

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 589**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12M 1/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2006 PCT/US2006/022312**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.12.2006 WO06138143**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2006 E 06772571 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 1891205**

54 Título: **Recipientes para cultivo en suspensión**

30 Prioridad:

15.06.2005 US 690587 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2018

73 Titular/es:

**ZHEJIANG JINYISHENGSHI BIOENGINEERING
CO., LTD. (100.0%)
3-1201-2 Room, No.1366 Hongfeng Road, Huzhou
City
Zhejiang 313000, CN**

72 Inventor/es:

HUI, MIZHOU

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 662 589 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

Recipientes para cultivo en suspensión

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un recipiente de cuerpo ancho para cultivo de células de mamífero, con un fondo troncocónico invertido o de tronco invertido, para conseguir un volumen de siembra reducido y mejor mezcla con menos estrés hidromecánico y mayor aireación.

Antecedentes de la invención

10 El cultivo de células de mamífero en suspensión, con alta densidad, es una herramienta útil para el desarrollo de fármacos proteicos o vacunas. A menudo requiere recipientes de cultivo celular de pequeño volumen para producir materiales de ensayo en animales, y recipientes de cultivo celular de gran volumen para producir material de ensayos clínicos. La mayoría de los biólogos celulares prefieren equipos simplificados de pequeño volumen para el cultivo en suspensión, mientras que los profesionales del escalamiento agradecen sistemas de gran volumen para cultivo celular, "fáciles de optimizar".

15 El cilindro alto es una forma típica de los recipientes de cultivo de biorreactor y frascos giratorios actuales. Un recipiente o frasco de este tipo tiene, para el volumen de trabajo, una relación altura:diámetro superior a 1/1. El área de la superficie del medio de cultivo en el recipiente no es suficiente para una absorción eficaz de O₂. Se ha utilizado la inyección de aire u O₂ para enfrentarse a este problema. Sin embargo, una sobredosis de inyección de aire provoca frecuentemente daño celular por formación de espuma y estallido de las burbujas. Además, una sobredosis de inyección de O₂ puro es tóxico para las células. Por lo tanto, se requiere un sofisticado centro de control y sondas de oxígeno disuelto (OD) relacionadas para supervisar y controlar la inyección de aire o de O₂ puro. En cualquier caso, la optimización del centro de control o las sondas resulta tediosa y costosa.

El documento US 4 665 035 se refiere a aparatos y sistemas para fermentación aerobia en matraz agitado por sacudidas que tienen deflectores y cierres para crecimientos microbianos.

El documento EP 0 752 470 se refiere a un método de cultivo para cultivo de ciliados en matraces giratorios.

25 El documento JP 5 26 972 se refiere a un dispositivo para conexión de tuberías en el que se puede insertar externamente, en una parte de tubo de inserción de un empalme de tuberías, una parte de extremo de tubería con diámetro agrandado.

El documento WO98/27195 se refiere a un receptáculo para cultivo celular utilizado para cultivar un trasplante de células antitumorales para terapia génica y celular.

30 Por tanto, existe la necesidad de recipientes de cultivo de pequeño volumen, en particular recipientes desechables, sin centro de control ni sonda de OD relacionada, y de recipientes de cultivo de gran volumen "fáciles de optimizar".

35 El diseño de la presente invención permite cultivar un gran volumen de células sin utilizar un centro de control sofisticado ni sondas relacionadas. Se han desarrollado asimismo sistemas de cultivo en suspensión de pequeño volumen, basados en agitación por sacudidas, desechables o autoclavables. Además, se ha estudiado también un prototipo para un sistema de biorreactor troncocónico invertido industrial de gran volumen, basado en impulsor, "fácil de optimizar".

Compendio de la invención

40 La presente invención presenta un recipiente de cuerpo ancho para cultivo, con un fondo troncocónico invertido. Si se compara con recipientes de biorreactor de fondo plano tradicionales, el recipiente de esta invención tiene un área de superficie del medio de cultivo significativamente mayor, para absorber O₂ y eliminar CO₂. El fondo troncocónico invertido proporciona una reducción significativa del volumen de siembra para iniciar un proceso de cultivo celular. El fondo troncocónico invertido permite la inyección con aire en una posición baja, para conseguir un tiempo de desplazamiento de las burbujas de aire más prolongado. Por otra parte, se puede emplear la agitación orbital para que el medio de cultivo trepe fácilmente por la pared del recipiente sin fuerza de cizalladura y con menos estrés hidromecánico. Esto crea una capa de medio extensa y delgada, proporcionando una superficie ampliada y una mayor aireación y mejor mezcla. Utilizando este diseño, se han desarrollado sistemas de cultivo en suspensión de pequeño volumen basados en agitación por sacudidas, de "un solo uso" en plástico o bien autoclavables en vidrio, sin centro de control sofisticado ni sondas relacionadas. Además, se ha estudiado un prototipo para un sistema de biorreactor industrial de gran volumen basado en impulsor, "fácil de optimizar".

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1a es un dibujo de un recipiente de cuerpo ancho de 3 litros, con fondo troncocónico invertido; volumen de trabajo = 3 L; área de la superficie del medio de cultivo/volumen del medio de cultivo >0,143 cm²/cm³; volumen mínimo de siembra = 150 ml, 1/20 del volumen de trabajo de 3 litros señalado.

La Figura 1b es una fotografía de un recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 3 litros, con fondo troncocónico invertido, y un recipiente de biorreactor Applikon de fondo plano tradicional en segundo plano.

5 La Figura 2 es una fotografía de un frasco de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 150 ml, con fondo troncocónico invertido; volumen de trabajo = 150 ml de medio de cultivo; espacio de aire libre total = 500 ml; volumen mínimo de siembra = 7,5 ml, 1/20 del volumen de trabajo señalado. Para dar soporte a este sistema se precisan una plataforma de agitación por sacudidas, un caudalímetro, un dispositivo para burbujeo de aire en una posición baja y una bomba de aire. Este sistema está diseñado principalmente para cribar, con criterios de robustez y productividad, candidatos de líneas celulares para producción, así como para dar soporte a trenes de siembra.

10 La Figura 3 es una serie de dibujos de recipientes de cuerpo ancho para cultivo en suspensión, con fondos troncocónicos invertidos que proporcionan un procedimiento de tren de siembra simplificado.

La Figura 4a es un diagrama que muestra problemas de escalamiento y factores que afectan negativamente a la optimización del escalamiento, relacionados con la mezcla, fuerza de cizalladura, estrés hidromecánico, aireación y arrastre de CO₂, de biorreactores industriales de tanque agitado de cilindro alto.

15 La Figura 4b es un diagrama que muestra las ventajas de recipientes de biorreactor de cuerpo ancho con fondo troncocónico invertido, para el cultivo celular industrial a gran escala.

Descripción detallada de la invención

20 Esta invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que, sin utilizar un centro de control sofisticado ni sondas de OD y de pH relacionadas, células de mamífero adaptadas a suspensión crecían satisfactoriamente cuando la relación de área de la superficie del medio de cultivo/volumen del medio de cultivo es superior a 0,14 cm²/cm³. Este cultivo se realizó en un frasco de agitación por sacudidas, con inyección de aire por el fondo o aporte de O₂ puro para cobertura, a 37°C, utilizando un medio de suspensión sin suero, complementado con HEPES 20-25 mM. El descubrimiento antedicho indicaba que los recipientes de cultivo de cuerpo ancho presentan ventajas en cuanto a aireación de la superficie del medio con respecto a los recipientes de cultivo de tanque agitado de cilindro alto tradicionales.

25 Se han desarrollado muchas líneas celulares de mamífero robustas para cultivo en suspensión sin suero y sin componentes animales. Estas incluyen células CHOD (B11 y DG44), CHOK y NS0 (adaptadas a la ausencia de suero). Además, también se han desarrollado potentes medios de cultivo en suspensión sin componentes animales (crecimiento basal y alimentación). Al añadir un tampón no dependiente del CO₂ tal como el tampón HEPES 20 mM y suficiente aireación superficial, dejan de ser esenciales para cultivos en suspensión de pequeño volumen un centro de control sofisticado y sondas de oxígeno disuelto (OD) y de pH relacionadas, cuando se emplean recipientes de cuerpo ancho para cultivo. Los desarrollos precedentes han permitido a los autores de la presente invención probar y desarrollar libremente recipientes de biorreactor simplificados y "fáciles de optimizar" para el cultivo en suspensión, sin suero, de células de mamífero.

35 Los autores de la presente invención han diseñado y construido recipientes de cuerpo ancho para cultivo de 3 litros (Figuras 1a, b) según la invención y de 150 ml (Figura 2) de volumen de trabajo, con fondo troncocónico invertido. Estos recipientes se han utilizado primeramente como recipientes de cultivo para agitación por sacudidas, para cultivar células de mamífero. Sorprendentemente, han funcionado mucho mejor que recipientes convencionales Applikon de fondo plano para biorreactor, de volumen similar, en términos de densidad celular, productividad de proteína recombinante, fiabilidad y facilidad de uso. Claramente, la combinación de agitación orbital, fondo con forma troncocónica, cuerpo ancho y medio de cultivo estable al pH ha funcionado favoreciendo el cultivo de células de mamífero y la producción de proteína recombinante.

40 La atención se centró primeramente en un frasco de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de pequeña escala, de 150 ml, con un fondo troncocónico invertido para el cribado, con criterios de robustez, de candidatos de líneas celulares para producción. La invención importante en este apartado era el fondo troncocónico invertido, para lograr un volumen de siembra reducido para el inicio de un proceso de cultivo celular.

45 En este estudio, se estudió primeramente un recipiente de cuerpo ancho con fondo troncocónico invertido (Figura 2) en paralelo a un recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, dotado de un fondo cónico de "punta aguda" (Corning, n.º de catálogo 431123). Cada recipiente tiene un volumen total de 500 ml y un volumen de trabajo por diseño de 150 ml. Para este estudio se emplearon células CHO que expresaban la proteína recombinante VEGFR1-Fc-IL-1ra. Los resultados de la Tabla 1, con lote alimentado, indican que estos recipientes de 150 ml para agitación por sacudidas eran buenos para el estudio en suspensión a pequeña escala, con lote alimentado. Se logró un pequeño volumen de siembra de 7,5-15 ml (1/20-1/10 del volumen de trabajo de 150 ml) para el inicio satisfactorio de un proceso de cultivo celular. El recipiente para agitación por sacudidas dotado de fondo cónico con "punta aguda" provocó la precipitación de células, en particular cúmulos de células (Tabla 1), en la parte superior del fondo, lo que indica una mezcla deficiente en esa región. Por lo tanto, fue abandonado.

También se consideraron ángulos de cono eficaces para los recipientes de cultivo con fondo cónico. Se estudió la influencia del ángulo de cono sobre la agitación orbital, mezcla del medio de cultivo y volumen de siembra,

utilizando tubos de centrifugación cónicos de plástico con distintos ángulos de cono (Tabla 2). La agitación orbital puede no ser capaz de hacer que el medio de cultivo trepe fácilmente por la pared, si el ángulo es demasiado estrecho (por ejemplo, <30 grados) o demasiado amplio (por ejemplo, >70 grados).

5 Según la presente invención, se centró la atención en recipientes para cultivo en suspensión de 3 litros, sin centro de control sofisticado ni sondas de OD y de pH relacionadas. La aireación se efectuaba, o bien mediante inyección de aire en el punto más bajo del fondo troncocónico invertido, para conseguir un tiempo de desplazamiento de las burbujas de aire más prolongado, o bien mediante cobertura con O₂ puro sobre una gran área de superficie del medio.

10 En primer lugar, los autores de la presente invención hallaron que la agitación orbital podía hacer que el medio de cultivo trepara fácilmente por la pared del recipiente de cultivo, logrando así un bajo estrés hidromecánico y creando una capa de medio extensa y delgada, para conseguir una superficie ampliada, mayor aireación y mejor mezcladura.

15 En este estudio, se construyó un recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 3 litros, con fondo troncocónico invertido (Figuras 1a, b) y se probó sin centro de control ni sonda de OD relacionada. Se bombeó a este recipiente para agitación por sacudidas aire filtrado (que contenía aproximadamente 21% de O₂) para inyectar aire a un caudal bajo sin originar daño celular significativo. Como alternativa, se utilizó un caudal muy pequeño de O₂ puro a través de un dispositivo de tubo en la parte inferior del recipiente (sirve como monitor de caudal) para generar burbujas más grandes, o bien cobertura directa con O₂.

20 Para este estudio se emplearon células CHO que expresaban TNFR1-Fc-IL-1ra, IL-18bp-Fc-IL-1ra, VEGFR1-Fc-IL-1ra y Tie2-Fc-IL-1ra. Sirvieron como frascos de fondo plano para agitación por sacudidas un biorreactor Applikon de tanque agitado de fondo plano y 2 litros (Figura 1b, en segundo plano) y un recipiente tipo damajuana de 20 litros. Cada uno tenía un volumen de cultivo de trabajo de 3 litros y se utilizó como testigo. Las Tablas 3, 4 y 5 resumen los resultados de los recipientes con fondo troncocónico invertido en comparación con los resultados de los recipientes de biorreactor Applikon y los recipientes de fondo plano para agitación por sacudidas.

25 Sorprendentemente, el recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas (Tabla 3) ha funcionado significativamente mejor que el tanque agitado Applikon de fondo plano (Tabla 4) y que los recipientes de fondo plano para agitación por sacudidas (Tabla 5). Claramente, el movimiento de agitación orbital es capaz de empujar fácilmente el medio de cultivo hacia arriba por la pared del recipiente, sin fuerza de cizalladura y menos estrés hidromecánico, y crea una capa de medio extensa y delgada, para una mayor aireación.

30 También se consideraron el diseño, el análisis y el estudio de prototipo de un biorreactor industrial de cuerpo ancho de tanque agitado, basado en impulsor, de gran volumen, con fondo troncocónico invertido. La aplicación del fondo troncocónico invertido contribuye significativamente a un volumen de siembra reducido (Figura 3) así como a una mejor mezcladura con menos estrés hidromecánico y fuerza de cizalladura mínima. Además, la mayor área de superficie del diseño contribuye ciertamente a una mejor aireación y a un arrastre de CO₂ más eficaz (Figuras 4a, b).
 35 El objetivo de los autores de la presente invención era crear biorreactores industriales estables de mayor tamaño, más fáciles de optimizar y que utilizasen un volumen de siembra significativamente reducido. La Figura 4a muestra los problemas de escalamiento y los factores que afectan negativamente a la optimización del escalamiento relacionados con la mezcladura, la fuerza de cizalladura, el estrés hidromecánico, la aireación y el arrastre de CO₂. Estos factores hacen más difícil la optimización del escalamiento, en particular para biorreactores industriales de gran volumen. Tras el análisis, los autores de la presente invención han concluido que, al menos en teoría, un recipiente de cuerpo ancho con fondo cónico no solo mejora la optimización del escalamiento (por ejemplo, una mejor mezcladura con menos estrés hidromecánico y mínima fuerza de cizalladura) (Figura 4b), sino que también reduce el volumen de alimentación de recipientes de biorreactor de tanque agitado accionados por impulsor (Figura 3).
 40 Para una velocidad de agitación dada, el fondo troncocónico invertido del recipiente y el área de superficie aumentada mejoran conjuntamente el proceso de optimización del escalamiento.
 45

Ejemplo 1 (comparativo)

Estudio de recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 150 ml, con fondo troncocónico invertido

El uso de recipientes de agitación por sacudidas, de pequeña escala, para el cultivo con lote alimentado de candidatos a línea celular CHO de producción, constituye un enfoque importante para el cribado, con criterios de robustez y alta productividad, de líneas celulares de producción. En este estudio se probaron recipientes de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 150 ml, con fondo troncocónico invertido (Figura 2) en paralelo a frascos de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, con fondo cónico "de punta aguda" invertido (Corning, n.º de catálogo 431123). Los resultados para lote alimentado (Tabla 1) indicaron que estos frascos para agitación por sacudidas, de 150 ml, eran adecuados para el estudio en suspensión, con lote alimentado, a pequeña escala. Se logró un pequeño volumen de siembra (1/20 del volumen de trabajo). Los títulos de expresión eran comparables a los del biorreactor de 2 litros. El recipiente para agitación por sacudidas con el fondo cónico de "punta aguda" invertido provocó una notable precipitación de células, en particular cúmulos celulares de gran tamaño, lo que demostraba una mezcla deficiente en la zona de la punta inferior. Por esta razón, los autores de la presente invención abandonaron el uso

del fondo cónico de "punta aguda" invertido y han adoptado el fondo troncocónico invertido.

Tabla 1: Se colocaron los recipientes de cultivo en una plataforma de agitación por sacudidas a una velocidad de 100 rpm. La alimentación (4,5 ml) comenzó el día 7 cuando el volumen del cultivo del lote llegó a 90 ml durante dos días.

Fondo del recipiente	Línea celular	Volumen de siembra	Densidad de siembra	Antes de la alimentación en el día 7	Después de la alimentación en el día 9	Fin del cultivo en el día 11	Título de expresión (mg/L)	Precipitación de células o cúmulos de células en el fondo
fondo tronco-cónico	CHO que expresa VEGFR1-Fc-IL-1ra	15 ml	$1 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ células/ml	$6,0 \pm 0,8 \times 10^{-6}$ células/ml	$10,2 \pm 1,5 \times 10^{-6}$ células/ml	$7,1 \pm 0,9 \times 10^{-6}$ células/ml	128±8,0	no
fondo cónico de punta aguda	CHO que expresa VEGFR1-Fc-IL-1ra	15 ml	$1 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ células/ml	$6,5 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ células/ml	$9,9 \pm 1,3 \times 10^{-6}$ células/ml	$6,8 \times 10^{-6}$ células/ml	118±0,6	sí

5

Ejemplo 2 (comparativo)

Estudio de recipientes de cultivo con fondo cónico invertido para distintos ángulos de cono

Se estudió la influencia del ángulo de cono del fondo cónico sobre la agitación orbital, la mezcladura del medio y el volumen de siembra, utilizando tubos de centrifugación cónicos de plástico con distintos ángulos de cono, en una plataforma de agitación por sacudidas (Tabla 2). La agitación orbital podría no ser capaz de hacer que el volumen de cultivo trepara fácilmente por la pared del vaso y formara una capa extensa y delgada con una superficie ampliada, si el ángulo era demasiado estrecho o demasiado amplio. Por ejemplo, no era significativamente diferente de los recipientes de fondo plano si el ángulo era demasiado ancho (por ejemplo, >70 grados). Tampoco era muy diferente de los recipientes de fondo plano si el ángulo era demasiado estrecho (por ejemplo, <30 grados). Los resultados de la Tabla 3 sugerían que un ángulo de 30 grados con la pared del cilindro tal vez fuera probablemente el ángulo mínimo para una agitación orbital y mezcladura eficaces. De acuerdo con el cálculo, con un ángulo de cono >70 grados no se consiguió una reducción significativa del volumen de siembra con respecto a los recipientes de cultivo de fondo plano normales, por lo que se abandonó.

Tabla 2: Estudio de recipientes de fondo cónico con distintos ángulos, con respecto a la agitación orbital y mezcladura eficaces, y el volumen de siembra. Nota: para este estudio se utilizaron células CHO que expresaban TNFR2-Fc-IL-1ra.

20

Marca y n.º de catálogo	Ángulo medido	Descripción del ángulo de cono	Volumen total	Efecto sobre la agitación orbital	Efecto sobre la mezcladura	Efecto sobre el volumen de siembra
Corning, n.º de catálogo 43776	el fondo cónico forma un ángulo de 30 grados con la pared del cilindro	estrecho	250 ml	no agita bien	precipitación en el ápice	sin problemas
Kendall, n.º de catálogo 20820	el fondo troncocónico forma un ángulo de 40 grados con la pared del cilindro	amplio	50 ml	agita bien	sin precipitación tanto a baja velocidad como a alta velocidad	sin problemas

Marca y n.º de catálogo	Ángulo medido	Descripción del ángulo de cono	Volumen total	Efecto sobre la agitación orbital	Efecto sobre la mezclado	Efecto sobre el volumen de siembra
Corning, n.º de catálogo 431123	el fondo troncocónico forma un ángulo de 40 grados con la pared del cilindro	amplio	500 ml	agita muy bien	precipitación en el ápice a baja velocidad	sin problemas
hecho a medida	el fondo troncocónico forma un ángulo de 40 grados con la pared del cilindro	amplio	500 ml	agita muy bien	sin precipitación tanto a baja velocidad como a alta velocidad	sin problemas
hecho a medida	el fondo troncocónico forma un ángulo de 45 grados con la pared del cilindro	amplio	3.000 ml	agita muy bien	sin precipitación tanto a baja velocidad como a alta velocidad	sin problemas

Ejemplo 3 (invención)

Estudio de recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 3 litros, con fondo troncocónico invertido

5 Se ensambló un recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 3 litros, con fondo troncocónico invertido, conjuntamente con un dispositivo de burbujeo de O₂ por tubo o de inyección de aire (Figuras 1a, b). El medio de cultivo en el volumen de trabajo tiene un área de superficie mayor para que el medio absorba O₂ (>0,143 cm² de área superficial por cm³ de volumen de medio). El fondo troncocónico invertido permite un dispositivo de inyección de aire en una posición baja, para conseguir un tiempo de desplazamiento del aire (que contiene aproximadamente 21% de O₂) más prolongado (Figuras a, b). El dispositivo de burbujeo de O₂ por tubo en la parte inferior sirve como monitor de bajo caudal para un caudal muy bajo de aporte de O₂ puro a la superficie del medio. El movimiento de agitación orbital puede hacer que el volumen de cultivo trepe con facilidad por la pared cónica del fondo y cree una capa de medio extensa y delgada, para conseguir un área mayor de la superficie del medio y una mejor aireación.

15 Los autores de la presente invención han empleado rutinariamente líneas celulares CHO que expresan TNFR1-Fc-IL-1ra, IL-18bp-Fe-IL-1ra, VEGFR1-Fc-IL-1ra y Tie2-Fc-IL-1ra para producir materiales de ensayo en animales. Para la producción rutinaria se empleaban los anteriormente mencionados recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 3 litros, con fondo troncocónico invertido, biorreactor Applikon de tanque agitado de fondo plano, de 2 litros, y recipiente de cultivo de tipo damajuana para agitación basada en sacudidas, de 20 litros. Las Tablas 3, 4 y 5 resumen todos los resultados de los recipientes con fondo troncocónico invertido, comparados con los resultados del recipiente de biorreactor Applikon de fondo plano y del recipiente de fondo plano para agitación por sacudidas.

25 Sorprendentemente, el recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, con fondo troncocónico invertido, (Tabla 3) funcionó significativamente mejor que el tanque agitado de fondo plano Applikon (Tabla 4) y que el recipiente para agitación por sacudidas (Tabla 5). Claramente, el movimiento de agitación orbital es capaz de empujar el medio de cultivo para que trepe fácilmente por la pared del recipiente sin fuerza de cizalladura y con bajo estrés hidromecánico, creando una capa de medio extensa y delgada, para una mayor aireación.

30 El recipiente de cuerpo ancho para cultivo, de agitación por sacudidas, con fondo troncocónico invertido, ha sido diseñado para ser mejor que el biorreactor de bolsa de plástico "Wave" recientemente desarrollado. El análisis de los autores de la presente invención ha demostrado que es similar a "Wave" con una extensa área de superficie para la absorción de O₂ y la eliminación de CO₂. No obstante, la agitación orbital junto con el fondo troncocónico del recipiente hace que el medio de cultivo trepe fácilmente por la pared del vaso y cree una capa de medio de cultivo extensa y delgada, para conseguir una aireación ampliada de la superficie del medio. De manera análoga a "Wave", se trata de recipientes de plástico "de un solo uso". Sin embargo, es mejor que "Wave" debido al volumen de siembra significativamente reducido para iniciar un proceso de cultivo celular dado. También es mejor que "Wave" el

5 hecho de que se sitúe un dispositivo de inyección de aire en el fondo troncocónico, para prolongar significativamente el tiempo de desplazamiento de las burbujas de aire. Aunque los autores de la presente invención no han comparado "Wave" directamente con el recipiente de cuerpo ancho para cultivo, con fondo troncocónico invertido, en términos de densidad celular, rentabilidad y facilidad de uso, todos los datos indirectos han apuntado a que el recipiente de cuerpo ancho para cultivo, con fondo troncocónico invertido, es mucho mejor que "Wave" en todos los aspectos mencionados.

10 Tabla 3: El recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 3 litros, con fondo troncocónico invertido, junto con un dispositivo de burbujeo de O₂ por tubo o inyección de aire, se utilizó para la producción rutinaria, con lote alimentado, de materiales para ensayo en animales utilizando líneas celulares CHO que expresan TNFR1-Fc-IL-1ra, IL-18bp-Fc-IL-1ra, VEGFR1-Fc-IL-1ra y Tie2-Fc-IL-1ra.

Modo de aporte de gas	Células CHO que expresan	Volumen de siembra	Densidad celular máxima	Duración total del cultivo	Volumen de células empaquetadas (vce) %	Título final por tinción de punto (+ tras dilución)	Rendimiento de purificación final
inyección de aire en posición baja	TNFR1-Fc-IL-1ra	300 ml	20,4±6,0x10 ⁶ células/ml	13 días	4,2%	518 mg/ml	77 mg/L
inyección de aire en posición baja	IL-18bp-Fc-IL-1ra	300 ml	18,8±0,6x10 ⁶ células/ml	14 días	4,0%	518 mg/ml	65 mg/L
inyección de aire en posición baja	VEFR1-Fc-IL-1ra	300 ml	15,0±0,3x10 ⁶ células/ml	14 días	3,5%	256 mg/ml	66 mg/L
inyección de aire en posición baja	Tie2-Fc-IL-1ra	300 ml 1	10,0±0,3x10 ⁶ células/ml	15	2,2%	128 mg/ml	42 mg/L
cobertura con O ₂	TNFR1-Fc-IL-1ra	300 ml	15,0±0,3x10 ⁶ células/ml	14 días	3,4%	518 mg/ml	73 mg/L
cobertura con O ₂	IL-18bp-Fc-IL-1ra	300 ml	9,0±0,9x10 ⁶ células/ml	15 días	2,3%	518 mg/ml	66 mg/L
cobertura con O ₂	VEFR1-Fc-IL-1ra	300 ml	18,0±0,7x10 ⁶ células/ml	13 días	3,8%	256 mg/ml	67 mg/L
cobertura con O ₂	Tie2-Fc-IL-1ra	300 ml	12,0±0,5x10 ⁶ células/ml	14 días	2,8%	128 mg/ml	39 mg/L

15 Tabla 4: Se empleó rutinariamente un recipiente de biorreactor de tanque agitado de fondo plano Applikon, de 2 litros, para la producción rutinaria, con lote alimentado, de materiales de ensayo en animales mediante el empleo de líneas celulares CHO que expresan TNFR1-Fc-IL-1ra, IL-18bp-Fc-IL-1ra, VEGFR1-Fc-IL-1ra y Tie2-Fc-IL-1ra. Se resumen aquí como testigos algunos de los resultados.

Modo de aporte de gas	Células CHO que expresan	Volumen de siembra	Densidad celular máxima	Duración total del cultivo	Volumen de células empaquetadas (vce) %	Título final por tinción de punto (+ tras dilución)	Rendimiento de purificación final
inyección de aire en posición baja	TNFR1-Fc-IL-1ra	800 ml	9,4±6,0x10 ⁶ células/ml	13 días	2,2%	256 mg/ml	44 mg/L
inyección de aire en posición baja	IL-18bp-Fc-IL-1ra	800 ml	8,8±0,7x10 ⁶ células/ml	12 días	2,0%	256 mg/ml	41 mg/L
inyección de aire en posición baja	VEFR1-Fc-IL-1ra	800 ml	10,0±0,7x10 ⁶ células/ml	12 días	2,3	256 mg/L	42 mg/L

Modo de aporte de gas	Células CHO que expresan	Volumen de siembra	Densidad celular máxima	Duración total del cultivo	Volumen de células empaquetadas (vce) %	Título final por tinción de punto (+ tras dilución)	Rendimiento de purificación final
inyección de aire en posición baja	Tie2-Fc-IL-1ra	800 ml	N/A	N/A	no creció	N/A	N/A
inyección de O ₂ puro en posición baja	TNFR1-Fc-IL-1ra	800 ml	8,0±0,3x10 ⁻⁶ células/ml	13 días	1,8%	256 mg/ml	46 mg/L
inyección de O ₂ puro en posición baja	IL-18bp-Fc-IL-1ra	800 ml	9,0±0,9x10 ⁻⁶ células/ml	12 días	2,0%	256 mg/ml	42 mg/L
inyección de O ₂ puro en posición baja	VEFR1-Fc-IL-1ra	800 ml	N/A	N/A	contaminado	N/A	N/A
inyección de O ₂ puro en posición baja	Tie2-Fc-IL-1ra		9,1±0,3 10 ⁻⁶ células/ml	13 días	2,2%	128 mg/L	27 mg/L

Tabla 5: También se empleó rutinariamente un recipiente de cultivo de tipo damajuana para agitación basada en sacudidas, con dispositivo de burbujeo de O₂ por tubo o inyección de aire, de 20 litros, para la producción rutinaria, con lote alimentado, de materiales de ensayo en animales mediante el empleo de líneas celulares CHO que expresan TNFR1-Fc-IL-1ra, IL-18bp-Fc-IL-1ra, VEGFR1-Fc-IL-1ra y Tie2-Fc-IL-1ra. Se resumen aquí como testigos algunos de los resultados.

5

Modo de aporte de gas	Células CHO que expresan	Volumen de siembra	Densidad celular máxima	Duración total del cultivo	Volumen de células empaquetadas (vce) %	Título final por tinción de punto (+ tras dilución)	Rendimiento de purificación final
inyección de aire en posición baja	TNFR1-Fc-IL-1ra	800 ml	9,0±3,0x10 ⁻⁶ células/ml	9 días	2,0%	256 mg/ml	40 mg/L
inyección de aire en posición baja	IL-18bp-Fc-IL-1ra	800 ml	8,8±0,6x10 ⁻⁶ células/ml	8 días	2,2%	256 mg/ml	42 mg/L
inyección de aire en posición baja	VEFR1-Fc-IL-1ra	800 ml	10,0±0,3x10 ⁻⁶ células/ml	8 días	2,2%	256 mg/ml	38 mg/L
inyección de aire en posición baja	Tie2-Fc-IL-1ra	800 ml	9,0±0,3x10 ⁻⁶ células/ml	9 días	2,0%	128 mg/ml	26 mg/L
cobertura con O ₂	TNFR1-Fc-IL-1ra	800 ml	10,0±0,3x10 ⁻⁶ células/ml	9 días	2,4%	256 mg/ml	41 mg/L
cobertura con O ₂	IL-18bp-Fc-IL-1ra	800 ml	9,0±0,9x10 ⁻⁶ células/ml	9 días	2,3%	256 mg/ml	39 mg/L
cobertura con O ₂	VEFR1-Fc-IL-1ra	800 ml	8,9±0,7x10 ⁻⁶ células/ml	10 días	2,2%	256 mg/ml	40 mg/L
cobertura con O ₂	Tie2-Fc-IL-1ra	800 ml	10,0±0,5x10 ⁻⁶ células/ml	10 días	2,2%	64 mg/ml	27 mg/L

Ejemplo 4

ES 2 662 589 T3

Dos ejemplos detallados de partidas de TNFR1-Fc-IL-1ra por lote alimentado, utilizando un recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 3 litros, con fondo troncocónico invertido, y un biorreactor de fondo plano Applikon de 2 litros

- 5 Se emplearon un recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 3 litros, con fondo troncocónico invertido, junto con dispositivo de burbujeo de O₂ por tubo, y un biorreactor Applikon de fondo plano de 2 litros, para producir TNFR1-Fc-IL-1ra en medio de suspensión con suero. Se usó la modalidad de lote alimentado. La Tabla 6 muestra los resultados. Nota: vce 2% = $9,6 \times 10^{-6}$ células/ml. Se demostró la clara ventaja del recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 3 litros, con fondo troncocónico invertido, con respecto al biorreactor Applikon de fondo plano de 2 litros.
- 10 Tabla 6: Se emplearon un recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 3 litros, con fondo troncocónico invertido, junto con dispositivo de burbujeo de O₂ por tubo, y un biorreactor Applikon de fondo plano, de 2 litros, para producir TNFR1-Fc-IL-1ra en medio de suspensión con suero. Se usó la modalidad de lote alimentado. La Tabla 6 muestra los resultados. Nota: vce 2% (volumen de células empaquetadas) = $9,6 \times 10^{-6}$ células/ml. Se demostró la clara ventaja del recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 3 litros, con fondo troncocónico invertido, con respecto al biorreactor Applikon de fondo plano de 2 litros.
- 15

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
fondo tronco-cónico	sembrado vce 0,2%	vce 0,2%	vce 0,5%	vce 1,0%	vce 1,8%	vce 2,2%	vce 2,2%	vce 2,3%	vce 2,8%	vce 3,0%	vce 2,6%	vce 2,2%
fondo plano Applikon	sembrado vce 0,2%	vce 0,2%	vce 0,4%	vce 0,9%	vce 1,6%	vce 2,0%	vce 2,1%	vce 2,0%	vce 1,8%	vce 1,6%		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un recipiente para cultivo celular que comprende una carcasa que define una cámara que incluye un fondo troncocónico invertido y un cuerpo cilíndrico que se extiende hacia arriba desde el fondo troncocónico invertido, teniendo la cámara un eje vertical, en donde el fondo troncocónico invertido tiene una pendiente, una parte superior y una parte de fondo opuesta, teniendo dicha parte de fondo un diámetro interno mayor que la parte superior, y en donde las dimensiones del diámetro interno de la parte superior, del diámetro interno de la parte de fondo, del diámetro interno del cuerpo cilíndrico, de la altura del fondo troncocónico invertido y de la altura del cuerpo cilíndrico son 40 mm, 250 mm, 250 mm, 90 mm y 110 mm, respectivamente.
- 10 2. Un sistema para cultivar células, que comprende un recipiente según la reivindicación 1 y una plataforma de agitación orbital o impulsores.
- 15 3. Un método para cultivar células vivas, que comprende los pasos de:
(a) proporcionar un recipiente según la reivindicación 1;
(b) introducir un medio de cultivo líquido de trabajo en el recipiente;
(c) introducir en el recipiente un cultivo de siembra que contiene células de interés; y
(d) cultivar las células en condiciones adecuadas, en donde la relación de área de respiración de O₂/volumen de medio de cultivo no es inferior a 0,14 cm²/cm³.
- 20 4. El método según la reivindicación 3, en donde la relación de volumen de medio de cultivo líquido de trabajo/volumen de cultivo de siembra no es superior a 1/10.
5. El método según la reivindicación 3, en donde el medio de cultivo líquido de trabajo contiene un medio sin suero que tiene HEPES 20 mM no dependiente de CO₂, o equivalentes, para mantener estable el pH del cultivo.

Figura 1a: Dibujo técnico de recipiente de cuerpo ancho de 3 litros con fondo troncocónico invertido

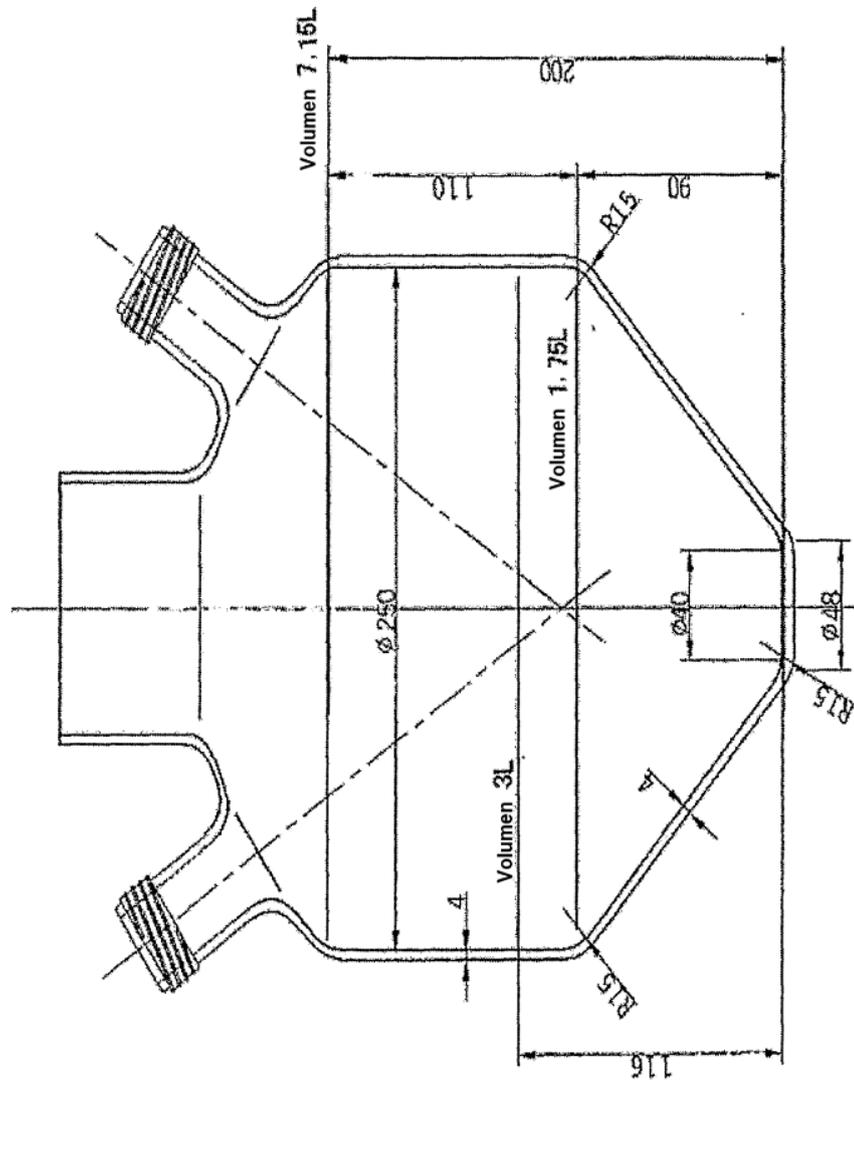


Figura 1b: Un recipiente de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 3 litros, con fondo troncocónico invertido, y un recipiente de biorreactor Applikon de fondo plano tradicional en segundo plano

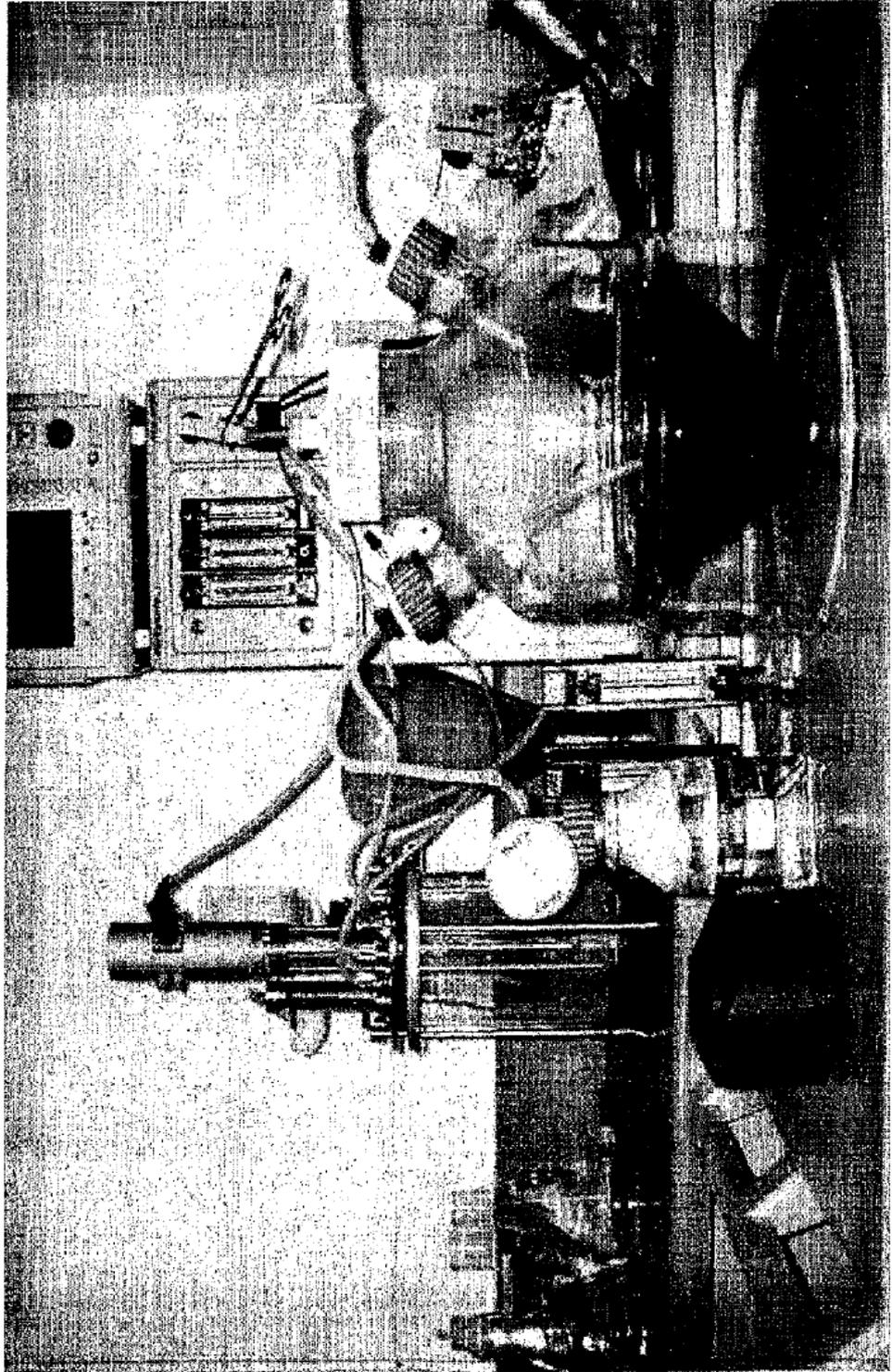


Figura 2: Frasco de cuerpo ancho para agitación por sacudidas, de 150 ml, con fondo troncocónico invertido

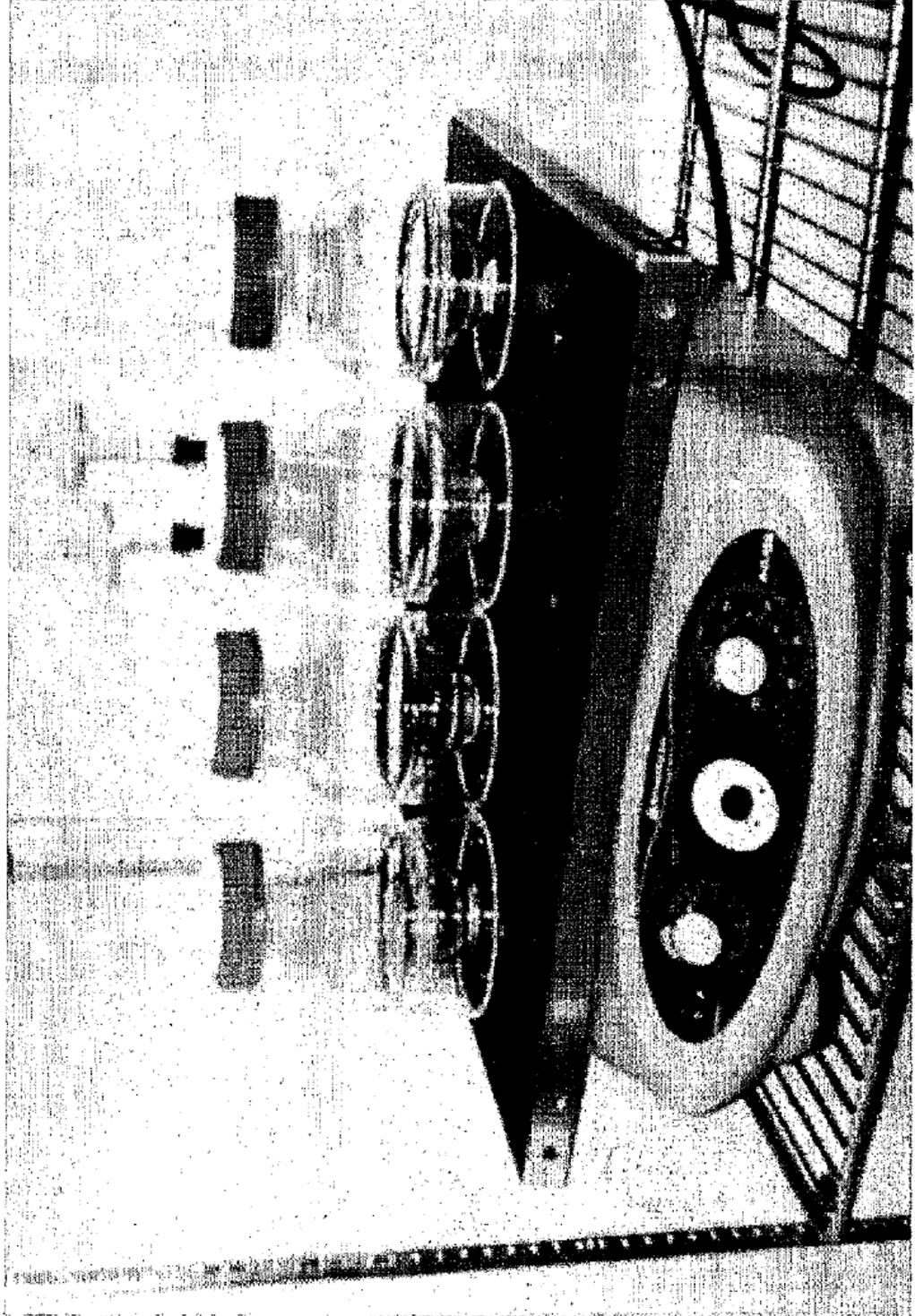


Figura 3: Los frascos de cuerpo ancho para cultivo en suspensión, con fondo troncocónico invertido, proporcionan un procedimiento de tren de siembra simplificado

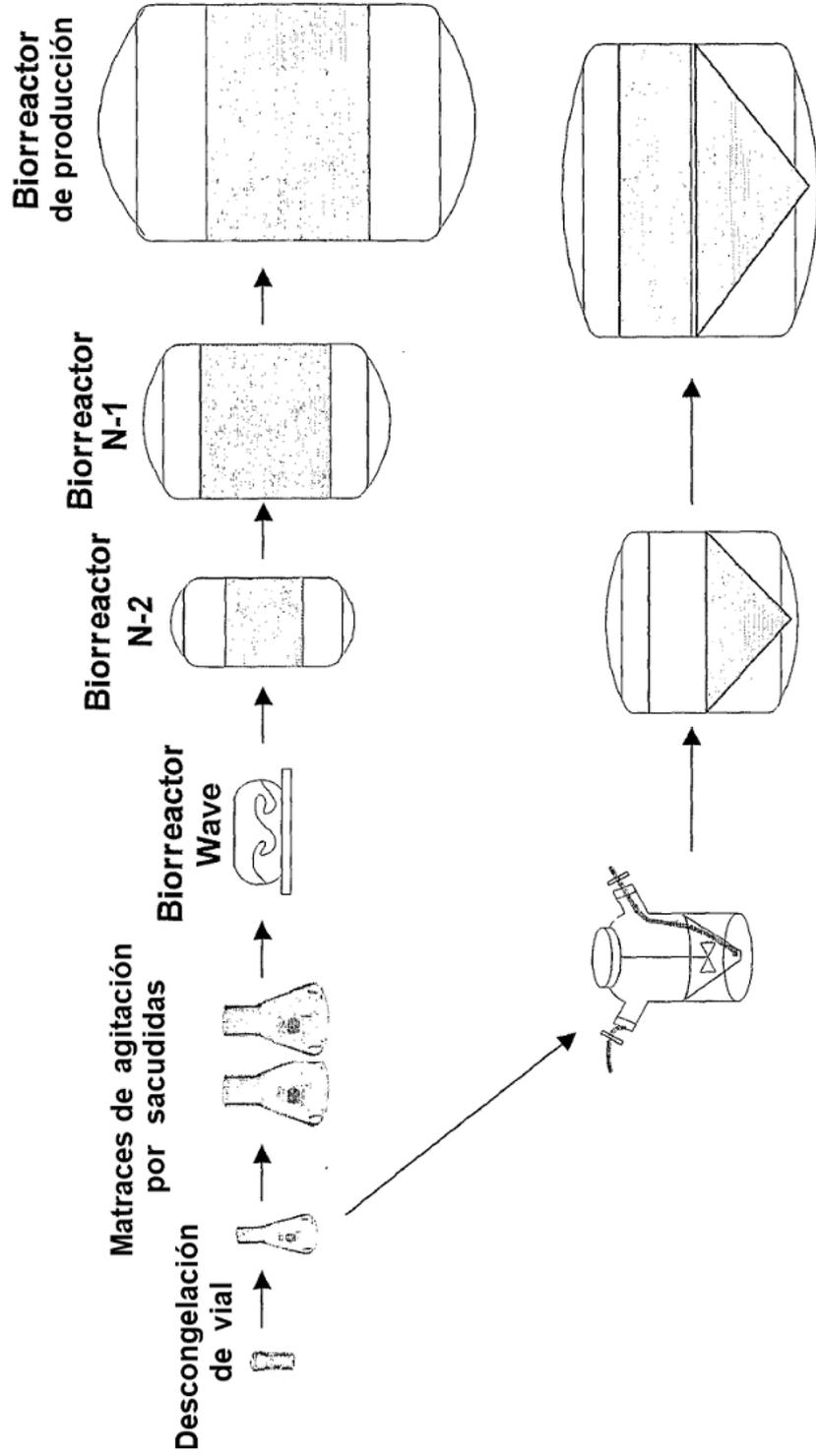


Figura 4a: Problemas de escalamiento y factores que afectan negativamente a la optimización del escalamiento, relacionados con la mezcla, fuerza de cizalladura, estrés hidromecánico, aireación y arrastre de CO_2 , de biorreactores industriales de tanque agitado de cilindro alto

- Agitación: proporcionar suficiente mezcla y evitar daño celular por cizalladura
- Aireación: aporte de oxígeno y eliminación de dióxido de carbono en exceso

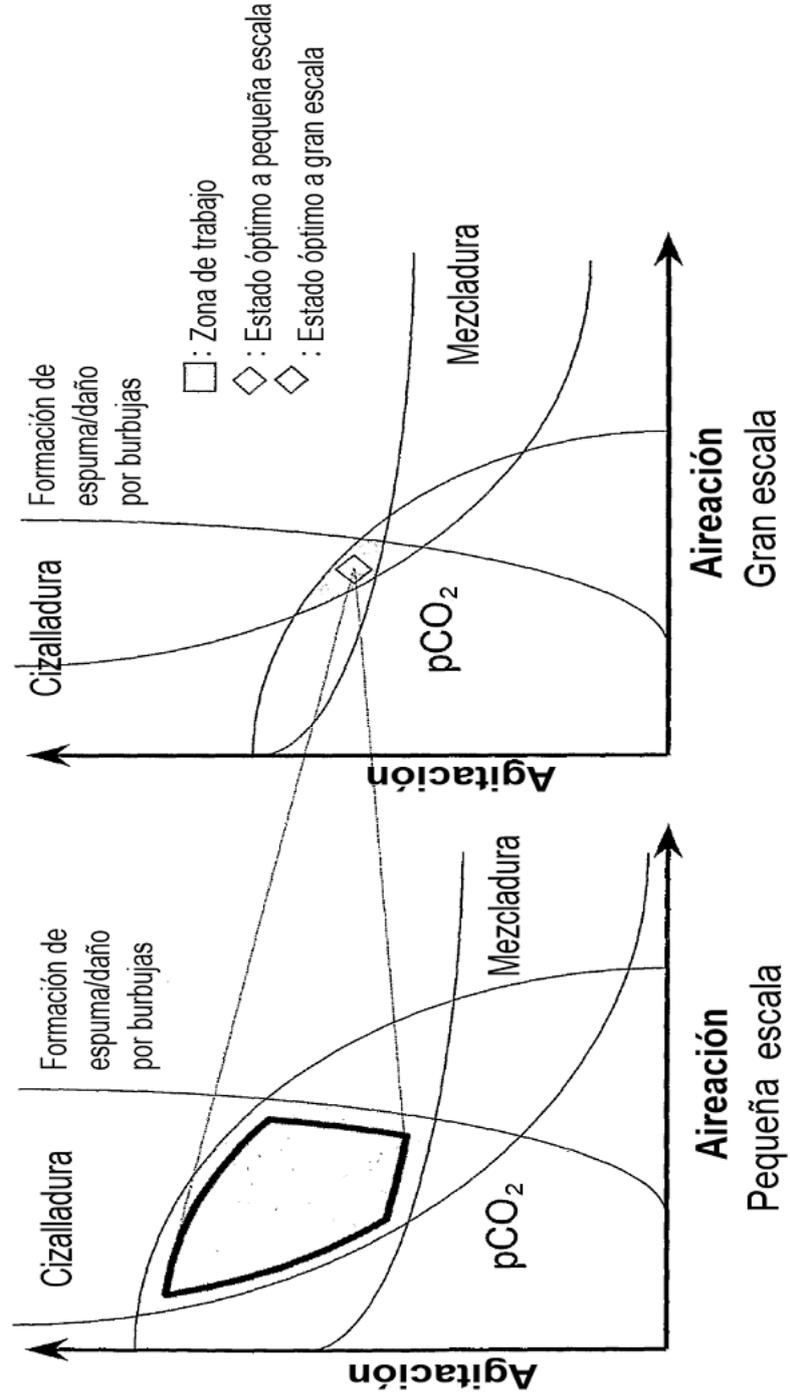


Figura 4b: Ventajas de recipientes de biorreactor de cuerpo ancho con fondo troncocónico invertido para cultivo celular industrial a gran escala

- Una gran área de superficie puede mejorar la transferencia de oxígeno y la eliminación de CO₂
- Menos daño celular por estallido de burbujas, menos formación de espuma, elevado arrastre de CO₂
- Fácil escalamiento, funcionamiento robusto

