sedimentación, sin generar fuerzas de cizallamiento no deseadas, como se describió con anterioridad. La entrada de gases 34 puede variar en su forma (estrecha, ancha, inclinada, cónica, redondeada, etc.), para proporcionar una forma y tamaño de burbujas deseados. Alternativamente, el orificio puede estar conformado en una pieza con diámetros diferentes en la abertura interna y externa, como se describe para el orificio de recolección 19.

Los orificios de intercambio de gases 28 y 30, el (los) orificio(s) de recolección 19 y los orificios de toma de muestras opcionales se forman creando una abertura en la superficie del recipiente 12 y reforzando la abertura alrededor del orificio con un material rígido o no rígido adicional, como es bien conocido en la técnica.

25 Con el fin de proporcionar una mezcla y aireación adecuadas, se puede proporcionar una pluralidad de orificios de entrada de gases 28 a una densidad de 20 a 70 entradas por metro cuadrado. Los orificios de entrada de gases 28 pueden estar colocados alrededor del perímetro del recipiente 12 a una distancia predeterminada del extremo inferior 16 del mismo. La colocación de los orificios de entrada de gases 28 está determinada por el volumen y la altura del recipiente y por el tipo de aireación deseada para usos de cultivos de vegetales específicos. Los orificios de entrada de gases 28 pueden estar colocados de 15 a 65 centímetros a partir de la parte inferior 16 del recipiente. En una realización de la invención, al menos uno de los orificios de entrada de gases está en una ubicación por debajo del nivel del orificio de recolección 18.

35 Se pueden proporcionar orificios de entrada de gases 28 adicionales en la medida necesaria, por ejemplo, para recipientes que tienen dimensiones de altura muy grandes o para recipientes con volúmenes más elevados, con el fin de proporcionar volúmenes mayores de gas, sin aumentar la presión de la entrada de gas o el volumen de las burbujas de gas. Los orificios de entrada de gases 28 adicionales pueden estar colocados en cualquier ubicación en la superficie del recipiente 12 y están ubicados preferentemente en la parte inferior en una mitad de la altura del recipiente 12, para proporcionar una mezcla y aireación sustanciales del medio. Esta configuración, que tiene una pluralidad de orificios de entrada de gases como se indica en la presente memoria descriptiva mediante los orificios de entrada de gases en la posición I [28(I)] y II [28(II)], que tienen las entradas de gases 34(I) y 34(II), respectivamente, colocados a una distancia unos de otros para proporcionar una mezcla y aireación eficaces del cultivo de células vegetales. Los orificios de entrada de gases contienen adicionalmente un mecanismo de prevención de la contaminación, como un filtro 49 o un separador (no mostrado), que puede evitar la entrada de gases, fluidos o sólidos contaminantes (por ejemplo, microbios portados el aire) en el volumen interno del recipiente 12 y el medio de cultivo.

50 El recipiente 12 incluye un orificio 30 de gases de escape para la evacuación y separación del gas que se acumula por encima del medio de cultivo. El orificio 30 de gases de escape está colocado en la parte superior de la mitad, preferentemente un tercio de la parte superior del recipiente 12, en una ubicación sustancialmente por encima del nivel del fluido (por ejemplo, medio de cultivo) con el fin de que esté en comunicación fluida con el "espacio vacío" por encima del medio de cultivo. La abertura externa 46 de gases de escape del orificio 30 de gases de escape puede estar abierta al medioambiente y el flujo de gas de escape es desregulado en el orificio 30 de gases de escape. Opcional y alternativamente, el orificio 30 de gases de escape puede incluir adicionalmente un regulador 48 de gases de escape (por ejemplo, una válvula o cierre de presión) que regula el flujo de gas fuera del recipiente 12 y, por tanto, puede ser usado para crear una presión positiva de gas en el recipiente 12 y mantener así el recipiente 55 12 ampliamente inflado y en la forma cilíndrica deseada. El orificio 30 de gases de escape puede incluir adicionalmente un mecanismo de prevención de la contaminación, como un filtro 49 o un separador, que puede evitar la entrada de gases, fluidos o sólidos contaminantes (por ejemplo, microbios portados en el aire) en el volumen interior del recipiente 12 y el medio de cultivo.

Como el recipiente 12 de la presente invención está diseñado para ser usado con volúmenes de al menos 400 y de

hasta varios miles de litros de medio de cultivo, y como es de naturaleza flexible, el dispositivo 10 incluye adicionalmente una estructura de soporte para soportar el recipiente 12 en posición.

Como se muestra en la figura 2, el soporte 50 puede incluir una estructura cónica que está diseñada para proporcionar soporte para el recipiente 12 sin ejercer una fuerza sobre el recipiente 12 o sobre su contenido.

- 5 El soporte 50 puede ser fabricado a partir de acero, madera, plástico o material cerámico. El soporte puede estar hecho de un tubo cilíndrico o elíptico de peso ligero que forma una estructura de tipo rejilla de forma anular 52 y miembros de soporte de tipo varilla 54. Alternativamente, los miembros de soporte pueden ser placas, conectadas a los miembros de tipo varilla vertical y adicionalmente conectados a miembros horizontales de forma anular. Las placas pueden ser continuas, creando esencialmente un soporte de tipo concha para el recipiente, o pueden ser de tipo bastón, proporcionando anillos de elementos de soporte anchos con un espacio entre ellos. La estructura de soporte 50 puede estar libremente posada o unida a ruedas (no mostradas) para una movilidad, o puede estar adicionalmente soportada mediante unión a una estructura rígida como una pared, suelo, columna, etc.

- 15 El recipiente 12 es desechable y, por tanto, está diseñado para ser desechado después de su uso (uno o más ciclos de cultivo) con pérdidas e impacto medioambiental mínimos. Los dispositivos hechos de plásticos como los plásticos flexibles usados en el presente dispositivo, por ejemplo, son relativamente económicos y, por lo tanto, pueden ser desechados después de su uso con una pérdida económica insignificante, si se desea. La eliminación de estos dispositivos de biorreactores generalmente no plantea una desventaja económica al usuario ya que incluso los bajos costes de capitales de estos artículos son compensados por la facilidad de uso, almacenamiento y otras consideraciones prácticas. La eliminación es ventajosa en cuanto que suprime la necesidad de lavados costosos con desinfectantes y otros productos químicos energéticos que contaminan el medioambiente. Por tanto, los dispositivos de biorreactores desechables polímeros como el recipiente 12 pueden ser fácilmente reciclados, reduciendo así la contaminación y el impacto medioambiental de su uso.

- 20 Aunque el recipiente 12 puede ser esterilizado y reutilizado, es proporcionado preferentemente en una forma pre-esterilizada, eliminando así la necesidad de procedimientos de esterilización costosos y que requieren tiempo. La esterilización del recipiente no rígido se puede realizar usando procedimientos de esterilización en un húmedo y/o en seco. Preferentemente, la esterilización es un procedimiento de esterilización en seco adecuado para ser usado con materiales de plásticos flexibles no rígidos mencionados en la presente memoria descriptiva, como radiación de haces gamma o de electrones, esterilización gaseosa (por ejemplo, óxido de etileno) y similares, bien conocidos en la técnica.

- 25 Según realizaciones preferidas de la presente invención, el funcionamiento del dispositivo y/o baterías individuales anteriormente descritos está controlado por un ordenador (no mostrado). El ordenador es opcional y preferentemente capaz de controlar parámetros del funcionamiento de la batería y/o de un dispositivo según la presente invención como uno o más de la temperatura, cantidad y duración del gas o combinación gaseosa que entra en el recipiente, cantidad y duración del gas que se deja salir del recipiente, cantidad y duración de la adición de al menos un material (como nutrientes, medio de cultivo, etc.) y/o cantidad de luz. El ordenador puede ser capaz opcionalmente de detectar la cantidad de residuo que se está produciendo.

- 30 El ordenador está conectado preferentemente a los diversos instrumentos medidores presentes con respecto al funcionamiento de la presente invención como un ejemplo de un sistema de automatización o semiautomatización del funcionamiento de la presente invención. Por ejemplo, el ordenador está conectado preferentemente a un indicador (no mostrado) o indicadores para controlar el flujo de gas o combinación gaseosa. El indicador está conectado preferentemente a una conducción conectable a un suministro de aire adecuado y controla el flujo de aire u otro(s) gas(es) a la conducción.

- 35 El ordenador está conectado preferentemente a un indicador de la temperatura, que está presente más preferentemente en el entorno del recipiente 12 pero, más preferentemente, no está dentro del recipiente 12. El ordenador es capaz también de forma opcional y preferente de controlar un mecanismo para el control de la temperatura, como un calentador y/o un enfriador, por ejemplo.

El ordenador está conectado de forma opcional y preferente a un indicador para controlar el flujo de medios y/o otros nutrientes desde un recipiente de nutrientes/medios al recipiente 12.

- 40 El ordenador está conectado preferentemente al menos a un orificio del recipiente y, más preferentemente, está conectado a al menos un orificio de recolección 19. El ordenador puede controlar opcionalmente un dispositivo automatizado de toma de muestras y/o recolector para separar partes del contenido del recipiente desde un orificio opcional de toma de muestras, para ensayo y/o recolección (no mostrado). El ordenador puede estar conectado también opcionalmente a un analizador para analizar estas partes del contenido, por ejemplo, con el fin de proporcionar una retroalimentación para el funcionamiento del ordenador.

- 45 Como se mencionó con anterioridad, el dispositivo 10 está diseñado para cultivar cultivos de células vegetales. Los medios de cultivo adecuados para cultivos de grandes volúmenes de células vegetales en el dispositivo de la presente invención pueden ser cualquier medio de cultivo de células vegetales conocido en la técnica. Ejemplos específicos pero no limitativos de medios de cultivo adecuados son medios de Murashige y Skoog (Sigma Ltd, St

Louis, MO), medio de Anderson, medio de Schenk y Hildebrandt y similares. Están disponibles también en el comercio muchos medios de cultivo de tejidos vegetales (véase, por ejemplo, Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, KY).

5 La expresión "cultivo de células vegetales" se refiere a cualquier tipo de células vegetales de tipo salvaje (que se producen de forma natural) o células vegetales genéticamente modificadas (por ejemplo, capaz de una expresión estable o transitoria de genes exógenos). Preferentemente, se refiere a cultivos de células que producen un ingrediente activo que es comercialmente deseado para ser usado en la industria farmacéutica (fármaco o APIs de fármacos), la industria alimentaria (por ejemplo, un sabor o aroma), agricultura (por ejemplo, un plaguicida), cosméticos y similares.

10 Preferentemente, el cultivo de células vegetales comprende células vegetales obtenidas a partir de un tejido vegetal como una raíz o meristema de hojas. Más preferentemente, las células vegetales se seleccionan entre el grupo que consiste en células de raíz transformadas de *Agrobacterium rhizogenes*, célula de apio, célula de jengibre, tabaco, alfalfa, tomate, lechuga, célula de rábano picante y célula de zanahoria.

15 Cultivos de células adicionales que se pueden hacer crecer en la presente invención incluyen levadura, musgo, algas y bacterias de fotosíntesis.

20 Los cultivos de células vegetales adecuados para ser usados con los dispositivos y métodos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, líneas celulares establecidas y líneas celulares generadas a partir de raíces, hojas, tallos, flores de vegetales y similares. Ejemplos no limitativos de líneas celulares establecidas son líneas celulares de *Nicotiana tabacum* L. denominada Bright Yellow-2 (BY-2) y *Nicotiana tabacum* L. denominada Petit Havana.

25 Se apreciará que la presión de entrada de gases aumentada, la densidad de entrada de gases aumentada y la velocidad de aireación de gases aumentada y el volumen requerido para proporcionar una mezcla y aireación adecuadas para biorreactores a gran escala de la presente invención, puede representar un posible problema de formación de espuma del medio de células vegetales, que puede ser perjudicial para las células y el contenido del medio. Métodos conocidos en la técnica para la inhibición de la formación de espuma incluyen, pero sin limitación, el uso de agentes antiespumantes como siliconas, fosfatos orgánicos y alcoholes, que pueden actuar para provocar pequeñas burbujas que pueden coalescer en forma de burbujas más grandes y menos perjudiciales. Los agentes antiespumantes de calidad alimenticia comúnmente usados en la industria y el tratamiento de alimentos incluyen, por ejemplo, polidimetilsiloxano y simeticona. El uso de un agente antiespumante en el biorreactor desechable a gran escala de la presente invención se describe en detalle en la sección de ejemplos con posterioridad.

35 La presente invención la presente invención se refiere también a un método para cultivar y recolectar células vegetales en un biorreactor desechable a gran escala. El dispositivo está configurado de forma opcional y preferente según el dispositivo descrito con anterioridad, lo más preferentemente según el dispositivo descrito en el ejemplo 1 posterior. En este método, las células vegetales se colocan preferentemente en un recipiente del dispositivo según la presente invención. Opcionalmente y más preferentemente, las células vegetales son cultivadas en suspensión.

40 Según realizaciones preferidas de la presente invención, las células vegetales son cultivadas en suspensión en un medio líquido, con al menos un gas esterilizado o una combinación gaseosa (pluralidad de gases) añadido en la medida necesaria. De forma opcional y preferente, el gas esterilizado comprende una combinación de gases esterilizada que comprende más preferentemente aire esterilizado. El gas y/o combinación gaseosa esterilizado es añadido preferentemente al recipiente a través de una entrada de aire, preferentemente conectada a un filtro esterilizante (preferentemente, un filtro de 0,2 micrómetros) durante cada ciclo, de forma continua o por impulsos, como se describió anteriormente.

45 El medio de cultivo esterilizado y/o los aditivos esterilizados se colocan preferentemente en el recipiente y se transfieren a través de la entrada 51 de aditivos en el reactor, preferentemente a través de un filtro o filtros de esterilización como se describió anteriormente.

50 Las células vegetales (como un ejemplo de un inoculante axénico) son añadidas de forma opcional y preferente a través del recolector. De forma opcional y preferida, las células vegetales en el recipiente (12) pueden ser expuestas a luz, por ejemplo, a través de una luz externa (una fuente de iluminación externa al recipiente), particularmente si el recipiente es transparente y/o translúcido. Opcionalmente, no se usa una fuente de luz, opcionalmente el recipiente es mantenido en condiciones oscuras.

Las células se dejan crecer hasta un rendimiento deseado de células y/o del material producido por las células, como una proteína o un metabolito secundario, por ejemplo.

55 Según realizaciones preferidas, se deja que salgan preferentemente el aire en exceso y/o los gases residuales del recipiente a través de una salida de gases, opcionalmente a través de un filtro, opcional y preferentemente de forma continua y/o intermitente.

También de forma opcional y preferida, el material en el recipiente (como el medio de cultivo celular, por ejemplo) es



verificado en cuanto a uno o más contaminantes y/o en cuanto a la calidad de las células y/o producto(s) celular(es) que se producen en el recipiente. Más preferentemente, y si se encuentra que están presentes uno o más contaminantes en el cultivo, o las células y/o producto(s) celular(es) que se producen son de escasa calidad, el dispositivo y su contenido son desechados.

- 5 En un momento apropiado, particularmente si no se encuentran contaminante(s) y/o células y/o productos celulares de escasa calidad, es preferentemente recolectada al menos una primera parte del material en el recipiente, como el medio que contiene células y/o producto(s) celular(es). Más preferentemente, se deja que permanezca en el recipiente una segunda parte restante de material, como un medio que contiene células y/o producto(s) celular(es), en que esta segunda parte puede servir opcionalmente como un inoculante para un siguiente ciclo de cultivo/recolección. A continuación, se pueden proporcionar el medio de cultivo esterilizado y/o los aditivos esterilizados para el siguiente ciclo de cultivo/recolección a través de la entrada 51 de aditivos, opcionalmente conectada a un filtro 49 para evitar la contaminación.

El ciclo anteriormente descrito se realiza opcionalmente más de una vez. De forma opcional y preferida, el método permite que las células sean cultivadas y/o recolectadas anaeróbicamente.

- 15 Para la realización anaeróbica, se proporciona un gas inerte, en lugar de oxígeno o aire, a través de las entradas de gases del dispositivo. Para al menos un dispositivo se realiza el siguiente procedimiento. Se introduce un inoculante axénico en el dispositivo a través de un orificio de recolección. A continuación, se añaden medio de cultivo esterilizado y/o aditivos esterilizados al dispositivo a través del conducto de entrada de aditivos comunes. Opcionalmente, el dispositivo está iluminado como se describió anteriormente.
- 20 Las células en el dispositivo se deja que crezcan en el medio hasta un rendimiento deseado de células y/o producto(s) de las células. De forma opcional y preferida, se deja que salgan del dispositivo el aire y/o gases residuales en exceso, opcionalmente a través de un filtro, más preferentemente de forma continua, a través de un orificio de gases de escape.

- 25 Como para el método anterior, el material en el recipiente es verificado en cuanto a la presencia de uno o más contaminante(s) y/o células de escasa calidad y/o producto(s) celular(es) de escasa calidad, en cuyo caso el recipiente y su contenido son preferentemente desechados. También como para el método anterior, las células y/o producto(s) celular(es) son preferentemente recolectados en un momento adecuado, por ejemplo, cuando se ha producido la cantidad deseada de producto(s) celular(es).

- 30 Normalmente, un sistema de purificación de agua suministra agua desionizada y sustancialmente exenta de endotoxinas a un depósito que comprende medios concentrados y medios diluidos y seguidamente se bombea al dispositivo 10 a través de una entrada de aditivos. Se instalan filtros, normalmente de 0,2 micrómetros, en los conductos de alimentación y también justo en dirección ascendente de la entrada para minimizar el riesgo de contaminación del contenido del recipiente en cada dispositivo 10. De forma alternativa o adicional, se puede usar también una válvula para minimizar este riesgo.

- 35 Para el primer ciclo de cultivo de cada dispositivo 10, el inoculante, normalmente una muestra suficiente del tipo de célula que se requiere colectar en el dispositivo 10, es previamente mezclado con medios o agua en un recipiente previamente esterilizado y es introducida en el dispositivo 10, normalmente a través del orificio del recolector, pero de forma alternativa u opcional a través de un orificio de entrada de aditivos separado. Seguidamente se introducen los medios en el dispositivo 10 a través del orificio del recolector, o a través del orificio opcional de entrada de aditivos. Para los ciclos posteriores, solamente se introducen medios y/o aditivos, como se describió con anterioridad.

- 45 Normalmente, un compresor de aire proporciona aire o gases sustancialmente esterilizados a cada dispositivo 10, a través de un cierto número de aparatos: un filtro grueso para separar partículas, un secador y un aparato de humedad para suprimir la humedad y un filtro de materias finas, normalmente de 0,2 micrómetros, para separar los contaminantes. Preferentemente, otro filtro justo en dirección ascendente de la entrada de gases minimiza adicionalmente el riesgo de contaminación del contenido del recipiente.

- 50 Para cada dispositivo 10, todas las conexiones al recipiente 12, es decir, el orificio(s) de entrada de gases, el orificio de entrada de aditivos y preferentemente también el orificio(s) de gases de escape y el recolector son esterilizados antes de su uso y la esterilización se mantiene durante la conexión a la instalación periférica que incluye, por ejemplo, el suministro y escape de aire, realizando las conexiones en la campana de flujo de aire laminar.

Se proporciona preferentemente un control de la temperatura para cada dispositivo 10 mediante una unidad de manejo de aire adecuada. La iluminación opcional del dispositivo puede ser proporcionada por luces fluorescentes adecuadas apropiadamente dispuestas alrededor del dispositivo 10, cuando sea necesario para el crecimiento celular o la producción de compuestos.

- 55 Durante cada ciclo de cultivo de cada dispositivo 10, el contenido de cada recipiente 12 correspondiente es normalmente aireado y mezclado durante aproximadamente 3 a aproximadamente 14 días, o más, bajo condiciones de temperatura controlada e iluminación. Las condiciones y la duración del cultivo se determinan según los

requisitos individuales de cada ciclo de cultivo, como el tipo de célula cultivada, producto recombinante que va a ser recolectado, concentración de inoculante y similares.

Al final del ciclo de cultivo para cada dispositivo 10, el orificio del recolector correspondiente está normalmente conectado a un entorno previamente esterilizado con conectores adecuados que son esterilizados antes y durante la conexión, como se describió con anterioridad. Seguidamente se efectúa la recolección, dejando atrás entre aproximadamente 2,5% y aproximadamente 45%, aunque normalmente entre aproximadamente 10% y aproximadamente 35% de células y/o tejido para que sirvan como inoculante para el siguiente ciclo.

Las células/tejidos y/o producto(s) celular(es) recolectados pueden ser seguidamente secados de forma opcional o extraídos, en la medida necesaria.

Otro ajuste opcional es la adición de oxígeno puro durante el procedimiento de cultivo celular, más preferentemente en el día 3 o 4 después del comienzo del procedimiento de cultivo.

Un ejemplo de un tipo de célula preferido adecuado para el cultivo en el biorreactor desechable a gran escala de la invención es la célula de zanahoria transformada descrita en la sección de ejemplos que sigue. Como se describe en la sección de ejemplos, esta célula es una célula de zanahoria transformada de *Agrobacterium tumefaciens* que expresa un gen exógeno que codifica glucocerebrosidasa humana (hGCD). En otra realización de un aspecto de la invención, el tipo de célula es *Nicotiana tabacum*. Todavía en otra realización de la invención, las células de *Nicotiana tabacum* son células BY-2. Los métodos para la transformación y expresión de genes exógenos en zanahoria y otros tipos de células, adecuadas para ser usados en los biorreactores desechables a gran escala de la presente invención, son bien conocidos en la técnica. La transformación y expresión de proteínas exógenas biológicamente activas en zanahoria y otros cultivos celulares, usando biorreactores desechables, se describe en detalle en la solicitud de patente de EE.UU n° 10/784.295 y la publicación PCT WO 2004/096978. La sección de ejemplos que sigue demuestra el uso del presente dispositivo en el cultivo de células de zanahoria anteriormente descritas y en células *Nicotiana tabacum* del tabaco. Como se muestra en el presente documento, el cultivo de células transgénicas de zanahoria y tabaco en un dispositivo de biorreactor a gran escala 10, que tiene un volumen de más de 400 litros, dio lugar a un rendimiento y pureza superiores de la proteína recombinante. Las células de zanahoria que expresan glucocerebrosidasa humana y las células de tabaco que expresan acetilcolinesterasa-R fueron cultivadas en biorreactores desechables a gran escala y a escala más pequeña y las condiciones del cultivo, rendimientos y productos se analizaron y se compararon (véanse los ejemplo 2 y 3). Los resultados muestran que el biorreactor desechable a gran escala de la presente invención proporciona una saturación de O<sub>2</sub> aumentada del medio de cultivo, a una velocidad de aireación de la entrada significativamente inferior, hasta 30% durante al menos 7 días de cultivo y una mayor eficacia del cultivo, dando lugar a un rendimiento mayor del producto de proteína recombinante. El análisis de la proteína recombinante mediante mapeo de péptidos (fig. 8), IEF (fig. 10), SDS-PAGE y análisis inmunológico (figs. 7 y 15-17) y cromatografía (figs. 6 y 9) mostraron que las preparaciones de enzimas glucocerebrosidasa y acetilcolinesterasa a partir de células recolectadas del biorreactor desechable a gran escala son iguales a las de una preparación estándar obtenida con una tecnología a gran escala, indicando fuertemente la congruencia y la identidad de las preparaciones de enzimas producidas a partir de células recolectadas de los reactores de 80 l, 400 l y 800 l. Las preparaciones de enzimas a partir del biorreactor desechable a gran escala mostraron también valores comparables, si no superiores, de la actividad catalítica y actividad específica (véase la tabla 5 y la fig. 17). Además, se mostró que la β-glucocerebrosidasa recombinante producida en biorreactores desechables a gran escala de la presente invención contiene niveles indetectables de proteínas de células hospedantes de zanahoria, no menos pura que la β-glucocerebrosidasa fabricada mediante métodos de producción a volúmenes estándares (fig. 11). Por tanto, el biorreactor desechable a gran escala de la presente invención puede proporcionar condiciones exactas, eficaces e incluso superiores para el ajuste a escala de cultivos de células vegetales que expresan proteínas recombinantes desarrolladas en volúmenes más pequeños, incluso mucho más pequeños.

## Ejemplos

Se hace referencia seguidamente a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una forma no limitativa.

Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria descriptiva y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de DNA recombinante. Estas técnicas se explican en detalle en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, las publicaciones "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías expuestas en las patentes de EE.UU. n°s 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), tercera edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edition), Appleton &

Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); inmunoensayos disponibles y descritos en profundidad en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n<sup>os</sup> 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. L., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Los presentes procedimientos se cree que son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

#### Ejemplo 1

##### Cultivo eficaz de células vegetales en un biorreactor desechable a gran escala

15 Con el fin de ensayar los parámetros de crecimiento, rendimientos y características de los cultivos y productos celulares producidos usando el biorreactor desechable a gran escala, se cultivaron células de zanahoria que expresan glucocerebrosidasa humana en los biorreactores desechables a gran escala y a escala más pequeña y se analizaron y compararon las condiciones de cultivo, rendimientos y productos analizados.

##### Materiales y métodos experimentales:

20 Transformación y cultivo de células de zanahoria que expresan GCD: La transformación y cultivo de células se efectuaron como se describe en el ejemplo 2.

25 Crecimiento de cultivos a escala elevada en un biorreactor. Se dispusieron en placas aproximadamente 1 cm (de diámetro) de callo de células de zanahoria genéticamente modificadas, que contienen el gen rh-GCD, sobre un medio de agar en una placa de 9 cm que contiene 4,4 g/l de medio MSD (Duchefa, Haarlem, Holanda), 9,9 mg/l de tiamina-HCl (Duchefa), 0,5 mg de ácido fólico (Sigma Ltd, St Louis, MO), 0,5 mg/l de biotina (Duchefa), 0,8 g/l de hidrolizado de caseína (Duchefa), 30 g/l de azúcar y hormonas 2-4 D (Sigma). El callo se hizo crecer durante 14 días a 25°C.

30 Se preparó un cultivo de suspensión celular subcultivando el callo transformado en medio líquido de MSD que contiene 0,2 mg de ácido 2,4-dicloroacético, como es bien conocido en la técnica. El cultivo de suspensión celular se cultivó seguidamente en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, comenzando con un volumen de trabajo de 25 ml y aumentando el volumen hasta 50 ml después de 7 días de tratamiento, a 25°C con una velocidad de agitación de 60 rpm. Posteriormente, el volumen del cultivo celular se aumentó hasta 300 ml en un Erlenmeyer de 1 l bajo las mismas condiciones.

35 Se efectuó un inóculo del biorreactor pequeño (10 l) [véase el documento WO 98/13469] que contenía 4 l de medio MSD añadiendo 400 ml de suspensiones celulares derivadas de dos matraces Erlenmeyer de 1 l que se cultivaron durante siete días. Después de una semana de cultivo a 25°C con 1 lpm de flujo de aire, se añadió medio MSD hasta 10 l y el cultivo se continuó bajo las mismas condiciones. Después de un cultivo adicional (cinco días), la mayor parte de las células se recolectaron y se recogieron haciendo pasar los medios celulares a través de un retículo de 80 micrómetros. El medio sobrante se escurrió y la torta de la estructura celular se almacenó a -70°C.

40 Antiespumante: Para evitar la formación de espuma, se usó una emulsión de Antifoam C medicinal (polidimetilsiloxano-PDMS, Dow Coming, Midland MI) que contenía 30% de simeticona USP, metilcelulosa, ácido sórbico y agua. El antiespumante fue añadido a los medios del biorreactor de 400 l a una concentración de 10 ppm.

45 Análisis del antiespumante: Se usó una emulsión de Antifoam C (PDMS) como un antiflatulente y un ingrediente en alimentos no estandarizados. La presencia de PDMS se evaluó según y en cumplimiento de todos los requisitos de la USP para emulsiones de dimeticona. Se introdujo una solución de 450 ml de PDMS al 0,075% en una columna de cromatografía de intercambio catiónico de 15 ml (Macro-Prep® High S Support, BioRad, Hercules, CA). Se tomaron partes alícuotas para el análisis de PDMS a partir del material introducido, circulación de flujo (materiales no unidos) y a partir de tres etapas de elución de NaCl 0,2 M, NaCl 1,2 M y etanol al 12% en NaCl 1,2 M.

50 Se recogieron muestras alícuotas del cultivo recolectado durante las diferentes etapas de cromatografía (etapas de introducción, circulación de flujo, lavado y elución) y se analizaron en cuanto a la presencia de PDMS usando un método de RP-HPLC, con una columna C4 verificada a 262 nm (absorbancia pico de la emulsión de Antifoam C).

55 SDS-PAGE: La electroforesis de gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) separa las proteínas principalmente por su peso molecular. Además, esta técnica proporciona grandes cantidades de información sobre la pureza y composición de las proteínas. La identidad del peso molecular y el modelo de impureza de proteínas de prGCD producida a partir de células recolectadas del biorreactor desechable a gran escala fueron examinados mediante análisis SDS-PAGE usando tinción con azul Coomassie Brilliant, según protocolos estándar de separación

sobre gel. Brevemente, los geles de SDS consisten en un gel acumulador (3%) y un gel de resolución (12%). El tampón de migración fue Tris/SDS, pH 8,3, el tampón de carga glicerol-tris-mercaptoetanol, pH 6,8.

5 Cromatografía líquida de alto rendimiento (presión) de fase inversa (RP-HPLC): La RP-HPLC comprende la separación de proteína intacta y otros componentes de una solución de proteínas. El tiempo de retención exacto de cada compuesto es característico y permite la determinación de la identidad y pureza de la proteína de interés. El pico característico y el tiempo de retención de la GCD recombinante vegetal (prGCD) se determinó usando una columna de fase estacionaria C-4 (Phenomenex Jupiter 5u C4 proteo 300A 4,6 x 250 mm Phenomenex, Torrance CA) con un gradiente de fase móvil de: A; 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O y B; 0,1% TFA/acetonitrilo. La detección de proteínas fue con un espectrofotómetro de matriz de diodos que detecta a dos longitudes de onda: 214 nm y 280 nm.

10 Preparación de anticuerpos monoclonales: Se puso en suspensión GCD recombinante (75 microgramos, Cerezyme® Genzyme, Cambridge, MA) en 3 ml de adyuvante completo de Freund (Difco, Voigt, Lawrence, Kansas) y se inyectó en cada uno de dos conejos, seguido de una inyección de refuerzo después dos semanas. Se extrajo sangre de los conejos aproximadamente 10 días después de la inyección de refuerzo y nuevamente a intervalos de una semana hasta que el título del anticuerpo comenzó a caer. Después de la separación del coágulo, el suero se  
15 dividió en parte alícuotas y se almacenó a -20°C.

Transferencia Western: Se realizó una transferencia Western para identificar las moléculas de GCD recombinante vegetal (prGCD) purificadas a partir de células recolectadas del biorreactor desechable a gran escala en comparación con tandas previamente fabricadas y con β-glucocerebrosidasa humana comercial (Cerezyme®, Genzyme, Cambridge, MA), usando anticuerpos anti-GCD purificados por afinidad específica. La transferencia de  
20 proteínas se realizó sustancialmente como se describe en la presente memoria descriptiva. Brevemente, la transferencia de gel a nitrocelulosa se realizó a 100 voltios durante 90 minutos a 4°C. Después de la transferencia, las membranas se incubaron en tampón bloqueante [leche seca al 1%, Tween 20 al 0,1% (Cat. n° P1379; Sigma Ltd, St Louis, MO) en tampón de fosfato]. Seguidamente las proteínas fueron inmunodetectadas mediante incubación con anticuerpo anti-GCD, se lavaron y se hicieron reaccionar con un anticuerpo secundario adecuado (como anticonejo de cabra (molécula completa) HRP (Cat. n° A-4914). Las transferencias se revelaron seguidamente con reactivos reveladores ECL (RPN 2209, Amersham, Pharmacia Biotech UK LTD) y se usó una autorradiografía para la visualización.  
25

Comparación entre producción de prGCD en diferentes biorreactores y diferentes regímenes de aireación: se hicieron crecer células recombinantes que expresan prGCD en biorreactores de volúmenes diferentes (10 l, 100 l, 300 l, 400 l) durante 4-7 días. Las células se hicieron crecer en tres biorreactores diferentes de 10 l, se sometieron a regímenes de aireación diferentes (con rociador; con una abertura de orificios de 8 mm; con oxígeno al 100% añadido desde el día 4). Se tomaron muestras de extractos en bruto (5 µl) en el día 4 o el día 7, se separaron sobre PAGE, se sometieron a transferencia sobre una membrana de transferencia de nitrocelulosa, junto con 25 ng de patrón de prGCD y se hicieron reaccionar con anticuerpo policlonal anti-GCD de conejo específico. Las bandas fueron visualizadas mediante sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology, Rockford, IL.).  
30

Oxígeno disuelto: Las tasas de oxígeno disuelto se exponen en unidades  $Kla: dC/dT = Kla(Cs-C)$ , en que  $Cs$  es el nivel de saturación de oxígeno en mg/l y  $C$  es la concentración de oxígeno real, en mg/l.  
35

Velocidad de aireación: La velocidad de aireación se define como el volumen de aire a una presión de 1 atm por volumen de líquido por minuto (volumen por volumen por minuto) a la entrada de gas y se calculó dividiendo el flujo de aire de entrada por el volumen de trabajo del biorreactor.  
40

Determinación de la velocidad de aireación óptima: Con el fin de determinar las velocidades de aireación óptimas, se efectuó una optimización para varios aumentos de volumen (desde 100 l, hasta biorreactores a gran escala de 400 y 800 l) ajustando a escala superior el flujo de aire hasta conseguir una velocidad de aireación del biorreactor de volumen inferior y alterando la velocidad de aireación hasta conseguir parámetros predeterminados óptimos. El efecto de las diferentes velocidades de aireación se ensayó sobre parámetros físicos que incluyen el nivel de formación de espuma, nivel de turbulencia del líquido, resistencia del filtro al flujo externo de aire y expansión del biorreactor. Los parámetros biológicos incluyeron la curva de crecimiento celular cultivado como se expone mediante el registro diario del peso celular de nueva aportación (g/l) para un ciclo de crecimiento (7 días) y los rendimientos de productos de proteínas a los 7 días. Se compararon 10-5 ciclos de crecimiento para conseguir la velocidad de aireación optimizada.  
45  
50

## Resultados

El cultivo en biorreactores desechables a gran escala requiere velocidades de aireación inferiores:

55 Es un axioma del cultivo celular que la aireación aumentada aumenta la velocidad de crecimiento de las células en cultivo. Los biorreactores de volúmenes más pequeños para el cultivo de células vegetales proporcionan normalmente aire a una velocidad de aireación de 0,15-0,3 vvm. Sorprendentemente, cuando la eficacia del cultivo de los biorreactores de varios volúmenes se evaluó sobre una gama de velocidades de aireación adecuadas para favorecer la circulación de aire y la distribución de oxígeno, mientras se mantenía una fuerza de cizallamiento

mínimo, se encontró que las velocidades de aireación óptimas para los biorreactores a gran escala eran proporcionalmente inferiores a las de los reactores de volúmenes más pequeños. La tabla 1 ilustra que mientras que en biorreactores de volumen inferior (hasta 100 l) un aumento del volumen requiere un aumento de las velocidades de aireación para mantener la eficacia, en biorreactores a gran escala (400 l y mayores), las velocidades de aireación óptimas disminuyen realmente con un volumen creciente del biorreactor. Esta disminución es ventajosa en cultivos a escala industrial tanto para la capacidad para disminuir las fuerzas de cizallamiento como para la mayor eficacia energética.

Tabla 1: Velocidad de aireación optimizada en biorreactores de diferentes volúmenes

| Modelo de biorreactor | Volumen de trabajo (l) | Flujo de aire de entrada (litros/minuto) | Velocidad de aireación (VVM) |
|-----------------------|------------------------|--|------------------------------|
| PX10                  | 10                     | 1,5                                      | 0,15                         |
| PX100                 | 85                     | 15                                       | 0,18                         |
| PX400                 | 350                    | 35                                       | 0,10                         |
| PX800                 | 700                    | 65                                       | 0,09                         |

El biorreactor desechable a gran escala proporciona niveles de saturación de oxígeno superiores: Las combinaciones apropiadas de los parámetros que efectúan la introducción, mezcla y evacuación de gas en el biorreactor, son cruciales para el funcionamiento eficaz del biorreactor desechable a gran escala de la presente invención. El volumen de burbujas, velocidad de aireación, presión de gas a la entrada, presión de gas en las burbujas y la trayectoria de las burbujas a través del medio de cultivo deben ser equilibrados para optimizar la aireación y mezcla, mientras se minimizan las fuerzas de cizallamiento destructivas y la turbulencia en la suspensión. Con el fin de valorar estos parámetros, se determinaron los niveles de saturación de oxígeno.

La figura 3 muestra el porcentaje de saturación de O<sub>2</sub> del medio en un biorreactor desechable a gran escala de 400 litros, en comparación con la saturación de O<sub>2</sub> en el medio que usa recipientes de reactores más pequeños (matraz Erlenmeyer, biorreactor de 10 litros y biorreactor de 100 litros) medidos en partes alícuotas muestreadas en el momento de inoculación (día 0) y a los 3, 4 y 7 días de cultivo. La presión y el flujo de aire fue de 35 l/min en el biorreactor a gran escala y de 10 l/min en los reactores de 10 y 100 litros más pequeños. La reducción en la saturación después de la inoculación, a medida que aumenta el contenido de células de la suspensión en proporción, es un fenómeno bien conocido. Sin embargo, a pesar de la reducción gradual durante 7 días, el biorreactor desechable a gran escala proporciona claramente condiciones para una saturación de O<sub>2</sub> superior del medio, sobrepasando un 30% en cualquier momento dado hasta 7 días después del inóculo.

La tabla 2 siguiente ilustra que el biorreactor de 800 litros consigue niveles de saturación de O<sub>2</sub> incluso mayores, expresados como K<sub>la</sub> (mg/l) en comparación con un biorreactor de volumen más pequeño. Esta superioridad se mantiene a través de una gama de velocidades de aireación.

Tabla 2: Concentración de oxígeno disuelto (K<sub>la</sub> en mg/l) a diferentes velocidades de aireación (vvm)-comparación entre biorreactores desechables a gran escala de 400 y 800 l.

| Biorreactor | 0,007 vvm | 0,1 vvm | 0,11 vvm |
|-------------|-----------|---------|----------|
| PX400       | 3,24      | 4,68    | 7,56     |
| PX800       | 4,68      | 7,92    | 10,08    |

El biorreactor desechable a gran escala proporciona rendimientos superiores de proteínas recombinantes: Con el fin de determinar el efecto de cultivar en el biorreactor desechable a gran escala sobre la eficacia de producción de proteína recombinante en el cultivo, se separaron extractos de suspensión de cada uno de los reactores mediante SDS-PAGE, se sometieron a transferencia y se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpo de glucocerebrosidasa (GCD) antihumana. La comparación entre el rendimiento de producto recombinante en el biorreactor desechable a gran escala de 400 l (figura 4, columnas 4-6) y los reactores de 10 l (figura 4, columnas 1-3) y 100 l (figura 4, columnas 7 y 8) muestra claramente los niveles aumentados de proteínas y el uso más eficaz del medio en el biorreactor a gran escala. De hecho, el rendimiento de GCD en el biorreactor a gran escala a los 4 y 7 días de cultivo (columnas 4, 5 y 6, respectivamente) era superior al del reactor de 10 l con orificio de entrada de gases aumentado (fig. 4, columna 2) y adición de O<sub>2</sub> a partir del día 4 (fig. 4, columna 3).

Estos resultados indican que el biorreactor desechable a gran escala de la presente invención proporciona una saturación aumentada de O<sub>2</sub> del medio de cultivo y una mayor eficacia de cultivo, dando lugar a un rendimiento superior del producto de proteína recombinante y una mayor eficacia energética.

Separación eficaz y simple de antiespumante a partir de medio de cultivo en un biorreactor desechable a gran escala: En el uso de presiones de aire superiores para la aireación del biorreactor desechable a gran escala, el

aspecto de formación de espuma del medio, que debe ser evitado por muchas razones, requiere atención. Se añadió espumante (10 ppm) a cada medio de cultivo celular cuando fue transferido al biorreactor de 400 l.

- El nivel más bajo de detección usando técnicas de laboratorio estandarizadas como HPLC y absorción atómica es de aproximadamente 7 ppm.

5 Con el fin de confirmar que la recolección y purificación de producto recombinante a partir del biorreactor desechable a gran escala es capaz de eliminar el residuo de antiespumante, se sometió un gran exceso de antiespumante de PDMS a las etapas iniciales del procedimiento de purificación y se verificó la presencia de antiespumante a lo largo de las mismas.

10 La figura 5a es un análisis por RP-HPLC del antiespumante de PDMS (0,075%) en una parte alícuota de la solución de carga de la columna de intercambio catiónico. El tiempo de retención (pico) fue de 22,531 minutos. La figura 5b muestra el antiespumante en el flujo a través de la columna (tiempo de retención 22,554 minutos), con el tamaño del pico y absorbancia a 262 nm similares al material introducido. No se detectó PDMS en muestras de ninguna de las 3 etapas de elución posteriores (NaCl 0,2 M, NaCl 1,2 M y etanol al 12% en NaCl 1,2 M). La tabla 3 indica claramente que no se retuvo PDMS en la columna:

15 Tabla 3: Resumen de rendimiento y producción de PDMS en una columna de cromatografía de intercambio catiónico

| Muestra              | Volumen de muestra (ml) | Absorbente (OD/ml) | OD total | Rendimiento de absorbente (%) | área pico de HPLC | rendimiento por HPLC (%) |
|----------------------|-------------------------|--------------------|----------|-------------------------------|-------------------|--------------------------|
| Carga                | 450                     | 0,097              | 43,65    | 100                           | 438,46            | 100                      |
| Circulación de flujo | 448                     | 0,101              | 45,24    | 103                           | 443,00            | 101                      |

Estos resultados indican claramente que un residuo antiespumante es fácilmente separado del medio y permanece por debajo de niveles detectables desde las primeras fases del procedimiento de aislamiento y purificación.

#### Ejemplo 2

20 Expresión eficaz de glucocerebrosidasa humana en suspensión de células de zanahoria usando un biorreactor desechable a gran escala

Este ejemplo proporciona una descripción de experimentos que se realizaron con células vegetales transformadas, cultivadas en el biorreactor desechable a gran escala de la presente invención, según algunas reacciones de la presente invención.

#### Materiales y métodos experimentales

25 Vectores de plásmidos: \*CE-T- se construyó a partir de plásmido CE obtenido del Prof. Galili [patente de Estados Unidos 5.367.110 de 22 de noviembre de 1994].

30 El plásmido CE fue digerido con Sall. El extremo cohesivo de Sall fue hecho un extremo romo usando el fragmento grande DNA polimerasa I. Seguidamente el plásmido fue digerido con PstI y ligado a un fragmento de DNA que codifica la señal de dirección a diana de ER del gen de endoquitinasa básica [*Arabidopsis thaliana*] ATGAAGACTAATCTTTTCTCTTTCTCATCTTTTCACTTCTCCTATCATTATCCTCGGCCGAATTC (SEQ ID n° 6) y la señal de dirección a diana vacuolar de quitinasa de Tobacco A: GATCTTTTAGTCGATACTATG (SEQ ID n° 5) digerida con SmaI y PstI.

35 \*pGREENII – obtenido del Dr. P. Mullineaux [Roger P. Hellens *et al.*, (2000) Plant Mol. Bio. 42:819-832]. La expresión del vector pGREEN II está controlada por promotor 35S del virus mosaico de coliflor, el elemento mejorador translacional omega TMV (virus mosaico del tabaco) y la secuencia terminadora de octopinasintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.

cDNA de glucocerebrosidasa humana (hGCD): Se obtuvo glucocerebrosidasa humana de la entidad ATCC (n° de acceso 65696), GC-2.2 [GCS-2kb; lambda-EZZ-gamma3 *Homo sapiens*] que contenía glucosidasa beta ácida [glucocerebrosidasa]. Longitudes de insertos (kb): 2,20; tejido: célula WI-38 de fibroblasto.

40 Construcción de plásmido de expresión de hGCD: El cDNA que codifica hGCD (número de clon de ATCC 65696) fue amplificado usando los cebadores directo 5' CAGAATTCGCCCGCCCCTGCA 3' (SEQ ID n° 3) y el inverso 5' CTCAGATCTTGGCGATGCCACA 3' (SEQ ID n° 4). El producto de PCR DNA purificado fue digerido con endonucleasas EcoRI y BglII (véanse las secuencias de reconocimientos indicadas en los cebadores) y ligada en un vector intermedio que tenía un cassette CE-T digerido con las mismas enzimas. El cassette de expresión fue cortado y eluido a partir del vector intermedio y ligado en el vector binario pGREENII usando enzimas de restricción SmaI y XbaI, formando el vector de expresión final. La resistencia a la kanamicina es conferida por el gen NPTII accionado

por el promotor nos obtenido conjuntamente con el vector pGREEN, para proporcionar un cassette de expresión.

El plásmido resultante fue secuenciado para asegurar una fusión en marco correcta de las señales usando las siguientes secuencias de cebadores: 5' 35S promotor: 5' CTCAGAAGACCAGAGGGC 3'(SEQ ID nº 1) y el terminado 3': 5' CAAAGCGGCCATCGTGC 3' (SEQ ID nº 2).

- 5 Establecimiento de callo de zanahoria y cultivos de suspensión celular: El establecimiento de callo de zanahoria y cultivos de suspensión celular se realizó como se describió previamente por Torres K.C. (Técnicas de cultivo de tejidos para cosechas hortícolas, pág. 111, 169).

10 Transformación de células de zanahoria y aislamiento de células transformadas: La transformación de células de zanahoria se efectuó mediante infiltración *Agrobacterium*, usando una adaptación un método previamente descrito [Wurtele, E.S. y Bulka, K. Plant Sci. 61:253-262 (1989)]. Las células que crecían en medios líquidos fueron usadas a través del procedimiento en lugar de los callos. Los tiempos de incubación y crecimiento fueron adaptados para la transformación de células en cultivo líquido. Brevemente, las *Agrobacteria* fueron transformadas con el vector pGREEN II mediante electroporación [den Dulk- Ra, A. y Hooykaas, P.J. Methods Mol. Biol. 55:63-72 (1995)] y seguidamente seleccionadas usando kanamicina. Las células de zanahoria fueron posteriormente transformadas con *Agrobacteria* y seleccionadas usando antibióticos de paramomicina en medios líquidos.

15 Selección de células de zanahoria transformadas para el aislamiento de callos que expresan niveles elevados de GCD: Las células fueron homogeneizadas en tampón de muestras de SDS y los extractos de proteínas resultantes fueron separados sobre SDS-PAGE [Laemmli U., (1970) Nature 227:680-685] y transferidas a una membrana nitrocelulosa (hybond C nitrocelulosa, 0,45 micrómetros, Cat. nº: RPN203C; Amersham, Pharmacia Biotech UK LTD). La transferencia Western para la detección de GCD se realizó usando anticuerpos anti-hGCD policlonales (descritos con posterioridad en la presente memoria descriptiva).

Cultivo y ajuste a escala superior de células en los biorreactores a gran escala: el cultivo de células se efectuó como se describe en detalle en el ejemplo 1 que antecede.

25 Análisis de proteínas: El análisis de la identidad y pureza de proteínas se efectuó como se describe en el ejemplo 1 con anterioridad.

Espectrometría de masas: El análisis de espectrometría de masas (MS) se realizó usando un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo/tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF) (4700, Applied Biosystems, Foster City CA) y un espectrómetro de masas de trampa de iones (LCQ classic, Finnigan, San Jose, CA).

30 Mapeo de péptidos o "identificación por huellas" de proteínas usando RP-HPLC: El mapeo de péptidos es un método para analizar péptidos que resultan de una digestión proteolítica de una proteína seguida de RP-HPLC para proporcionar una separación de alta resolución de sea reproducible con un perfil distinto denominado "identificación por huellas". Como un método de identificación altamente específico, este análisis sirve para confirmar la identidad de la preparación de enzimas producida en el procedimiento de producción estándar y a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l (PX-400-GC-2; dentro de los límites de la técnica). Se digirió prGCD con tripsina incubando a 1:50 p/p con tripsina en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM (pH 8,0) durante 6 horas a 37°C seguido de incubación durante una noche a temperatura ambiente.

35 Para el análisis de RP-HPLC, se introdujeron 50 µg de péptido digerido en la columna C-18 (columna: Phenomenex Jupiter 4u proteo 90A 4,6 x 250 mm, Phenomenex, Torrance CA) y los péptidos se separaron y se detectaron como se describió con anterioridad.

40 IEF: El isoelectroenfoco (IEF) es una técnica que separa proteínas sobre la base de su carga en un campo eléctrico. El IEF es empleado como una herramienta de identificación y para asegurar la homogeneidad de una proteína como se demuestra mediante un modelo con el intervalo de pI correcto. El isoelectroenfoco de la prGCD y Cerezyme® se llevó a cabo según el protocolo estándar. Brevemente, para identificar el punto isoeléctrico (pI) de prGCD, la enzima purificada se hizo correr sobre el gel de IEF de poliacrilamida previamente extendido en el intervalo de pH 3-10 (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA) usando tampones designados del ánodo y del cátodo y patrones de pI (Amersham Pharmacia Biotech UK LTD). A cada muestra de prGCD y Cerezyme®, se añadió ácido taurocólico al 0,05% (detergente aniónico ligero) para mejorar la movilidad en el gel.

45 El modelo de formación de bandas de las proteínas prFCD y Cerezyme® se visualizó mediante tinción con Bio-Safe® Coomassie (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA) siguiendo las directrices del fabricante. El pI de cada banda de proteína se estimó usando los patrones de proteínas del estuche de calibración de IEF High Rang pI 5-10.5 (Amersham Pharmacia Biotech UK LTD). Análogamente se determinó el perfil de formación de bandas del prGCDy Cerezyme® comercialmente producido. El modelo de formación de bandas prGCD se examinó también una congruencia de una tanda a otra.

50 Ensayo de actividad enzimática: La β-glucocerebrosidasa cataliza la hidrólisis del glicolípido glucocerebrosidasa a glucosa y ceramida. Para valorar la actividad catalítica de la glucocerebrosidasa recombinante, se emplea un ensayo

enzimático usando un sustrato sintético para la evaluación de cada tanda. Una unidad de enzimas se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de un micromol del sustrato sintético para-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNP-Glc) por minuto a 37°C.

#### Resultados

- 5 Caracterización de glucocerebrosidasa recombinante a partir de un biorreactor desechable a gran escala: Con el fin de determinar el carácter óptimo de las condiciones de cultivo mejoradas suministradas por el biorreactor desechable a gran escala, y con el fin de ensayar la fiabilidad y carácter reproducible estas condiciones, se compararon las características moleculares y físico-químicas del producto recombinante, producido en biorreactores desechables a gran escala, con preparaciones producidas en biorreactores a escala más pequeña.
- 10 Peso molecular de glucocerebrosidasa determinado mediante espectrometría de masas: Se efectuó un análisis de espectrometría de masas para determinar la masa de la proteína sin necesidad de patrones de proteínas. Se usaron dos métodos de espectrometría de masas para determinar el peso molecular de enzima producida a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l, y esto se comparó con la glucocerebrosidasa producida en reactores a escala más pequeña. Todas las preparaciones de enzimas fueron aisladas y purificadas de la misma manera.
- 15 La tabla 4 siguiente resume el peso molecular de diversas tandas de enzimas obtenidas mediante dos instrumentos, LCQ classic y MALDI-TOF. Las tandas de prGCD producidas a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l están indicadas mediante PX400-GC.

Tabla 4. Peso molecular prGCD diferentes producidas a partir de tandas diferentes

| Biorreactor | Tanda de enzimas nº | Peso molecular (D)<br>(LCQ classic) | Peso molecular (D)<br>(MALDI-TOF) |
|-------------|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 80 l        | PLX-GC-016-0505-DS  | 60.877                              | 60.954                            |
| 80 l        | PLX-GC-016-Fenilo   | 60.884                              | 60.923                            |
| 80 l        | PLX-GC-017-0705-DS  | 60.865                              | 60.524                            |
| 80 l        | PLX-GC-017-Fenilo   | 60.869                              | 60.586                            |
| 400 l       | PX-400-GC-1         | 60.593                              | 60.712                            |
| 400 l       | PX-400-GC-2         | 60.869                              | 60.819                            |

- 20 Los resultados de las espectrometrías de masas muestran que la estimación del peso molecular de la proteína en todas las preparaciones se aproxima rutinariamente a 60800 Dalton y permanece congruente entre las tandas producidas a partir de células cultivadas del biorreactor de 400 l y de biorreactores de 80 l. Este peso molecular es congruente con un polipéptido glicosilado que tiene 506 aminoácidos que contribuyen a 56.642,6 Dalton y la adición de las estructuras de glicano que contribuyen a los 4.158 Dalton restantes (aproximadamente 7%).

- 25 Identificación, determinación del peso molecular y pureza mediante SDS-PAGE y análisis de transferencia Western: La identidad del peso molecular y el modelo de impureza de proteínas de la glucocerebrosidasa producida a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l se examinaron mediante análisis SDS-PAGE usando tinción con azul Coomassie Brilliant.

- 30 La figura 6 muestra el SDS-PAGE con tinción de azul Coomassie Brilliant de una preparación de enzimas estándar (PLX-GC-016-0505-DS), Cerezyme y glucocerebrosidasa producida a partir de células recolectadas del biorreactor desechable a gran escala de 400 l (PLX-400-GC-2).

- 35 La figura 6 establece adicionalmente que la prGCD de células cultivadas en el biorreactor a gran escala muestra propiedades próximas a idénticas a la GCD producida en otros métodos. La migración de la proteína fue similar, con un peso molecular estimado de 60,9 kD. Además, el modelo de bandas de proteínas es igual entre las tandas del biorreactor estándar y de 400 l, indicando la ausencia de evidencia de impurezas de proteínas en la enzima producida a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l.

- 40 La inmunodetección de las proteínas separadas SDS-PAGE (transferencia Western) con anticuerpo antiglucocerebrosidasa se realizó para identificar las moléculas de  $\beta$ -glucocerebrosidasa purificadas a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l en comparación con tandas previamente fabricadas y con  $\beta$ -glucocerebrosidasa humana comercial (Cerezyme®, Genzyme) usando anticuerpos anti- $\beta$ -glucocerebrosidasa purificados por afinidad específica.

La figura 7 muestra análisis de transferencia Western usando anticuerpos anti- $\beta$ -glucocerebrosidasa de conejo específicos para la detección de  $\beta$ -glucocerebrosidasa estándar (PLX-GC-016-0505 DS), Cerezyme® y la proteína producida a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l (PX-400-GC-2). Las bandas de proteínas identificadas por el anticuerpo específico son iguales entre las tandas de los procedimientos de biorreactores



estándar y de 400 l. Este análisis pone de manifiesto que no hay bandas degradadas adicionales en la proteína de enzima producida a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l.

Por tanto, según un análisis SDS-PAGE e inmunológico, no hay evidencia que indique diferencias en la identidad y pureza entre la enzima producida a partir de células recolectadas del biorreactor estándar (80 l) y el de 400 l.

- 5 Mapeo de péptidos o “detección por huellas” de proteínas usando cromatografía líquida de alta resolución (presión) de fase inversa (RP-HPLC): Con el fin de confirmar la identidad de la preparación de enzimas producidas en el procedimiento de producción estándar (80 l) y a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l (PX-400-GC-2), la detección de huellas de proteínas se realizó sobre prGCD producida a partir de células recolectadas de biorreactores de 80 y 400 l.
- 10 Las figuras 8a y 8b muestran un perfil típico del mapa triptico de glucocerebrosidasa comercial (PLX-GC-016-0505 DS) realizado sobre la columna de cromatografía C-18. La figura 8a muestra los péptidos separados verificados a 214 nm (enlaces péptidos) y la figura 8b muestra los péptidos separados verificados a 280 nm (triptófano y tirosina). Las figuras 8c y 8d representan el mapa triptico de glucocerebrosidasa preparada a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l (PX-400-GC-2) verificado a 214 nm (figura 8c) y 280 nm (figura 8d).
- 15 Por tanto, el mapa de péptidos de las preparaciones de enzimas de glucocerebrosidasa a partir de células recolectadas del biorreactor desechable a gran escala es igual al de una preparación estándar obtenida con tecnología a escala estándar, indicando con fuerza la congruencia e identidad de las preparaciones de enzimas producidas a partir de células recolectadas del biorreactor de 80 l y 400 l.
- 20 Cromatografía líquida de alta resolución (presión) inversa (RP- HPLC): La caracterización adicional de las proteínas producidas mediante células cultivadas en el biorreactor a gran escala de 400 l se efectuó mediante RP-HPLC.
- Las figuras 9a y 9b representan cromatogramas a 214 nm (9a) y 280 nm (9b) de glucocerebrosidasa purificada a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l (PX-400-GC-2). En el cromatograma de proteína de enzima producida en el biorreactor desechable a gran escala, la enzima aparece como un pico intacto con un tiempo de retención de 64,12 minutos, similar al tiempo de reacción de enzima de glucocerebrosidasa previamente preparada, 64,70 minutos.
- 25 Por tanto, bajo condiciones cromatográficas estándar, la glucocerebrosidasa recombinante producida mediante el biorreactor desechable a gran escala y a escala estándar eluida a un tiempo de retención similar y congruente. La apariencia del pico intacto es congruente con los resultados obtenidos a partir de análisis realizados en tandas anteriores de preparaciones enzimáticas. El modelo y el tamaño de los picos de impurezas insignificantes son similares a un patrón de glucocerebrosidasa y el nivel de impurezas está dentro de las especificaciones requeridas.
- 30 Isoelectroenfoco (IEF): Con el fin de identificar adicionalmente y de asegurar la homogeneidad de la proteína recombinante producida mediante células cultivadas en el biorreactor a gran escala de la presente invención, se determinó el intervalo de pI del perfil de unión de glucocerebrosidasa a partir de células cultivadas del biorreactor de 400 l a gran escala (PX-400-GC-2) y a partir de células recolectadas de preparaciones del reactor estándar de 80 l (PLX- GC-016-0505 DS).
- 35 La figura 10 muestra el modelo de bandas del pI, visualizado mediante tinción con azul Coomassie brilliant, de muestras de enzimas a partir de preparaciones del biorreactor de volumen estándar (PLX-GC-016-0505 DS) y a partir de células recolectadas a partir del biorreactor de 400 l (PX-400-GC-2) en diferentes fases de purificación (después de la 3ª, 4ª y 5ª columna de purificación, indicadas mediante C-3, C-4 y C-5, respectivamente).
- 40 El perfil de la enzima producida mediante el biorreactor de volumen estándar y a partir de células cultivadas del biorreactor de 400 l es igual tanto en número como en bandas al modelo y la intensidad de cada banda análoga. Por tanto, los modelos de isoformas de IEF de la enzima producida en el biorreactor desechable a gran escala y las preparaciones anteriormente producidas son iguales.
- 45 Ensayo de actividad enzimática: Para valorar la actividad enzimática de la glucocerebrosidasa recombinante, producida en el biorreactor a gran escala, se empleó un ensayo enzimático usando el sustrato sintético β-D-glucopiranosido (pNP-Glc). La tabla 5 resume la actividad específica de glucocerebrosidasa producida a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l (indicado mediante PX-400-GC) y mediante reactores de volumen estándar.

Tabla 5: Actividad específica de tandas de glucocerebrosidasa recombinante

| Volumen del Biorreactor | Tanda de enzimas nº | Actividad específica (unidades/mg) |
|-------------------------|---------------------|------------------------------------|
| 80 l                    | PLX-GC-016-0505-DS  | 41,53                              |
| 80 l                    | PLX-GC-016-fenilo   | 36,57                              |

| Volumen del Biorreactor | Tanda de enzimas nº | Actividad específica (unidades/mg) |
|-------------------------|---------------------|------------------------------------|
| 80 l                    | PLX-GC-017-0705-DS  | 33,04                              |
| 80 l                    | PLX-GC-017-fenilo   | 34,26                              |
| 400 l                   | PX-400-GC-1         | 33,30                              |
| 400 l                   | PX-400-GC-2         | 36,30                              |

Por tanto, la actividad específica de la enzima producida a partir de células cultivadas del biorreactor de 400 l está en el intervalo de la producida en una producción a escala estándar. Además, cuando se configuran los parámetros de crecimiento de tres lotes de prGCD que expresan crecimiento de cultivos en el biorreactor de 800 litros con valores de cultivos crecidos en biorreactores de 400 litros, como se muestra la tabla 6 siguiente, los parámetros de conductividad, osmolaridad y rendimiento (células y proteínas) estaban dentro del mismo intervalo que para los cultivos en los dos biorreactores desechables a gran escala.

Tabla 6. Parámetros de crecimiento de producción de cultivo de células que expresan prGCD en biorreactores de 400 y 800 l

| Parámetro  | Análisis de tanda de 400 l |       |       | Análisis de tanda de 800 l |       |       |
|--|----------------------------|-------|-------|----------------------------|-------|-------|
|  | 31106                      | 10107 | 20307 | 31106                      | 10107 | 20307 |
| pH   | 5,2                        | 5,1   | 5,1   | 5,0                        | 4,9   | 4,9   |
| Conductividad (m/cm)   | 5,7                        | 5,6   | 5,3   | 5,5                        | 5,7   | 5,2   |
| Osmolaridad (mOsm/kgH <sub>2</sub> O)                          | 279                        | 282   | 294   | 270                        | 282   | 275   |
| Peso fresco (g células/litro)                                  | 55,0                       | 48,0  | 56,3  | 54,4                       | 50,3  | 55,0  |
| Concentración de prGCD en el punto final (mg prGCD/kg células) | 3,3                        | 5,4   | 7,8   | 1,8                        | 1,9   | 7,4   |

La  $\beta$ -glucocerebrosidasa a partir del biorreactor desechable a gran escala está exenta de proteínas de células hospedantes: Para detección de proteínas de células hospedantes de zanahoria (CHP), se desarrolló un inmunoensayo sensible capaz de detectar una amplia gama de impurezas de proteínas. Para este ensayo, se generó un anticuerpo policlonal mediante inmunización con una preparación de proteínas producida a partir de células de zanahoria no transformadas (células de zanahorias que no albergan el constructo de  $\beta$ -glucocerebrosidasa). Estos anticuerpos policlonales fueron adicionalmente separados para proporcionar la unión específica al núcleo de polipéptidos de las proteínas y no los restos/residuos de azúcares, para evitar la reacción cruzada con azúcares unidos a la  $\beta$ -glucocerebrosidasa recombinante.

La preparación de proteínas hospedantes de zanahoria (CHP) se usa como un patrón de referencia para impurezas de proteínas relacionadas con la hospedante y como un antígeno para la preparación de los anticuerpos policlonales usadas para el inmunoensayo.

La figura 11 muestra la reactividad del anticuerpo antihospedante específico para las muestras de proteínas hospedantes y tandas de  $\beta$ -glucocerebrosidasa analizadas mediante análisis de SDS-PAGE y de transferencia Western con anticuerpos de proteínas hospedantes de células antizanahoria específicas. Se analizaron tandas de  $\beta$ -glucocerebrosidasa (PLX-GC-016-0505 DS) a partir de biorreactores de volumen estándar y tandas de  $\beta$ -glucocerebrosidasa producidas a partir de células recolectadas del biorreactor de 400 l (PX- 400-GC-2) así como muestras del extracto de proteínas hospedantes de zanahoria. Se identifican cuatro bandas de proteínas principales en las muestras de proteína estándar de célula de zanahoria (fig. 11, columnas 7 y 8), sin embargo, ninguna de las bandas de proteínas CHP correspondientes son detectadas en cualquiera de las muestras de  $\beta$ -glucocerebrosidasa, indicando que la  $\beta$ -glucocerebrosidasa recombinante producida en biorreactores desechables a gran escala de la presente invención contiene niveles indetectables de proteínas de células hospedantes de zanahoria, no menos pura que la  $\beta$ -glucocerebrosidasa fabricada mediante los métodos de producción a volumen estándar.

### Ejemplo 3

Expresión eficaz de acetilcolinesterasa humana en suspensión de células BY-2 usando un biorreactor desechable a gran escala

Este ejemplo proporciona una descripción de experimentos que se realizaron con células *Nicotiana tabaccum* BY-2 con acetilcolinesterasa humana, cultivadas en un biorreactor desechable a gran escala según una realización de la presente invención.

## Materiales y métodos experimentales

- 5 cDNA: La variante "leída atentamente" de acetilcolinesterasa humana que codifica cDNA (AChE-R) insertada se obtuvo del Dr. Hermona Soreq, The Hebrew University of Jerusalem, Israel (Yissum Technology Transfer Company of the Hebrew University of Jerusalem, número pTM240). La secuencia de este gen fue optimizada para vegetales e incluye la secuencia líder nativa en el ER (33 aminoácidos en el N-terminal, SEQ ID n° 7, degradado en la proteína madura) y la secuencia de retención ER (SEKDEL; SEQ ID n° 8) fusionada al C-terminal del gen recombinante (SEQ ID n° 9).
- 10 Construcción de plásmido de expresión de acetilcolinesterasa. El plásmido pBluescript SK+ (Cat. n° 212205, Stratagene, La Jolla, CA) se usó como la estructura principal para la construcción del cassette de expresión vegetal. El cassette de expresión vegetal con los elementos necesarios requeridos para una expresión a nivel elevado fue construido en el plásmido pBluescript SK+. Este cassette de expresión (CE) incluye el promotor CaMV35S, mejorador translacional Omega, la terminación de transcripción y señal de poliadenilación del gen de octopinasintasa *Agrobacterium tumefaciens* (cassette CE).
- 15 AChE-R subclonada en el vector de expresión Bluescript® que contiene el cassette de expresión, mediante amplificación PCR de AChE-R usando cebadores que contienen sitios de restricción Sal I y PstI, expuesto en subrayado con negrita (cebador directo: 5'-CGGCGT**CTGCAC**ACAAGAGGCCTCCACAAT-3' (SEQ ID n° 10); cebador inverso: 5'-CCCC**CTGCAG**CTAGAGTTCATCCTTCTC-3' (SEQ ID n° 11). El cassette de expresión con la frecuencia que codifica AChE-R fue seguidamente separado del vector intermedio y adicionalmente subclonado usando NotI y Acc651 en el vector binario pGREENII nos-Kana (Hellens *et al.*, 2000), como se describe en la presente memoria
- 20 descriptiva. Se seleccionaron clones positivos usando análisis PCR y de restricción.
- Transformación, selección y cultivo de células BY-2 que expresan AChE-R: La transformación de *Agrobacterium* previa a la infiltración de células BY2 se realizó como se describió anteriormente (den Dulk-Ras and Hooykaas, 1995). La resistencia a kanamicina, conferida por el gen NPTII accionado por el promotor nos obtenida conjuntamente con el vector pGREEN se usó para la depuración y selección de transformantes.
- 25 La infiltración con *Agrobacterium* de células *Nicotiana tabaccum* genéticamente modificadas (línea BY2) y el posterior cultivo se efectuó esencialmente como se describe para la transformación de células de zanahoria en el ejemplo 2 anterior. La selección de callos que expresan niveles elevados de AChE-R se efectuó con el ensayo de actividad catalítica de Elman y transferencia Western, descritos en la presente memoria descriptiva. Los cultivos de suspensiones celulares de células seleccionadas se mantuvieron en forma de suspensiones de 50 ml en Erlenmeyers de 250 ml, en condiciones de agitación constante y temperatura controlada,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  en un agitador
- 30 orbital (80 rpm). El procedimiento de producción incluía una fase de crecimiento en medio que contiene los antibióticos paromomicina y cefotaxima como agentes selectivos.
- Ajuste a escala de medio de cultivo en un biorreactor: El ajuste a escala del cultivo a 10 l se hizo gradualmente. En primer lugar se introdujo un inóculo de 200-400 ml de suspensión celular en un biorreactor de 12 l que contenía 3,6-9,8 l de medio. Después de 7 días de cultivo ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 1,5 lpm de aire esterilizado), se añadió medio hasta 10 l y se continuó el cultivo bajo las mismas condiciones durante otros 7 días. El biorreactor de 400 l se inoculó con 10 l de células en suspensión y posteriormente se rellenó gradualmente con medio hasta 350 l, continuando el cultivo bajo las mismas condiciones.
- 35 Se añadió antiespumante (10 ppm) al medio de crecimiento celular cuando se transfirió a los 400 l. El antiespumante usado es emulsión medicinal de Antifoam C (polidimetilsiloxano-PDMS) como se describe en la presente memoria descriptiva.
- 40 Transferencia Western: La transferencia Western se efectuó con un anticuerpo policlonal de cabra purificado por afinidad surgido frente a péptido en el N terminal de AChE de origen humano (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). El N terminal es igual en todas las formas de AChE, por tanto, este anticuerpo puede reconocer también AChE-R. La detección se realizó con un estuche de ensayo de detección ECL (Pierce).
- 45 Se realizó el análisis SDS-PAGE bajo condiciones estándar. Se analizaron AChE-S y AChE-R sobre SDS-PAGE al 10%. La electroforesis se realiza usando un aparato de electroforesis vertical de células Criterion® (Bio-Rad Laboratories) con tampón de corrimiento de tris-glicina-SDS de electroforesis previamente mezclado (Bio-Rad Laboratories). Se prepararon geles de acrilamida al 10% usando soluciones previamente mezcladas de 40% acrilamida/bis y solución de SDS al 10%. La transferencia de proteínas desde los geles de bis-acrilamida a la membrana de nitrocelulosa se realizó usando un sistema de transferencia en seco de iBlot® (Invitrogen), usando el plano preparado P3 de transferencia. La transferencia se realizó a temperatura ambiente durante 8 minutos. Después de la transferencia de proteínas a la membrana, la membrana se bloqueó, se lavó, se unió al anticuerpo primario y secundario usando el estuche de ensayo Western completo One-step® (GenScript Corporation). Se
- 50 añadió anticuerpo primario (N-19; Santa Cruz, CA) a la solución de trabajo One-step® (GenScript) en diluciones de 1:200. La detección se realizó con el estuche de ensayo de detección ECL (Pierce). La inmunorreactividad de AChE-R se comparó con la del recombinante humano comercial AChE-S (Sigma). Las bandas se detectaron usando el sistema Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories).
- 55

Tinción de gel fluorescente Flamingo®: La tinción con gel fluorescente Flamingo® (Bio-Rad Laboratories) es un método de tinción de proteínas no específicas altamente sensible. Se introdujo AChE-R (tanda 9-11) a diversas concentraciones (50, 100 y 200 ng/muestra) en comparación con AChE-S recombinante humana comercial (Sigma). Las muestras se analizaron en SDS-PAGE al 10% bajo un procedimiento estándar como se describe en la presente memoria descriptiva y se tiñeron con tinción de gel fluorescente Flamingo®, según las instrucciones del fabricante.

Ensayo Ellman: El reactivo de Ellman se usa para la modificación de tioles libres en proteínas (Ellman, *et al.* 1961). Forma rápidamente un enlace disulfuro con el tiol y libera un ion tiolato, que tiene un color característico, que puede ser medido a 405 nm. El ensayo de Ellman se efectuó para medir la actividad AChE-R y la concentración de enzima activa en muestras de homogenato en bruto, así como para determinar la concentración de enzima activa en muestras purificadas. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de un micromol del sustrato sintético yoduro de acetiltiocolina [yoduro-acetato de (2-mercaptoetil)-trimetilamonio] a yoduro de 2-mercaptoetil-trimetilamonio y ácido acético por minuto a temperatura ambiente y pH=7,4. La actividad catalítica de AChE-R se determinó usando yoduro de acetiltiocolina (Sigma, St Louis MO) como sustrato. Las muestras se examinaron en cuanto a la actividad catalítica de AChE a concentraciones de aproximadamente 60 ng/ml (muestra purificada) o 50-100 ng/ml (homogenato en bruto) y se disolvieron en un tampón de fosfato (0,1 M; pH=7,4; 0,025% de BSA) siguiendo el método espectrofotométrico desarrollado por Ellman *et al.* (1961). En este método, se mezclaron AChE, yoduro de acetiltiocolina (20 mM) y reactivo de Ellman DTNB [5-5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoato); 9 mM; Sigma] y la hidrólisis se verificó espectrofotométricamente midiendo la densidad óptica a 405 nm a intervalos de 2 minutos durante 20 minutos. Los testigos negativos contenían todos los componentes excepto el extracto ensayado. Los resultados se representaron gráficamente frente al tiempo y las velocidades iniciales se calcularon a partir de la pendiente de la parte lineal del gráfico.

La actividad unitaria de cada preparación de AChE se calcula usando la siguiente ecuación:

$$Unidad/ml = \frac{\text{pendiente}_{AChE} \left( \frac{\Delta OD}{\text{min}} \right)}{13,600 \left( \frac{1}{MXcm} \right) \times 0,5 \text{ cm}} \times 1000 (\mu\text{mol}) \times F(\text{Dilución})$$

Reactivo de Ellman usando un inhibidor de AChE específico-DEPQ: El DEPQ [metilsulfato de 7-(0,0-dietil-fosfiniloxi)-1-metilquinolinio] es un potente inhibidor no reversible de AChE y es usado para verificar su actividad. La titulación de sitios activos de soluciones de enzimas se realizó en presencia de tampón de fosfato (0,1 M; pH=7,4; BSA al 0,025%) añadiendo diversas cantidades de DEPQ (0,2-0,8 nM). La actividad se midió el ensayo de Ellman como se describió anteriormente. El porcentaje de inhibición se representó gráficamente frente a la concentración de inhibidor. El DEPQ reacciona en una relación 1:1 con AChE-R. Estos valores se usaron para determinar la concentración de AChE-R, expresada en  $\mu\text{M}$ .

Actividad de colinesterasa usando tinción de Karnovsky: La tinción de la actividad de colinesterasa de Karnovsky y Roots (Karnovsky y Roots, 1964) es un método específico usado para detectar visualmente la actividad colinesterasa (AChE y BChE). Este método utiliza ésteres de tiocolina como sustratos y está basado en la reducción de ferrocianuro a ferrocianuro mediante tiocolina liberada por la actividad de colinesterasa. El ferrocianuro formado es capturado por cobre para formar ferrocianuro de cobre, que seguidamente es visualizado a simple vista.

PAGE nativa (no desnaturizante): La electroforesis de gel de poliacrilamida nativa (PAGE) es usada para proteínas que varían en el intervalo de tamaño de 5 a 2.000 kDa debido al tamaño de poros uniforme proporcionado por el gel poliacrilamida. Al contrario que SDS-PAGE, la electroforesis de gel nativo no usa un agente desnaturizante introducido. Las moléculas que están siendo separadas, por lo tanto, difieren en peso molecular y carga intrínseca. Como las proteínas permanecen en el estado nativo a lo largo de la separación pueden ser detectadas no solamente por reactivos de tinción de proteínas generales sino también por reactivos que emplean propiedades catalíticas específicas de la enzima.

## Resultados

Perfil de AChE-R recombinante: La proteína AChE-R recombinante producida mediante los métodos de la presente invención tiene un peso molecular estimado de 64 kDa, como se muestra en la figura 15 (columnas 1-3). La AChE-S testigo (columnas 5-7), un tetrámero bajo condiciones neutras, se redujo en la SDS-PAGE hasta sus monómeros y, por tanto, migraron análogamente a AChE-R, ya que el monómero de AChE-S es de aproximadamente 70 kDa, 6 kDa más pesado que la AChE-R. Por tanto, la AChE-R expresada en células de tabaco BY2 en el biorreactor desechable a gran escala tiene una estructura tridimensional similar (determinada mediante movilidad electroforética) a la AChE-S humana recombinante expresada en células HEK 293 (Sigma) en su forma monómera.

La tinción no específica con Flamingo® verifica adicionalmente el perfil de migración de AChE-R expresado en

vegetales, ya que las bandas detectadas exhiben el mismo modelo de migración que se detectó mediante inmunoensayo usando anticuerpos anti-AChE (figura 16). Además, la banda de tinción única observada en el gel, como se muestra en la figura 16, indica una eficacia significativa de purificación de la proteína de enzima expresada en vegetales.

- 5 Actividad de AChE-R recombinante: La figura 17 muestra la identidad catalítica de la AChE-R expresada en vegetales en polipéptidos de AChE-S expresados en células de mamíferos, usando tinción de Karnovsky. Se introdujeron en el gel 50 ng (columnas 3 y 6), 100 ng (columnas 2 y 5) y 200 ng (columnas 1 y 4) de AChE-R. La actividad era evidente en la totalidad de las tres introducciones, confirmando la actividad de la AChE-R purificada a partir de células BY-2 recolectadas del biorreactor a gran escala de la presente invención. La AChE-S recombinante humana comercial aparece en forma de tetrámero (véase la flecha superior), por lo que la migración es más lenta que la de los monómeros de AChE-R (flecha inferior) y retuvo su actividad. La banda menos pronunciada detectada en las columnas 4-6, que migra de forma idéntica a la de los monómeros de AChE-R (columnas 1-3) indica que los monómeros de AChE-S expresados en vegetales no solo son idénticos en tamaño, sino también catalíticamente activos con la AChE-S recombinante humana comercial.
- 10
- 15 La tabla 7 muestra una comparación de la actividad de AChE-R expresada en vegetales y la concentración en tandas producidas en biorreactores de pequeño volumen y las producidas en el biorreactor desechable a gran escala según una realización de la presente invención, al ser ensayadas mediante un ensayo de actividad de Ellman usando inhibición de DEPQ. La tabla 7 muestra claramente los rendimientos significativamente aumentados de proteína de AChE (expresados como mg de proteína/ kg de células) en el dispositivo de cultivo a gran escala, sin reducción en el intervalo de actividad enzimática.
- 20

|                               | U = 1 nmol<br>(Ellman) | Rendimiento (mg de proteína/ kg<br>de células en peso en húmedo) | ng/ml |
|-------------------------------|------------------------|--|-------|
| Biorreactor de 10 l (tanda 6) | 429,6                  | 0,38   | 2,2   |
| Biorreactor de 10 l (tanda 7) | 489,3                  | 0,48   | 1,8   |
| 400 l (tanda 8)               | 535                    | 0,68   | 1,62  |
| 400 l (tandas 9-11)           | 564                    | 0,66   | 1,16  |

- Por tanto, al tomar conjuntamente estos resultados quedan adicionalmente apoyadas las ventajas significativas de cultivar células vegetales transgénicas en el biorreactor desechable a gran escala según algunas realizaciones de la presente invención, para una expresión exacta y altamente eficaz y el tratamiento post-translacional de proteínas recombinantes, mientras se evitan muchas de las desventajas de los sistemas de expresión de volúmenes más pequeños y basados en animales.
- 25

#### Referencias

- Ma, J. K. C, Drake, P.M. W., y Christou, P. (2003) Nature reviews 4, 794-805
- Solicitud de patente de EE.UU. nº 2005/0282269 de Proulx *et al.*
- Solicitud de patente de EE.UU. nº 2005/0272146 de Hodge *et al.*
- 30 Patente de EE.UU. nº 6.432.698 de Gaugler *et al.*
- Schlatmann et al, Biotech. Bioeng., 1995; 45:435-39
- Namdev y Dulop, App. Biochem and Biotech, Part A, Frontiers in Bioprocessing, 1995

**Listado de Secuencias**

- <110> Protalix Ltd. Shaaltiel, Yoseph Kirshner, Yair Shtainiz, Alon Naos, Yaron Shneor, Yftach
- <120> Biorreactor desechable a gran escala
- <130> 43908
- 5 <150> US 60/924.273  
<151> 07-05-2007
- <160> 11
- <170> PatentIn versión 3.5
- 10 <210> 1  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Nucleótido de DNA monocatenario
- 15 <400> 1
- ctcagaagac cagagggc 18
- <210> 2  
<211> 17  
<212> DNA
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> Nucleótido de DNA monocatenario
- <400> 2  
caaagcggcc atcgtgc 17
- 25 <210> 3  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial
- <220>
- 30 <223> Oligonucleótido de DNA monocatenario
- <400> 3
- cagaattcgc ccgcccctgc a 21
- <210> 4  
<211> 22
- 35 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> Oligonucleótido de DNA monocatenario
- <400> 4
- 40 ctcagatctt ggcgatgccca ca 22
- <210> 5  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>  
<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido señal de dirección a diana vacuolar derivado de

ES 2 660 667 T3

quitinasa de Tobacco A

<400> 5

gatcttttag tcgatactat g 21

5 <210> 6  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido señal ER derivado del gen de endoquitinasa básica Arabidopsis

<400> 6

atgaagacta atctttttct ctttctcatc ttttcacttc tcctatcatt atcctcggcc 60

gaattc 66

15 <210> 7  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia líder de acetilcolinesterasa en el ER

<400> 7

Met Arg Pro Pro Gln Cys Leu Leu His Thr Pro Ser Leu Ala Ser Pro  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Gly Gly Gly Val Gly Ala Glu  
 20 25 30

20 Gly

<210> 8  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> señal de retención de ER

<400> 8

Ser Glu Lys Asp Glu Leu  
 1 5

30 <210> 9  
 <211> 606  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Una proteína recombinante consiste en la secuencia líder nativa en el ER fusionada a la variante "leída atentamente" de acetilcolinesterasa (AChE-R) y la secuencia de retención ER

<400> 9

ES 2 660 667 T3

Met Arg Pro Pro Gln Cys Leu Leu His Thr Pro Ser Leu Ala Ser Pro  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Gly Gly Gly Val Gly Ala Glu  
20 25 30

Gly Arg Glu Asp Ala Glu Leu Leu Val Thr Val Arg Gly Gly Arg Leu  
35 40 45



ES 2 660 667 T3

Arg Gly Ile Arg Leu Lys Thr Pro Gly Gly Pro Val Ser Ala Phe Leu  
50 55 60

Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro Met Gly Pro Arg Arg Phe Leu Pro  
65 70 75 80

Pro Glu Pro Lys Gln Pro Trp Ser Gly Val Val Asp Ala Thr Thr Phe  
85 90 95

Gln Ser Val Cys Tyr Gln Tyr Val Asp Thr Leu Tyr Pro Gly Phe Glu  
100 105 110

Gly Thr Glu Met Trp Asn Pro Asn Arg Glu Leu Ser Glu Asp Cys Leu  
115 120 125

Tyr Leu Asn Val Trp Thr Pro Tyr Pro Arg Pro Thr Ser Pro Thr Pro  
130 135 140

Val Leu Val Trp Ile Tyr Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Gly Ala Ser Ser  
145 150 155 160

Leu Asp Val Tyr Asp Gly Arg Phe Leu Val Gln Ala Glu Arg Thr Val  
165 170 175

Leu Val Ser Met Asn Tyr Arg Val Gly Ala Phe Gly Phe Leu Ala Leu  
180 185 190

Pro Gly Ser Arg Glu Ala Pro Gly Asn Val Gly Leu Leu Asp Gln Arg  
195 200 205

Leu Ala Leu Gln Trp Val Gln Glu Asn Val Ala Ala Phe Gly Gly Asp  
210 215 220

Pro Thr Ser Val Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ala Ser Val  
225 230 235 240

Gly Met His Leu Leu Ser Pro Pro Ser Arg Gly Leu Phe His Arg Ala  
245 250 255

Val Leu Gln Ser Gly Ala Pro Asn Gly Pro Trp Ala Thr Val Gly Met  
260 265 270

Gly Glu Ala Arg Arg Arg Ala Thr Gln Leu Ala His Leu Val Gly Cys  
275 280 285

Pro Pro Gly Gly Thr Gly Gly Asn Asp Thr Glu Leu Val Ala Cys Leu  
290 295 300

Arg Thr Arg Pro Ala Gln Val Leu Val Asn His Glu Trp His Val Leu  
305 310 315 320

Pro Gln Glu Ser Val Phe Arg Phe Ser Phe Val Pro Val Val Asp Gly  
325 330 335

Asp Phe Leu Ser Asp Thr Pro Glu Ala Leu Ile Asn Ala Gly Asp Phe  
340 345 350

ES 2 660 667 T3

His Gly Leu Gln Val Leu Val Gly Val Val Lys Asp Glu Gly Ser Tyr  
 355 360 365

Phe Leu Val Tyr Gly Ala Pro Gly Phe Ser Lys Asp Asn Glu Ser Leu  
 370 375 380

Ile Ser Arg Ala Glu Phe Leu Ala Gly Val Arg Val Gly Val Pro Gln  
 385 390 395 400

Val Ser Asp Leu Ala Ala Glu Ala Val Val Leu His Tyr Thr Asp Trp  
 405 410 415

Leu His Pro Glu Asp Pro Ala Arg Leu Arg Glu Ala Leu Ser Asp Val  
 420 425 430

Val Gly Asp His Asn Val Val Cys Pro Val Ala Gln Leu Ala Gly Arg  
 435 440 445

Leu Ala Ala Gln Gly Ala Arg Val Tyr Ala Tyr Val Phe Glu His Arg  
 450 455 460

Ala Ser Thr Leu Ser Trp Pro Leu Trp Met Gly Val Pro His Gly Tyr  
 465 470 475 480

Glu Ile Glu Phe Ile Phe Gly Ile Pro Leu Asp Pro Ser Arg Asn Tyr  
 485 490 495

Thr Ala Glu Glu Lys Ile Phe Ala Gln Arg Leu Met Arg Tyr Trp Ala  
 500 505 510

Asn Phe Ala Arg Thr Gly Asp Pro Asn Glu Pro Arg Asp Pro Lys Ala  
 515 520 525

Pro Gln Trp Pro Pro Tyr Thr Ala Gly Ala Gln Gln Tyr Val Ser Leu  
 530 535 540

Asp Leu Arg Pro Leu Glu Val Arg Arg Gly Leu Arg Ala Gln Ala Cys  
 545 550 555 560

Ala Phe Trp Asn Arg Phe Leu Pro Lys Leu Leu Ser Ala Thr Gly Met  
 565 570 575

Gln Gly Pro Ala Gly Ser Gly Trp Glu Glu Gly Ser Gly Ser Pro Pro  
 580 585 590

Gly Val Thr Pro Leu Phe Ser Pro Ser Glu Lys Asp Glu Leu  
 595 600 605

<210> 10  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Nucleótido de DNA monocatenario

<400> 10  
cggcgtcgac acaagaggcc tccacaat 28  
<210> 11  
<211> 28  
5 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Nucleótido de DNA monocatenario  
<400> 11  
10 cccctgcag ctagagtca tcctctc 28

## REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo desechable para cultivar y recolectar tejido y/o células vegetales que comprende un recipiente no rígido que tiene un volumen de al menos 400 litros y que está configurado con orificios de intercambio de gases y un orificio de recolección que hace posible que dicho dispositivo se use continuamente durante al menos dos ciclos consecutivos de cultivo/recolección, en que los orificios de intercambio de gases incluyen una pluralidad de orificios de entrada de gases ubicados en una superficie del recipiente en la parte inferior de una mitad de una altura del recipiente, configurados para mezclar y airear medio en el recipiente, en que el dispositivo no tiene una mezcla mecánica del medio en el recipiente ni un rociador para distribuir gas cuando está presente medio en el mismo y en que el dispositivo está diseñado y construido para mantener una saturación de oxígeno y fuerzas de cizallamiento adecuadas para cultivar dicho tejido y/o células vegetales.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, que tiene valores o un intervalo de valores de parámetros seleccionados entre al menos uno de los siguientes valores o intervalos de valores:
- una relación de altura a volumen de 0,06 a 1 centímetro por litro;
  - una presión de gas de entrada de 1 bar a 5 bares;
  - una densidad de entradas de gases por área seccional transversal de 20 entradas por metro cuadrado hasta 70 entradas por metro cuadrado;
  - una velocidad de aireación en la entrada de 0,05-0,12 volúmenes de gas por volumen de medio por minuto; y
  - un volumen de burbujas gaseosas en la entrada de 20 milímetros cúbicos hasta 1.800 milímetros cúbicos.
3. El dispositivo desechable de la reivindicación 2, en el que dicha saturación de oxígeno es de al menos 15% en volumen por volumen en un líquido contenido en dicho recipiente.
4. El dispositivo de la reivindicación 2 o 3, en que dicha relación de altura a volumen es de 0,44 cm por litro.
5. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en que dicha presión de gas de entrada es de 1,5 bares a 2,5 bares.
6. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en que dicha velocidad de aireación es de 0,07 a 0,10 volúmenes de gas por volumen de medio por minuto.
7. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende adicionalmente una estructura de soporte para soportar dicho dispositivo, comprendiendo dicha estructura de soporte un marco cilíndrico rígido que tiene una base cónica.
8. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en que dicho extremo inferior es sustancialmente frustacónico.
9. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en que la aireación y mezcla del medio de cultivo no se efectúa mediante un propulsor.
10. Un método para cultivar y recolectar un tejido vegetal y/o células vegetales en un volumen de más de 400 litros, comprendiendo el método:
- proporcionar el recipiente no rígido desechable según cualquiera de las reivindicaciones 1-9; y
  - proporcionar un inoculante a través de dicho orificio de recolección;
  - proporcionar medio de cultivo esterilizado y/o aditivos esterilizados;
  - iluminar opcionalmente dicho recipiente con luz externa; y
  - permitir que dichas células y/o tejido crezcan en dicho medio hasta un rendimiento deseado.
11. Un sistema de cultivo de células vegetales, que comprende el dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, un medio de cultivo adecuado para cultivar dicho tejido y/o células vegetales y una suspensión de células vegetales o cultivo de tejido que crece en dicho medio.
12. El sistema de cultivo de células vegetales de la reivindicación 11, en el que dichas células vegetales expresan una proteína recombinante.
13. El sistema de cultivo de células vegetales de la reivindicación 11, en el que dichas células vegetales se seleccionan entre el grupo que consiste en células de raíces transformadas de *Agrobacterium rhizogenes*, células de apio, células de jengibre, células de rábano picante, células de tabaco y células de zanahoria.

14. El sistema de cultivo de células vegetales de las reivindicaciones 12 o 13, en que dichas células expresan acetilcolinesterasa recombinante humana.

15. El sistema de cultivo de células vegetales de las reivindicaciones 12 o 13, en que dicha acetilcolinesterasa recombinante humana es acetilcolinesterasa-R.

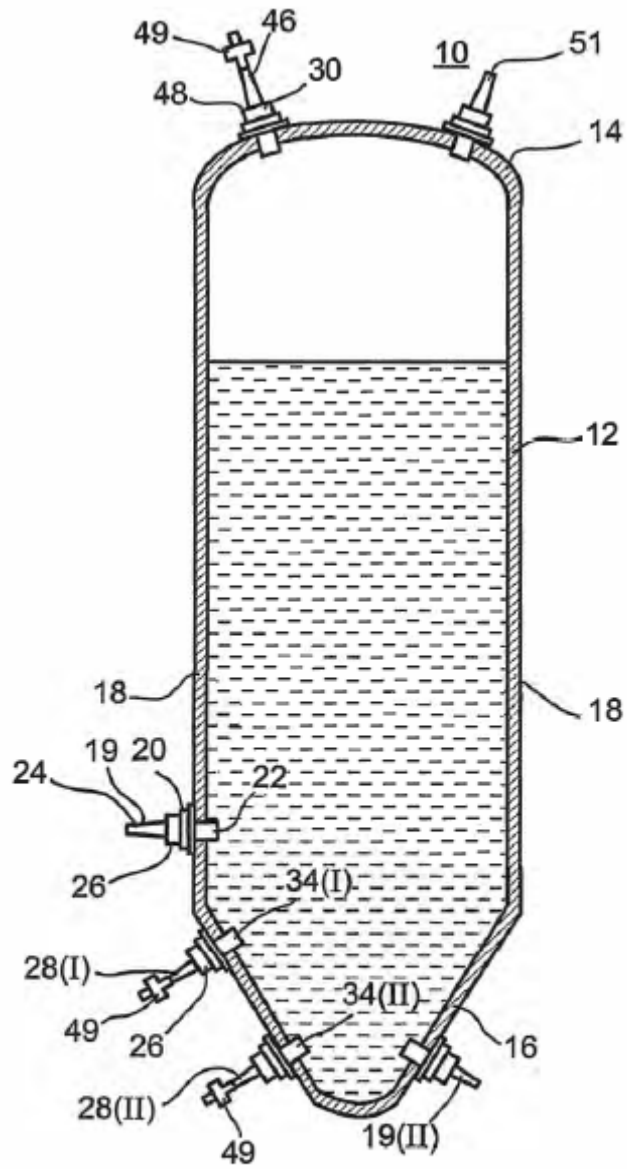


Fig. 1

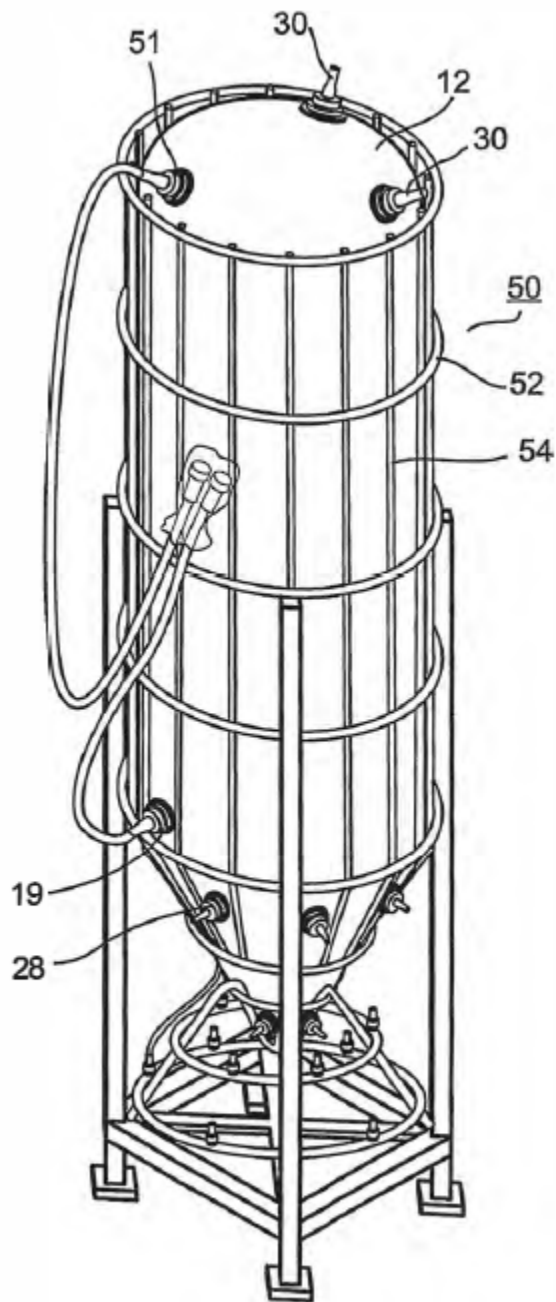


Fig. 2

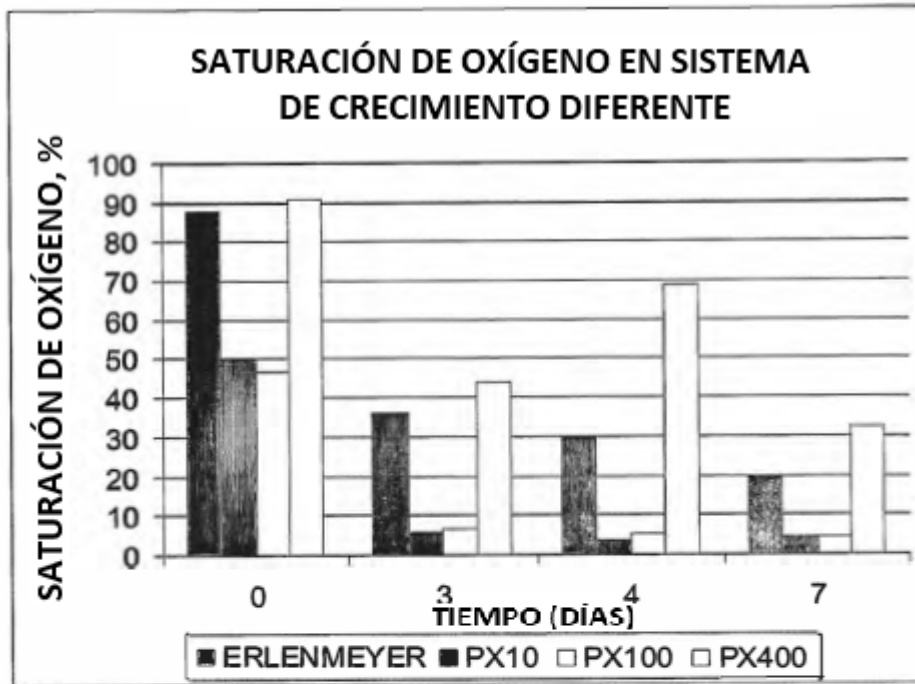


Fig. 3

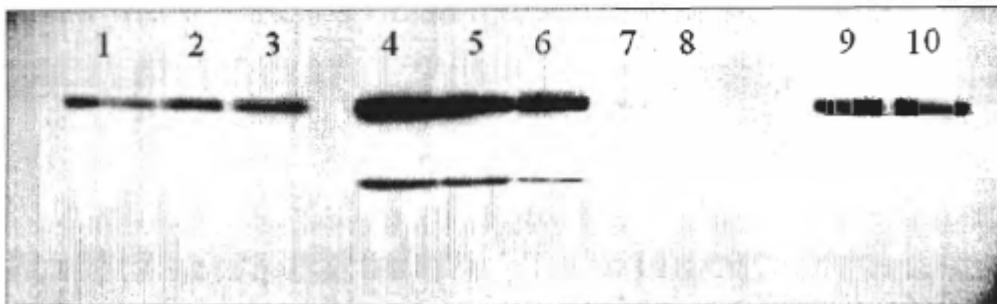


Fig. 4



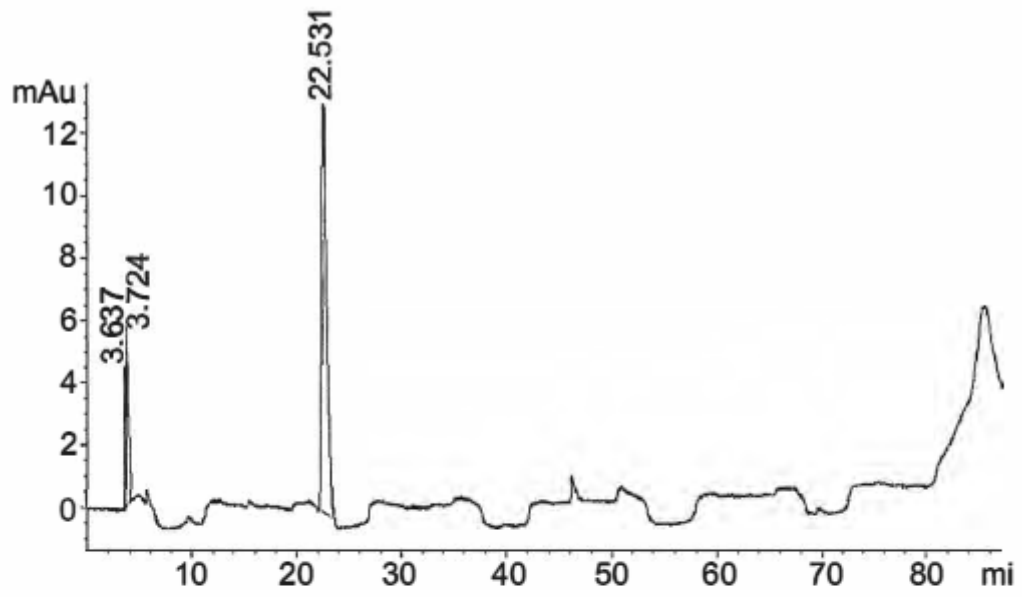


Fig. 5a

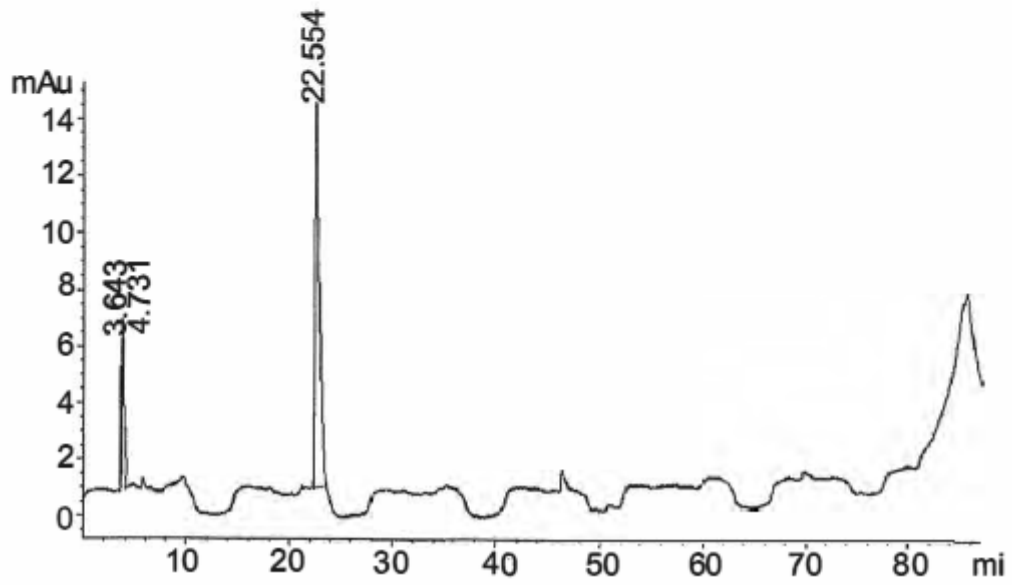
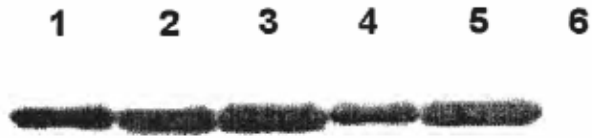
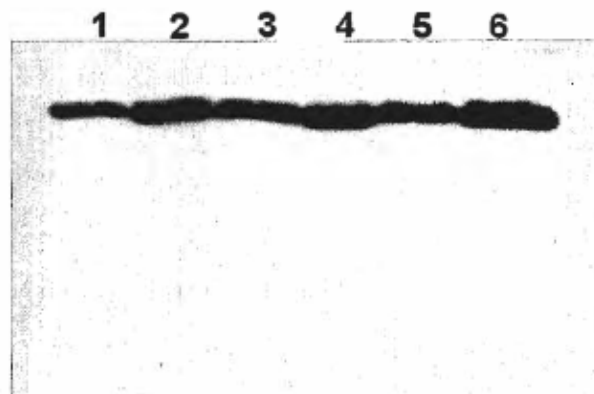


Fig. 5b



1. PX-400-GC 2 10 $\mu$ g
2. PLX-016-0505 DS 10 $\mu$ g
3. PLX-016-0505 DS 20 $\mu$ g
4. Cerezyme 10 $\mu$ g
5. Cerezyme 20 $\mu$ g
6. Marcadores del PM

Fig. 6



1. PX-400-GC 2 50ng
2. PX-400-GC-2 100ng
3. PLX-016-0505 DS 50ng
4. PLX-016-0505 DS 100ng
5. Cerezyme 50ng
6. Cerezyme 100ng

Fig. 7

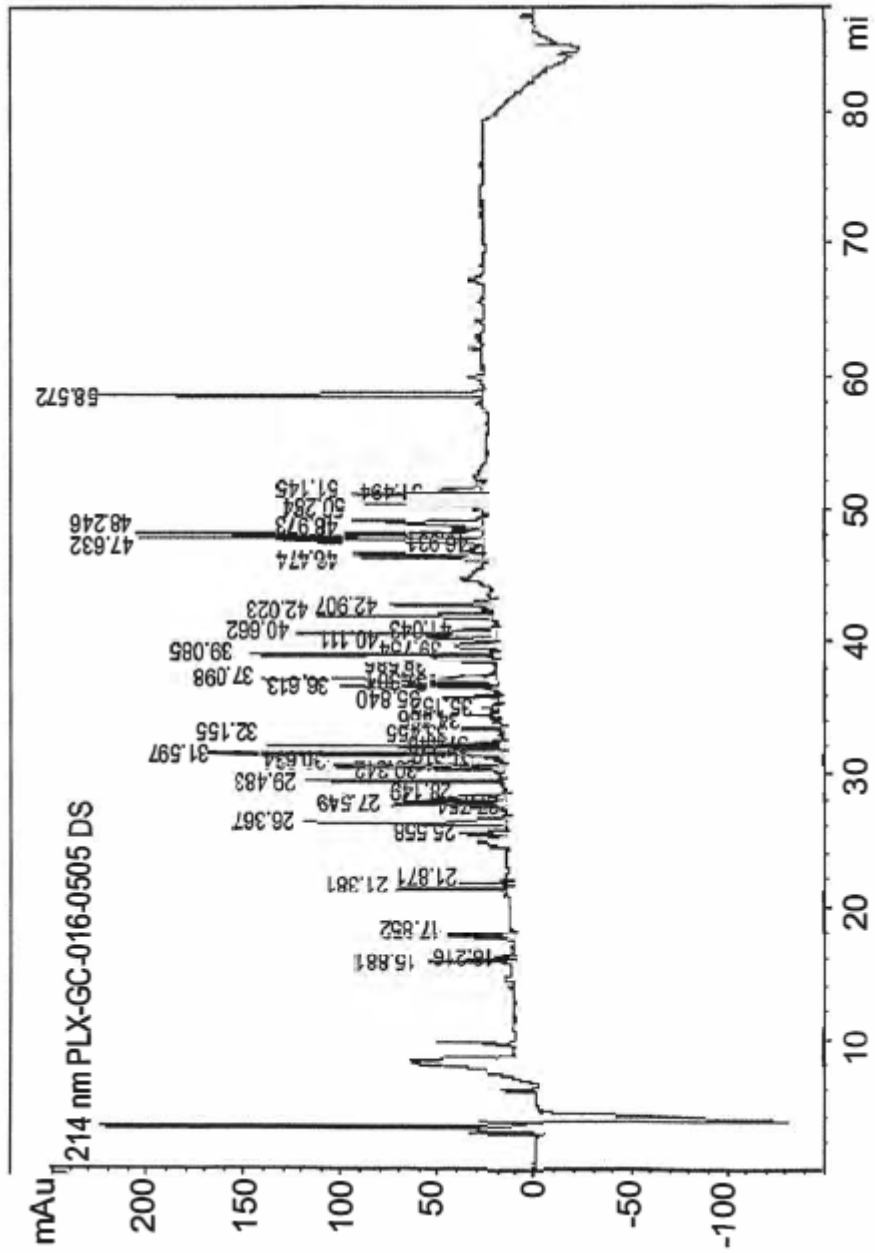


Fig. 8a

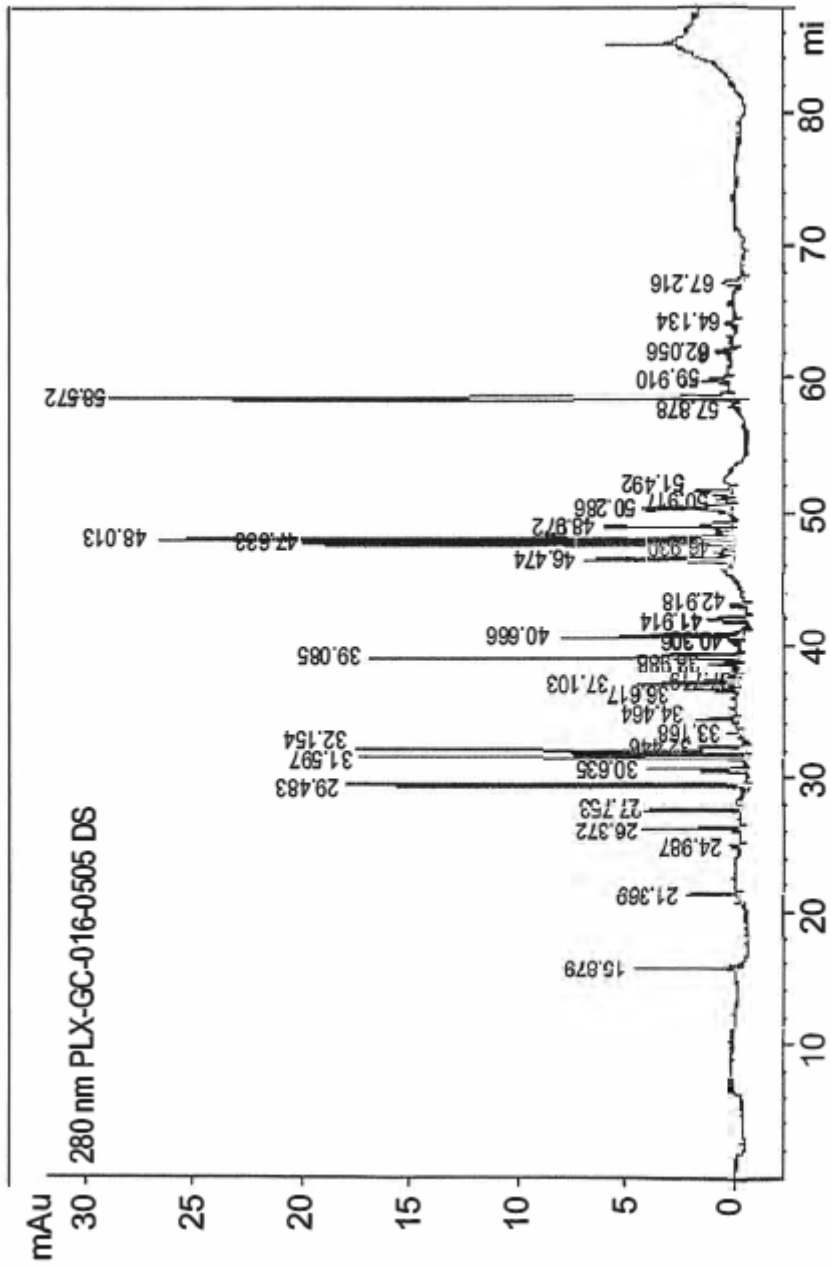


Fig. 8b

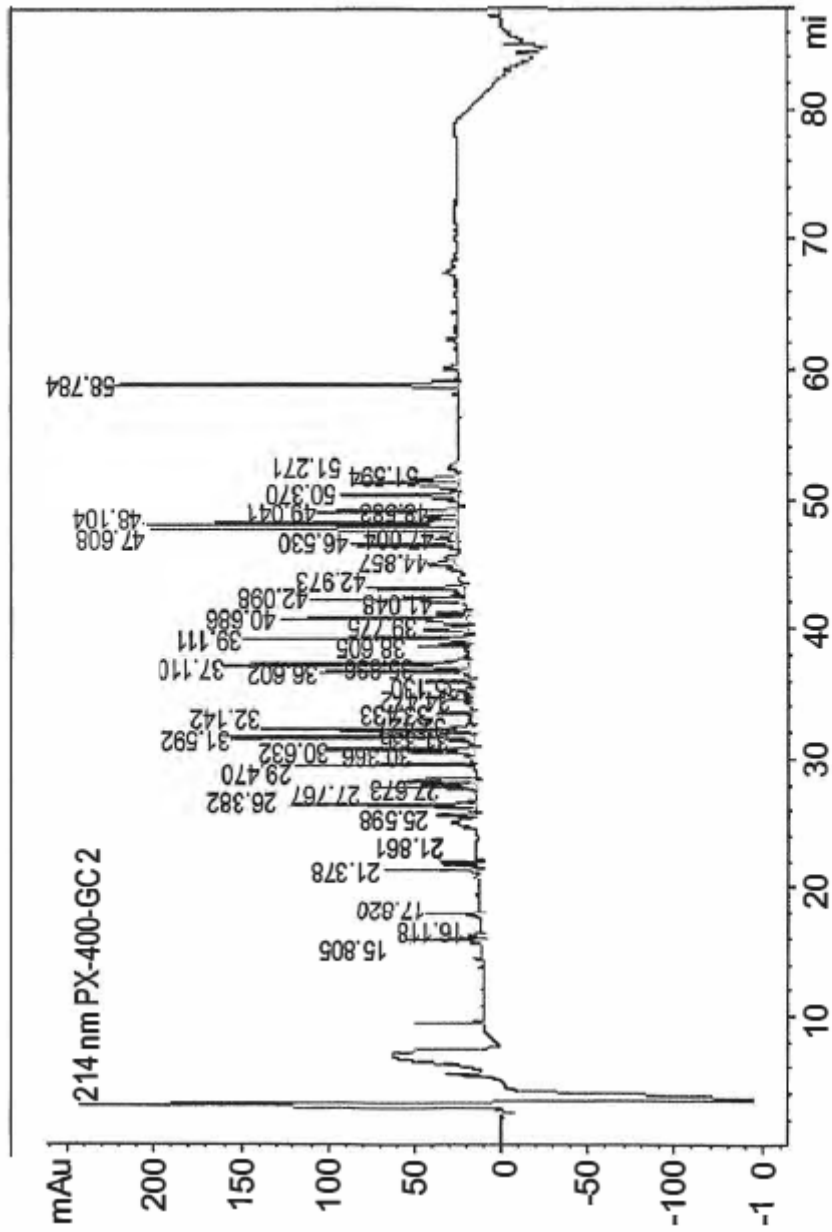


Fig. 8c

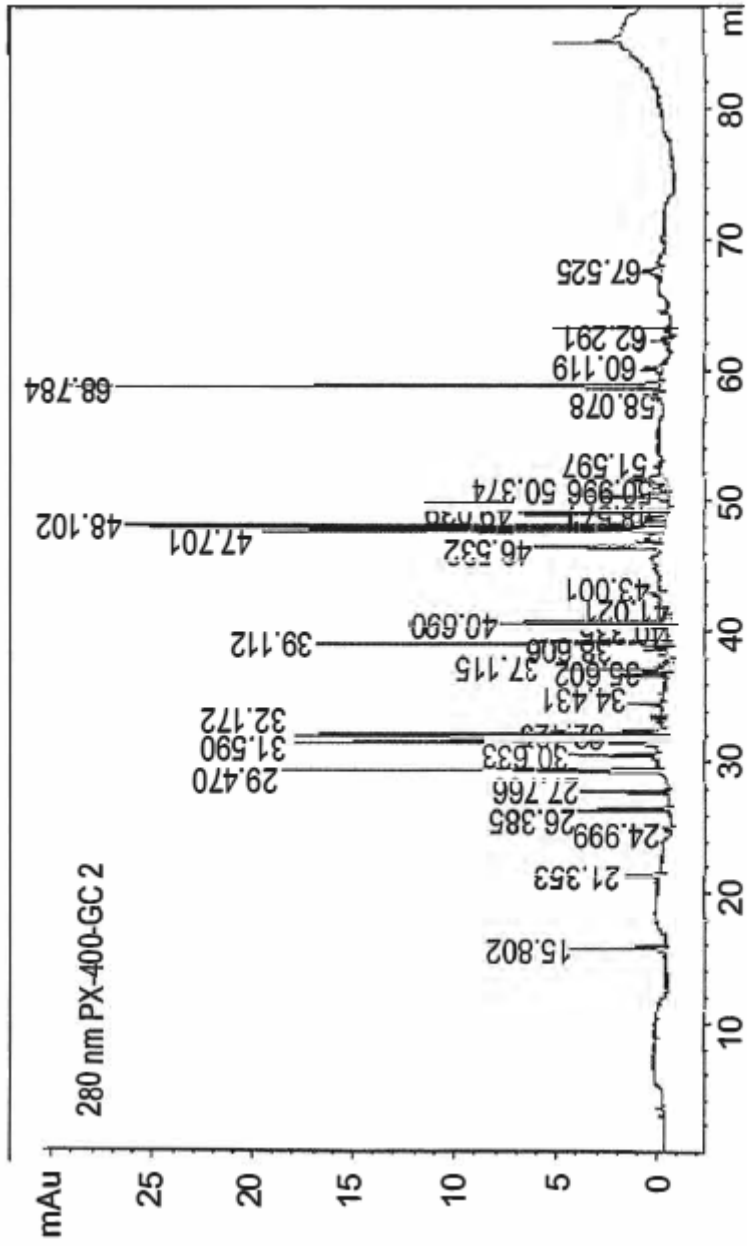


Fig. 8d

Fig. 9a

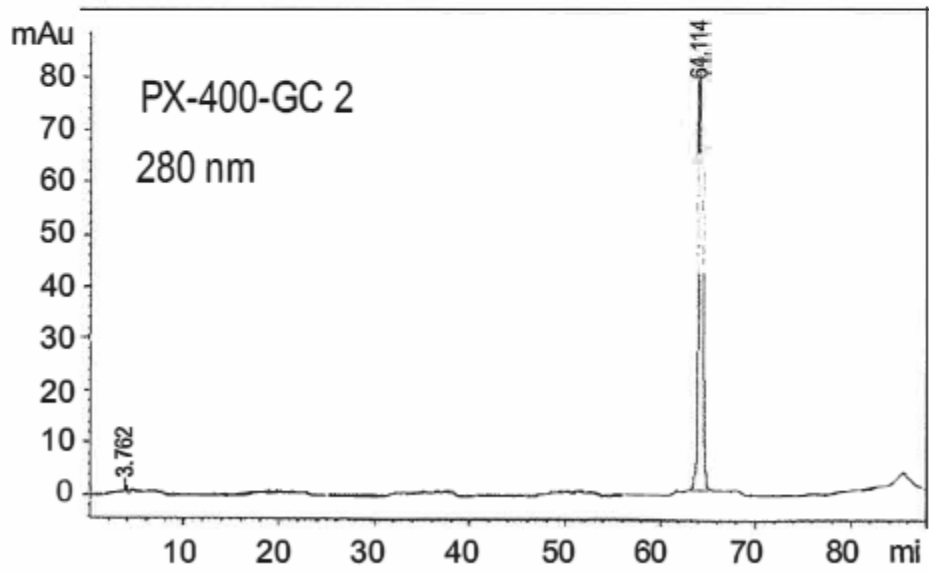
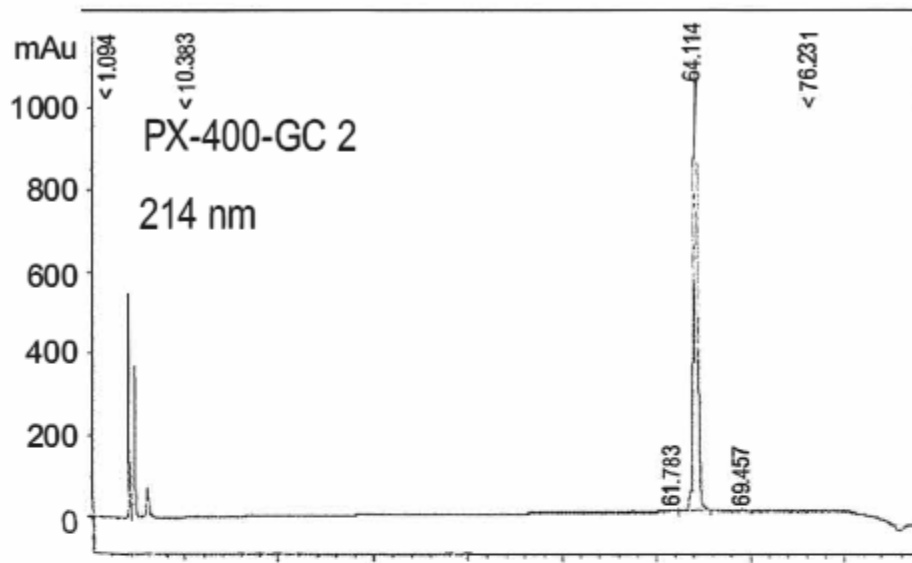
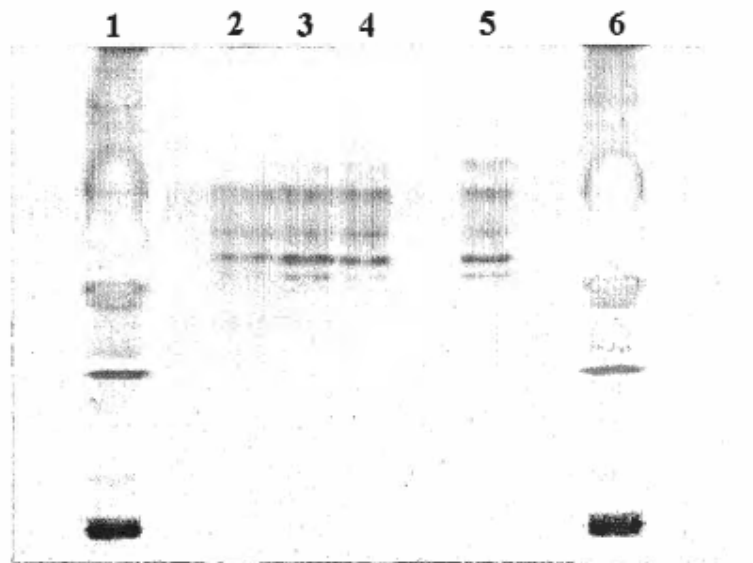
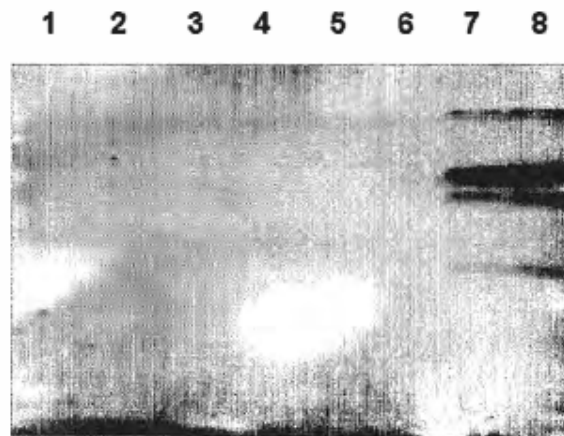


Fig. 9b



- 1. Patrón de PI
- 2. PX-400-GC-2 C-3
- 3. PX-400-GC-2 C-4
- 4. PX-400-GC-2 C-5
- 5. PLX-GC-016-0505DS
- 6. Patrón de PI

Fig. 10



- 1. PX-400-GC-2 50ng
- 2. PX-400-GC-2 100ng
- 3. PLX-016-0505 DS 50ng
- 4. PLX-016-0505 DS 100ng
- 5. Cerezyme 50ng
- 6. Cerezyme 100ng
- 7. CHP 50ng
- 8. CHP 100ng

Fig. 11



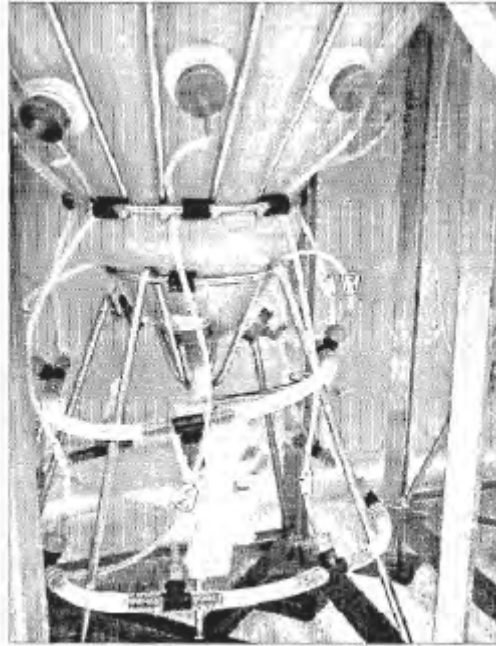


Fig. 12

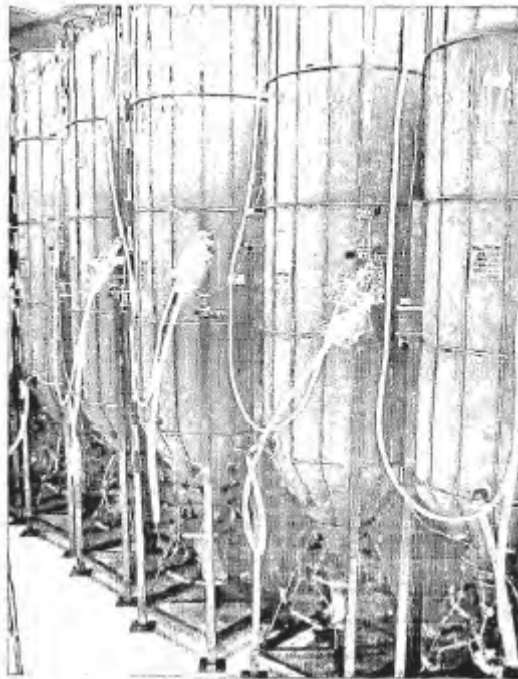


Fig. 13

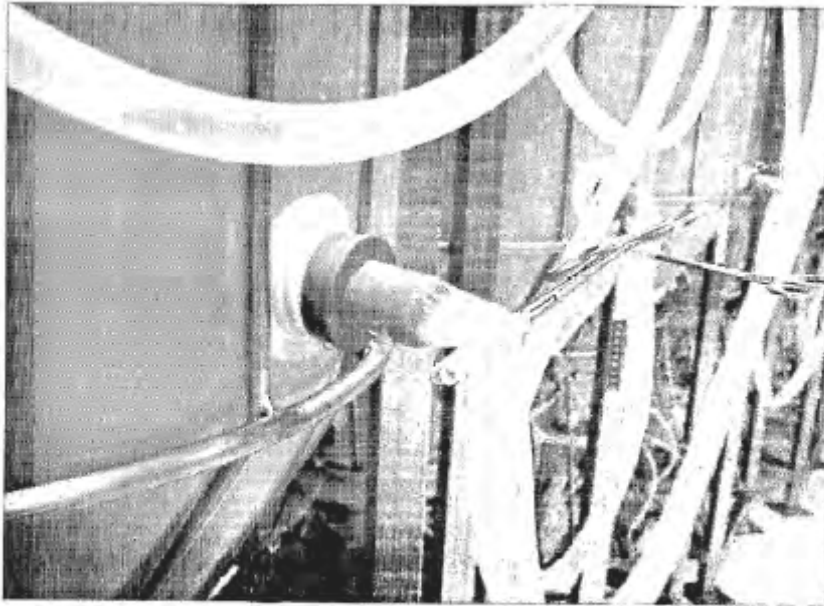
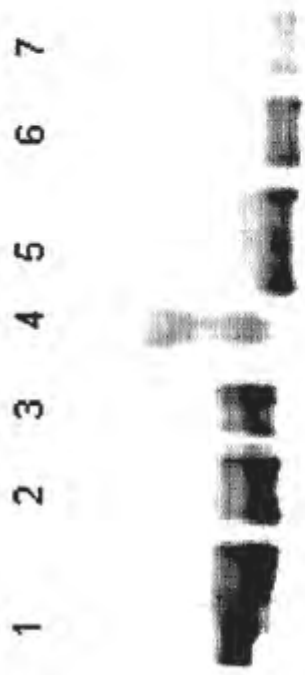


Fig. 14

- 1 Tanda de AChE-R 9+10+11 200ng
- 2 Tanda de AChE-R 9+10+11 100ng
- 3 Tanda de AChE-R 9+10+11 50ng
- 4 Marcador del PM
- 5 AChE-S 200ng
- 6 AChE-S 100ng
- 7 AChE-S 50ng



Western 10%SDS-PAGE

Fig. 15

# flamingo

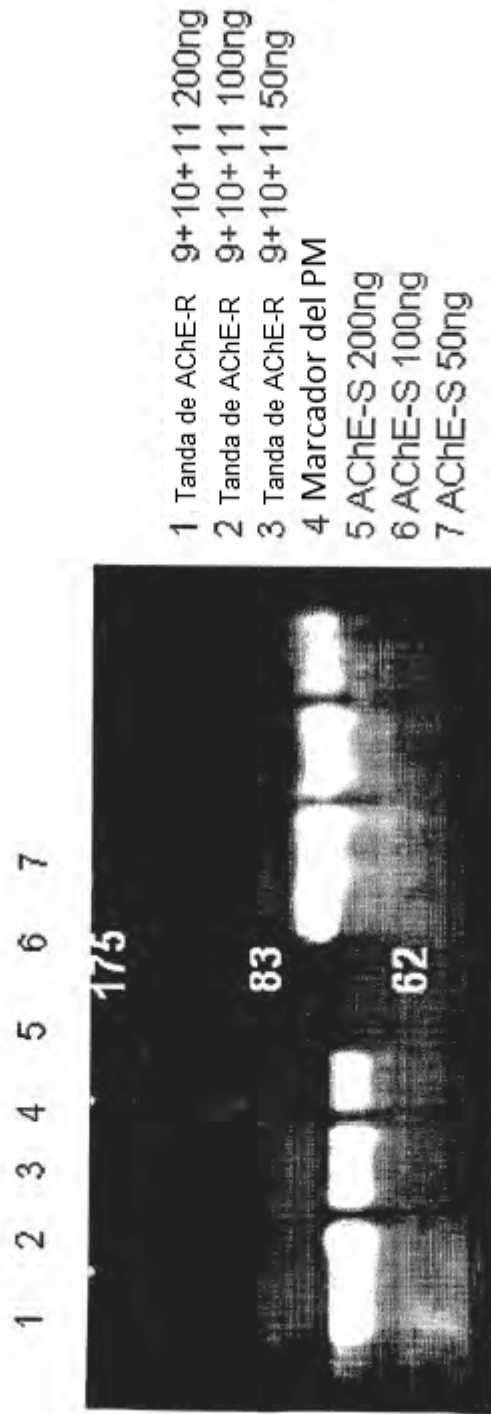


Fig. 16

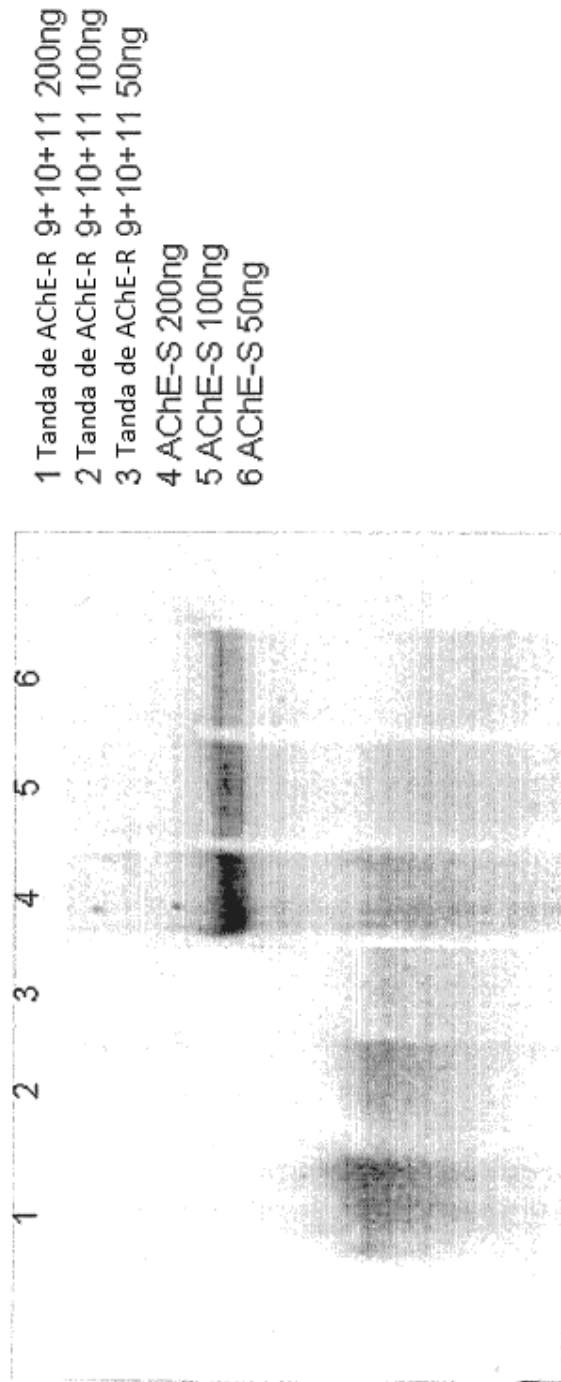


Fig. 17