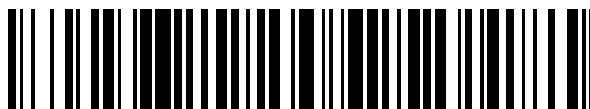


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 874**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/36 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2010 PCT/US2010/041082**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11005773**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2010 E 10730960 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 2451936**

54 Título: **Procedimiento de cultivo de células eucariotas**

30 Prioridad:

06.07.2009 US 223313 P

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

06.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BASKAR, DINESH;
HSIUNG, JENNY;
LEUNG, WOON-LAM, SUSAN y
YUK, INN, H.**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 752 874 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

Procedimiento de cultivo de células eucariotas

5 **REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/223.313, presentada el 6 de julio de 2009.

10 **CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a un aparato y procedimiento para cultivar células eucariotas en un medio que contiene bicarbonato que permite el mantenimiento del pH del cultivo celular sin la adición de bases directamente al medio de cultivo.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El cultivo de células para bancos de células, para la producción de productos celulares, tales como la producción de proteínas recombinantes, se ve obstaculizado por las condiciones cambiantes a medida que las células crecen. Aunque frecuentemente se usan biorreactores de acero inoxidable para la producción celular, el material desechable se usa cada vez más en todos los pasos en la fabricación de productos biológicos (Rao *et al.*, 2009). En el procesamiento corriente arriba, los biorreactores desechables ofrecen muchas ventajas sobre sus homólogos de acero inoxidable (abarcando desde la reducción de los riesgos de contaminación cruzada hasta el ahorro de costes y tiempo). El WAVE Bioreactor™ es un ejemplo bien documentado de tecnología desechable corriente arriba usada para la producción de proteínas recombinantes en la industria biofarmacéutica (Cronin *et al.*, 2007; Haldankar *et al.*, 2006; Ling *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2009).

El sistema WAVE Bioreactor™, como se desarrolla por Singh (Singh, 1999), comprende una cámara de cultivo preesterilizada, flexible y desechable (Cellbag™), controladores de mezcla de aire con CO₂ y/o O₂ y una plataforma controlada de forma neumática para someter a oscilación y calentar la Cellbag™. El movimiento de oscilación generado por esta plataforma proporciona la mezcla y transferencia de gas en la Cellbag™.

El sistema WAVE Bioreactor™ se puede equipar además para proporcionar en línea la monitorización y la autorregulación en tiempo real del pH y oxígeno disuelto (OD) (Mikola *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2007). Sin embargo, los dispositivos adicionales requeridos, así como la necesidad de usar bolsas diseñadas especialmente para acomodar las sondas de pH y OD, incrementan el coste de funcionamiento y la complejidad de este sistema. Además, la adición de bases requerida para elevar el pH del cultivo al punto de ajuste definido en los biorreactores controlados por pH incrementa la osmolalidad del cultivo. Dependiendo del grado del incremento de la osmolalidad en el biorreactor, la disminución asociada en el crecimiento y viabilidad celulares (deZengotita *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2005) pueden compensar los beneficios del control del pH. Además, si la sonda de pH no funciona correctamente, las perturbaciones del pH resultante pueden alterar el metabolismo celular y promover la muerte celular (Miller *et al.*, 1988; Osman *et al.*, 2002).

Puede que no sean necesarios estrictos controles del pH y OD para determinadas aplicaciones de cultivos celulares, tales como, por ejemplo, el pase rutinario de células en sistemas de cultivo a pequeña escala, tales como matraces de agitación enérgico y centrifugadoras, para el mantenimiento y la expansión celulares. Sin embargo, los extremos de pH y OD son perjudiciales para el crecimiento y viabilidad celulares (Lin *et al.*, 1993; Link *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 1988; Osman *et al.*, 2001) y pueden afectar a la calidad del producto (Restelli *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2005). Por lo tanto, es de vital importancia mantener cierto control sobre dichas condiciones de crecimiento de las células para todos los pasos de la fabricación de productos biológicos. Los investigadores demostraron previamente el éxito en el cultivo de células CHO en un intervalo de pH de 6,8-7,3 y en el intervalo de OD de un 10-100 % de saturación de aire (Link *et al.* 2004; Restelli *et al.* 2006; Trummer *et al.* 2006; Yoon *et al.* 2005). El documento US 6 190 913 B1 describe un procedimiento para cultivar células usando agitación inducida por ondas. El documento EP 0 147 975 A2 describe un procedimiento y aparato para el cultivo de células animales. El documento DE 36 06 449 A1 describe un sistema de control de fermentador. El documento EP 2 020 433 A2 describe un sistema de biorreactor de perfusión continua. El documento EP 0 200 226 A1 describe un procedimiento para la determinación de los efectos de los agentes quimioterápicos sobre el crecimiento de microorganismos y/o células. El documento WO 2005/118771 A2 describe sistemas y procedimientos de biorreactor desechable. El documento US 3 941 662 A describe un aparato para cultivar células.

Los rasgos característicos añadidos de los biorreactores convencionales, tales como los monitores para el pH y el control por monitorización del OD en tiempo real, aumentan significativamente el coste y la mano de obra intensiva del cultivo celular en la fabricación biológica. Además, el fallo o mal funcionamiento de estos rasgos característicos puede provocar variaciones inaceptables y la pérdida potencial del cultivo celular, lo que es muy costoso en tiempo y recursos.

Por tanto, existe la necesidad de obtener procedimientos mejorados para cultivar células eucariotas sin la necesidad de introducir bases fuertes, y sin monitorización y control en tiempo real del pH y OD.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona un procedimiento para cultivar por lotes células eucariotas que comprende: proporcionar un inoculante de cultivo celular que comprende células eucariotas en un líquido de cultivo que contiene bicarbonato en un recipiente, teniendo dicho recipiente paredes que encapsulan dicho cultivo celular y un espacio libre superior en fase gaseosa por encima de dicho cultivo celular, y en el que dicho recipiente comprende al menos un orificio que proporciona una entrada y un escape de gas a y desde dicho espacio libre superior; agitar dicho recipiente; y proporcionar gas a dicho espacio libre superior a través de dicho orificio, en el que dicho gas contiene una cantidad de CO₂, y en el que dicha cantidad de CO₂ en dicho gas se modula con el tiempo para ajustar el pH de dicho cultivo celular para mantener un pH predeterminado de dicho cultivo celular, en el que dicho CO₂ se proporciona en una cantidad de un 8 % (v/v) de dicho gas en el día 1, en una cantidad de un 5 % (v/v) de dicho gas en el día 2 y en una cantidad de un 2 % (v/v) de dicho gas después de esto.

En un modo de realización, dicha agitación es por oscilación de dicho recipiente a una tasa de oscilación de 15 a 30 rpm y un ángulo de oscilación de 5° a 15°.

En un modo de realización, la tasa de oscilación es de entre 19 y 25 rpm y el ángulo de oscilación es de entre 8° y 12°.

En un modo de realización, la tasa de liberación de dicho gas es de entre 0,002 y 0,1 volumen del espacio libre superior por minuto (hvm).

En un modo de realización, la tasa de liberación de dicho gas es de entre 0,007 y 0,08 hvm.

En un modo de realización, la tasa de liberación de dicho gas es de entre 0,007 y 0,02 hvm.

En un modo de realización, dichas células eucariotas son células de vertebrado.

En un modo de realización, dichas células de vertebrado se seleccionan del grupo que consiste en células de rana, células de conejo, células de roedor, células de oveja, células de cabra, células de perro, células de gato, células de vaca, células de caballo, células de primate no humano y células de ser humano.

En un modo de realización, dicho recipiente es un envase rígido.

En un modo de realización, dicho recipiente es un envase elástico.

En un modo de realización, dicho recipiente es una bolsa de cultivo desechable.

En un modo de realización, el procedimiento comprende además monitorizar de forma intermitente el pH del cultivo celular.

En un modo de realización, se proporciona dicho gas a dicho espacio libre superior de modo que el cultivo celular mantenga una presión parcial del CO₂ disuelto a un nivel de aproximadamente 1 a 200 mmHg.

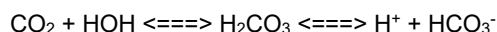
En un modo de realización, se proporciona dicho gas a dicho espacio libre superior de modo que el cultivo celular mantenga una presión parcial del CO₂ disuelto a un nivel de aproximadamente 10 a 150 mmHg.

En un modo de realización, se proporciona dicho gas a dicho espacio libre superior de modo que el cultivo celular mantenga una presión parcial del CO₂ disuelto a un nivel de aproximadamente 20 a 120 mmHg.

En un modo de realización, se proporciona dicho gas a dicho espacio libre superior de modo que el cultivo celular mantenga una presión parcial del CO₂ disuelto a un nivel de aproximadamente 20 a 80 mmHg.

SUMARIO DE OTROS ASPECTOS DE LA DIVULGACION

La divulgación proporciona un aparato y la invención proporciona un procedimiento para mantener el pH en un sistema de cultivo celular sin la adición de base. En un medio de cultivo celular que contiene bicarbonato, la cantidad de CO₂ en el medio afecta al pH del medio, en base al equilibrio con tampón ácido carbónico-bicarbonato (ecuación 1):



$$\text{pH} = \text{pK} - \log\left(\frac{[\text{CO}_2]}{[\text{HCO}_3^-]}\right)$$

Por tanto, la invención explota esta relación para ajustar el pH del medio de cultivo celular sin la necesidad de añadir ácidos o bases fuertes incrementando o disminuyendo la concentración de CO₂ disuelto usando la interfase dinámica de una fase líquida y una fase gaseosa de un sistema de cultivo celular. La invención proporciona un procedimiento para lograr esta modulación y se divulga además un aparato para poner en práctica el procedimiento.

En general, el aparato de la divulgación se suministra con aire, oxígeno o una combinación de estos gases para mantener el oxígeno disuelto del cultivo celular. Proporcionando una mezcla de gases (que se puede manipular en términos de su composición y tasa de introducción) al espacio libre superior del aparato, CO₂ se puede añadir a o retirar del medio de cultivo celular dependiendo de la concentración diferencial de CO₂ entre la fase líquida y gaseosa. La retirada de CO₂ del espacio libre superior incrementará el pH del cultivo a medida que el CO₂ disuelto en el medio se difunde por el espacio libre superior. Por el contrario, cuando se añade CO₂ al aparato a una concentración que sea más alta que la del medio, el CO₂ se disolverá en el medio y el pH del cultivo disminuirá. La presente invención proporciona un procedimiento que permite la transferencia de CO₂ dentro y fuera del cultivo celular para mantener el pH del cultivo sin adición de base.

Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para cultivar células eucariotas que comprende células eucariotas en un líquido de cultivo que contiene bicarbonato en un recipiente, en el que el recipiente tiene paredes que encapsulan el cultivo celular y un espacio libre superior en fase gaseosa por encima de dicho cultivo celular. El recipiente también comprende al menos un orificio que proporciona una entrada y un escape de gas desde dicho espacio libre superior. El recipiente se agita para proporcionar una interfase dinámica entre la fase líquida y la fase gaseosa. Se puede monitorizar el pH del cultivo y se proporciona un gas al espacio libre superior a través de dicho orificio, en el que el gas contiene una cantidad de CO₂ para efectuar una disminución del pH a medida que más CO₂ se disuelve en el cultivo celular, o el CO₂ acumulado se retira del espacio libre superior a través del orificio para efectuar un incremento del pH del cultivo celular. Por tanto, el pH se mantiene a un intervalo predeterminado.

En general, la presión parcial del CO₂ disuelto en el medio de cultivo celular se mantiene a una cantidad de 1 a 200 mmHg. En algunos modos de realización, la presión parcial del CO₂ disuelto es de 10 a 180 mmHg. En algunos modos de realización, la presión parcial del CO₂ disuelto es de 20 a 150 mmHg. En algunos modos de realización, la presión parcial del CO₂ disuelto es de 100-180 mmHg. En algunos modos de realización, la presión parcial del CO₂ disuelto es de 20 a 80 mmHg. En algunos modos de realización, la presión parcial del CO₂ disuelto es de 30 a 60 mmHg. En algunos modos de realización, la presión parcial del CO₂ disuelto es de 35 a 50 mmHg. En algunos modos de realización, la presión parcial del CO₂ disuelto es de 40 mmHg.

Se puede realizar la liberación del espacio libre superior de forma continua o intermitente.

En general, el OD se mantiene por encima de un 10 %. En algunos modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 20 %. En algunos modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 30 %. En algunos modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 40 %. En algunos modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 50 %. En algunos modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 60 %.

En algunos modos de realización, el caudal de gas en el recipiente es de 0,001 volumen del espacio libre superior por minuto (hvm). En algunos modos de realización, el caudal de gas en el recipiente es de 0,005 hvm. En algunos modos de realización, el caudal de gas en el recipiente es de 0,01 hvm. En algunos modos de realización, el caudal de gas en el recipiente es de 0,02 hvm. En algunos modos de realización, el caudal de gas en el recipiente es de 0,05 hvm. En algunos modos de realización, el caudal de gas en el recipiente es de 0,1 hvm. En algunos modos de realización, el caudal de gas en el recipiente es de 0,2 hvm. En algunos modos de realización, el caudal de gas en el recipiente es de 0,5 hvm. En algunos modos de realización, el caudal de gas en el recipiente es de 0,9 hvm. En algunos modos de realización, el caudal de gas en el recipiente es de 1,0 hvm.

Las células eucariotas pueden ser células de vertebrado, tales como, pero sin limitarse a, células de ranas, conejos, roedores, ovejas, cabras, perros, gatos, vacas, caballos, cerdos, primates no humanos o seres humanos.

El procedimiento se puede realizar en un recipiente que tenga paredes rígidas o elásticas, tal como un envase de plástico o bolsa de cultivo desechable.

El recipiente se puede agitar por cualquier medio que proporcione una interfase dinámica entre la fase líquida y la fase gaseosa en el recipiente. Dicha agitación puede ser, por ejemplo, por oscilación, un movimiento orbital, un movimiento en forma de ocho, movimiento de rotación, agitación energética y similares.

En algunos modos de realización, la agitación se realiza por oscilación. La velocidad de oscilación y el ángulo de oscilación se pueden ajustar para lograr la agitación deseada. En algunos modos de realización, el ángulo de oscilación es de 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° o 1°. En determinados modos de realización, el ángulo de oscilación es de entre 6-16°. En otros modos de realización, el ángulo de oscilación es de entre 7-16°. En otros modos de realización, el ángulo de oscilación es de entre 8-12°.

En algunos modos de realización, la tasa de oscilación es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 rpm. En algunos modos de realización, la tasa de oscilación es de entre 19-25 rpm. En algunos modos de realización, la tasa de oscilación es de entre 20-24 rpm. En algunos modos de realización, la tasa de oscilación es de entre 21-23 rpm.

El procedimiento se puede realizar en tanto que el recipiente contenga un único orificio que permita la admisión y el escape de gas desde el espacio libre superior del cultivo. De forma alternativa, el recipiente puede contener una pluralidad de orificios.

El pH del cultivo se monitoriza de forma continua o bien intermitente y se infunde gas en el espacio libre superior de modo que se proporcione el nivel de CO₂ del gas al espacio libre superior para incrementar o bien disminuir la concentración de CO₂ disuelto en la fase líquida del cultivo de modo que el pH de la fase líquida se ajuste a un valor predeterminado.

En un modo de realización alternativo, el procedimiento puede incluir una etapa de perfusión del medio de cultivo recién preparado en el cultivo celular a través de un orificio para el medio. El medio recién preparado tiene un pH que proporciona el ajuste del pH global del cultivo celular tras la adición, de modo que el pH del medio recién preparado mantenga parcialmente el cultivo celular a un intervalo de pH predeterminado. La modulación del pH usando un medio recién preparado que tenga un pH predeterminado es útil en el procedimiento de cultivo, pero no es suficiente para controlar completamente el pH.

El procedimiento es adaptable para cultivos de cualquier tamaño. En algunos modos de realización, el procedimiento se realiza en bolsas de biorreactor desechables que están disponibles comercialmente. Dichas bolsas de biorreactor están disponibles en volúmenes tales como 500 ml, 1 l, 2 l, 10 l, 20 l, 50 l, 100 l, 200 l, 500 l y 1000 l.

Se pueden monitorizar y controlar diversos parámetros del cultivo. Dichos parámetros se pueden controlar en un procedimiento automatizado a medida que los cálculos se realizan por un ordenador. Algunos parámetros que se pueden controlar, solos o en combinación, incluyen, pero no se limitan a, flujo de gas, pH, concentración de CO₂ disuelto, temperatura y agitación.

La divulgación también proporciona un aparato para realizar el procedimiento de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** muestra un ejemplo de un aparato de la divulgación que incluye un filtro de perfusión. El aparato incluye un orificio de entrada y un orificio de salida para gas, un orificio para proporcionar medio recién preparado al cultivo, un filtro de perfusión para retirar el medio consumido, una placa de oscilación y una base. El movimiento de oscilación permite que la agitación proporcione una transferencia eficaz de O₂ y CO₂ dentro y fuera del medio de cultivo celular.

La **figura 2** muestra estudios libres de células para medir la transferencia de oxígeno en el WAVE Bioreactor™. (Panel A) Efecto de la tasa de oscilación y ángulo de oscilación sobre k_{La} a un caudal de aire constante de 0,2 l/min; (panel B) efecto de la tasa de oscilación, ángulo de oscilación y caudal de aire sobre k_{La}; (panel C) datos brutos para OD para un diferente ángulo de oscilación, tasa de oscilación y un caudal de aire constante de 0,2 l/min (también denominado en el presente documento lpm); (panel D) datos brutos para el transcurso de tiempo para OD para dos puntos de ajuste de oscilación diferentes con diferentes caudales de gas.

La **figura 3** muestra estudios libres de células para evaluar la tasa de separación por extracción de CO₂ en el WAVE Bioreactor™. (Panel A); datos brutos para la elevación del pH para un diferente ángulo de oscilación, tasa de oscilación con un caudal de gas constante de 0,2 lpm; (panel B) datos brutos para el transcurso de tiempo para la elevación del pH para dos puntos de ajuste de oscilación diferentes con diferentes caudales de gas. (Panel C) Tasa calculada de cambio de pH para diferentes condiciones de oscilación mostradas en el panel A; (panel D) tasa calculada de cambio de pH para las diferentes condiciones de oscilación y diferentes caudales de gas que se muestran en el panel B. Las barras coloreadas son la tasa de cambio de pH durante los primeros 5 minutos y las barras no coloreadas son la tasa calculada de cambio de pH durante los siguientes 55 minutos.

La **figura 4** muestra (panel A) la CCV, (panel B) el pH fuera de línea, (panel C) la pCO₂ fuera de línea y (panel D) los perfiles de OD fuera de línea para cultivos por lotes en el WAVE Bioreactor™. Las condiciones del procedimiento se resumen en la tabla 2 a continuación. Solo el paso de inoculación se evaluó para (i) la línea celular que producía MAb B, mientras que tanto los pasos de inoculación como de aumento de escala (durante los que el volumen de trabajo se incrementó de 6 l a 20 l) se evaluaron para (ii) la línea celular que producía MAb C. Durante cada paso, el aire bombeado en el espacio libre superior se complementó con CO₂ a un 8 % (v/v) durante el primer día, a un 5 % (v/v) durante el segundo día y a un 2 % (v/v) después de esto.

La **figura 5** muestra (panel A) la CCV, (panel B) la viabilidad del cultivo, (panel C) el pH fuera de línea y (panel D) la concentración de OD para dos cultivos por perfusión en el WAVE Bioreactor™ usando la línea celular que produce

el desarrollo de MAb A en condiciones no optimizadas. Las células se cultivaron en modo por lotes durante los primeros 6 días y en modo por perfusión después de esto. Durante el cultivo por lotes, el volumen de trabajo en Cellbag™ se inoculó en primer lugar con 6 l de cultivo, y en el día 3, este volumen de cultivo se incrementó a 25 l por la adición de medio recién preparado. Durante el cultivo por perfusión, el volumen de cultivo se mantuvo a 25 l a una tasa de perfusión de 1 volumen por día. Para este conjunto de experimentos, la tasa de oscilación fue de 18 rpm y el ángulo de oscilación fue de 8 grados, mientras que la tasa del flujo de aire en el espacio libre superior fue de 0,2 l/min. Este aire se complementó con un CO₂ al 5 % (v/v) durante toda la duración del cultivo.

La **figura 6** muestra el perfil de crecimiento del cultivo celular y el perfil de pH para un procedimiento por lotes (días 0-6)/por perfusión (días 6-14). (Panel A) Hematocrito en % de PCV; (panel B) viabilidad celular; (panel C) perfil de pH; (panel D) crecimiento celular en el recuento de células viables (CCV) medido por ViCell™ AS.

La **figura 7** muestra el rendimiento del cultivo a partir de tasas de liberación del espacio libre superior (hvm). El (panel A) muestra 2 experimentos con un incremento en una etapa en el flujo de aire, lo que efectúa un incremento de la tasa de liberación del espacio libre superior (0,1 hvm en (◆) y 0,02 hvm (▲)). La otra estrategia para la tasa de liberación del espacio libre superior son los incrementos en muchas etapas (de 0,007 hvm a 0,013 hvm a 0,02 hvm) (■) en los días 10 y 11. (Panel B) La presión parcial del CO₂ disuelto medida por NOVA BioProfile® 400.

La **figura 8** muestra (panel A) la CCV, (panel B) la viabilidad del cultivo, (panel C) el pH fuera de línea y (panel D) el OD para cultivos en el WAVE Bioreactor™ de seis líneas celulares diferentes, produciendo cada una un MAb diferente usando el procedimiento optimizado. Durante el paso de inoculación de 6 l, los cultivos se sometieron a oscilación a 21 rpm y la tasa del caudal de aire en el espacio libre superior fue de 0,2 l/min. Este aire se complementó con CO₂ a un 8 % (v/v) durante el primer día, a un 5 % (v/v) durante el segundo día y a un 2 % (v/v) después de esto. Esta estrategia para el flujo de aire se repitió para el paso de aumento de escala a 20 l (días 3-6). Durante el cultivo en modo por perfusión con 20 l (día 6 en adelante), la tasa del flujo de aire en el espacio libre superior se mantuvo a 0,6 l/min sin complementación con CO₂, mientras que la combinación de O₂ con aire en el gas de entrada se incrementó de un 0 % (v/v) a un 30 % (v/v) en el día 8, y se mantuvo a un 30 % (v/v) durante la duración restante del cultivo. Los cultivos por lotes y por perfusión de 20 l se sometieron a oscilación a 23 rpm. El ángulo de oscilación para todos los cultivos fue constante a 10°.

La **figura 9** muestra (panel A) la CCV, (panel B) la viabilidad, (panel C) el pH fuera de línea y (panel D) el OD fuera de línea para cultivos paralelos de una línea celular que produce MAb E en el WAVE Bioreactor™ (●) y biorreactor con depósito agitado (□).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El experto en la técnica está bien informado de los muchos protocolos y procedimientos para cultivar células eucariotas, y puede cultivar medios para las mismas. Dichos protocolos y medios de cultivo se describen en la literatura y en los libros de texto, tales como en ANIMAL CELL CULTURE, A PRACTICAL APPROACH 2.^a ED., Rickwood, D. y Hames, B.D., eds., Oxford University Press, Nueva York (1992). También están disponibles procedimientos de uso general en internet, tales como en: protocol-online.org/prot/Cell_Biology/Cell_Culture. También está disponible comercialmente el medio de cultivo celular de una variedad de fuentes bien conocidas.

Definiciones

Las técnicas y procedimientos generales de cultivo celular descritos o a los que se hace referencia en el presente documento se entienden bien y se emplean comúnmente usando una metodología convencional por los expertos en la técnica. Según sea apropiado, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles comercialmente se llevan a cabo, en general, de acuerdo con protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante a menos que se advierta de otro modo.

Antes de que se describan los presentes procedimientos, se debe entender que la presente invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales, construcciones y reactivos particulares descritos, ya que, como tales, por supuesto, pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento solo es para el propósito de describir modos de realización particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención que solo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Se debe advertir que como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes al plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Se entiende que todos los números enumerados en la memoria descriptiva y reivindicaciones asociadas (por ejemplo, de 1 a 200 mmHg, etc.) están modificados por el término "aproximadamente".

Se citan las publicaciones citadas en el presente documento para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada aquí se debe interpretar como una afirmación de que los inventores no tienen derecho a asignar una fecha anterior a las publicaciones en virtud de una fecha de prioridad inicial o una fecha de invención

anterior. Además, las fechas de publicación reales pueden ser diferentes de las mostradas y requieren una verificación independiente.

5 Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" se refiere a un valor que es un 10 % más o menos que un valor establecido.

10 Como se usa en el presente documento, "agitar" se refiere a perturbar de modo que la fase líquida del cultivo esté en interacción dinámica con la fase gaseosa por encima del cultivo. Agitar se puede referir a un movimiento tal como agitación enérgica, remoción, oscilación, agitación enérgica orbital, balanceo, agitación enérgica en forma de
ocho o cualquier otro medio para hacer que la fase líquida no sea estática e incrementar la difusión de gases dentro y fuera de la fase líquida.

15 Como se usa en el presente documento, "gas" se refiere a un gas puro o mezcla de gases que puede incluir nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono. Típicamente, está presente nitrógeno en una cantidad de aproximadamente un 60 a un 90 % de la concentración de gas total, está presente oxígeno en una cantidad de aproximadamente un 10 a un 40 % de la concentración de gas total y está presente dióxido de carbono en una cantidad de aproximadamente un 0 a un 50 % de la concentración de gas total.

20 Como se usa en el presente documento, "líquido de cultivo celular que contiene bicarbonato" se refiere a un medio de cultivo adecuado para cultivar células eucariotas que contiene, como parte de su composición, un sistema tamponador con bicarbonato. El medio también puede contener agentes tamponadores adicionales, tales como HEPES o MOPS, o similares, pero también debe contener un sistema basado en bicarbonato.

25 Como se usa en el presente documento, "cultivo celular" se refiere a una preparación líquida que contiene células eucariotas en un medio líquido que contiene agentes tamponadores y nutrientes requeridos para el crecimiento y/o mantenimiento de células viables.

30 Como se usa en el presente documento, la "concentración de CO₂ disuelto" se expresa por la presión parcial de medida relativa del CO₂ en mmHg. Por lo tanto, se usa la presión parcial del CO₂ disuelto como un reflejo de la concentración de CO₂ disuelto.

"OD" se refiere a oxígeno disuelto.

35 Como se usa en el presente documento, "interfase dinámica" se refiere a un intercambio activo potenciado de gases entre la fase líquida y la fase gaseosa proporcionado por agitación del cultivo celular.

Como se usa en el presente documento, "células eucariotas" se refiere a células animales que pueden ser células de invertebrado o vertebrado.

40 Como se usa en el presente documento, "espacio libre superior" se refiere a una fase gaseosa por encima de la fase líquida del cultivo celular con el recipiente usado para cultivar células.

45 Como se usa en el presente documento, hvm se refiere al volumen del espacio libre superior por minuto e indica la tasa a la que se libera gas en el espacio libre superior.

k_{La} se refiere al coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

$k_{La}^{CO_2}$ se refiere al coeficiente volumétrico de transferencia de dióxido de carbono.

50 Lpm se refiere a litros por minuto de flujo de gas.

Como se usa en el presente documento, "modular" se refiere a efectuar un incremento o disminución de un valor.

55 Como se usa en el presente documento, "monitor" se refiere al seguimiento de un valor particular por muestreo y análisis para determinar dicho valor de forma intermitente o continua.

pCO₂ se refiere a la presión parcial de la concentración de CO₂ disuelto.

60 Como se usa en el presente documento, "orificio" se refiere a un punto de acceso a un sistema de otro modo cerrado.

Como se usa en el presente documento, "predeterminado" se refiere a un valor seleccionado con antelación para un parámetro particular que se usa como un valor final.

65 Como se usa en el presente documento, "rpm" se refiere a oscilaciones por minuto.

CCV se refiere a la concentración de células viables.

Como se usa en el presente documento, "recipiente" se refiere a un envase. Como como se usa en el presente documento, dicho recipiente puede ser, por ejemplo, un matraz, biorreactor, bolsa de biorreactor desechable, cámara de cultivo y similares.

Como se usa en el presente documento, "vvm" se refiere al volumen del recipiente por minuto.

ASPECTOS TEÓRICOS

Transferencia de O₂ en el cultivo en el WAVE Bioreactor™

Para determinar la tasa de transferencia de O₂ en el WAVE Bioreactor™, se supone un tiempo de respuesta suficientemente rápido para la sonda de OD en línea, una mezcla ideal en la Cellbag™ y un dominio de la resistencia a la transferencia de masa por la interfase de fase líquida. Con estos supuestos, la siguiente ecuación de equilibrio de masas aproximaría la tasa de transferencia de O₂ desde la fase gaseosa a la fase líquida:

$$\frac{dO_2}{dt} = k_L a \bullet (O_2^* - O_2) \quad (1)$$

donde O₂^{*} es la concentración de OD saturado en el medio y O₂ es la concentración de OD en el medio. Tomando O₂ como cero en el tiempo cero, la ecuación proporcionaría:

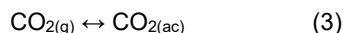
$$\ln \left(\frac{O_2^*}{O_2^* - O_2} \right) = k_L a \bullet t \quad (2)$$

Trazando $\ln \left(\frac{O_2^*}{O_2^* - O_2} \right)$ como una función del tiempo, la pendiente de la línea de mejor ajuste proporcionaría el k_La para el sistema.

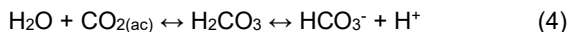
Para incrementar la tasa de transferencia de O₂ en el WAVE Bioreactor™ (ecuación 1), se podría incrementar el k_La para el sistema o incrementar el gradiente de concentración (O₂^{*} - O₂), o incrementar ambos. Para incrementar el k_La para el sistema WAVE Bioreactor™, se podrían incrementar la tasa de oscilación, el ángulo de oscilación o el caudal de aire (Mikola, 2007; Singh, 1999). Para incrementar el gradiente de concentración (O₂^{*} - O₂) que proporciona la fuerza impulsora para la transferencia de O₂ desde la fase gaseosa a la líquida, se podría incrementar el porcentaje de O₂ en el gas de entrada para incrementar el O₂^{*}.

Transferencia de CO₂ en el cultivo en el WAVE Bioreactor™

En un modelo simplificado, CO₂ gaseoso (CO_{2(g)}) en la Cellbag™ existe en equilibrio con CO₂ disuelto (CO_{2(ac)}) en el medio de cultivo:



El CO_{2(ac)}, a su vez, existe en equilibrio con ácido carbónico (H₂CO₃), que se puede disociar en bicarbonato (HCO₃⁻):



La disociación adicional del HCO₃⁻ en carbonato (CO₃²⁻) debería ser insignificante en el intervalo de pH 4-8 (Royce y Thornhill, 1991).

La etapa limitante de la tasa para el desprendimiento del CO₂ desde el medio de cultivo debe ser la transferencia de masa gas-líquido (ecuación 3). Suponiendo que la concentración de CO₂ en el líquido en la interfase estuviera en equilibrio con la del gas a granel, la siguiente ecuación de equilibrio de masas aproximaría la tasa de transferencia de CO₂ desde la fase líquida a la fase gaseosa:

$$\frac{dCO_{2(ac)}}{dt} = k_L a^{CO_2} \bullet (CO_{2(ac)}^* - CO_{2(g)}) \quad (5)$$

donde k_La^{CO₂} es el coeficiente volumétrico de transferencia de dióxido de carbono disuelto.

Sin una sonda de CO₂ disuelto en el WAVE Bioreactor™, no se podrían realizar mediciones de CO₂ en tiempo real para calcular directamente la tasa de transferencia de CO_{2(ac)}. Sin embargo, en base al conocimiento de los inventores sobre el sistema tamponador con bicarbonato en su medio de cultivo, se espera que la separación por extracción de CO₂ incremente el pH del cultivo debido a que los equilibrios en las ecuaciones 3 y 4 se desplazarían hacia la izquierda. Suponiendo un tiempo de respuesta suficientemente rápido para la sonda de pH en línea, el perfil de pH que genera en un estudio dinámico de transferencia de CO_{2(ac)} debería proporcionar una estimación indirecta de la tasa de separación por extracción de CO_{2(ac)}.

Para incrementar el pH del cultivo, se podría incrementar la tasa de separación por extracción de CO₂ en el WAVE Bioreactor™ (ecuación 5) incrementando el $k_{La}^{CO_2}$ para el sistema o bien incrementando la fuerza impulsora (CO_{2(ac)} - CO_{2(g)}) para la transferencia de CO₂, o incrementando ambos. Específicamente, para incrementar $k_{La}^{CO_2}$ para el sistema WAVE Bioreactor™, se podrían incrementar la tasa y el ángulo de oscilación. Para incrementar la fuerza impulsora (CO_{2(ac)} - CO_{2(g)}), se podría disminuir el porcentaje de CO₂ en el gas de entrada para disminuir el CO_{2(g)}. De acuerdo con la ley de Henry, la presión parcial del CO_{2(g)} (pCO_{2(g)}) en el espacio libre superior de Cellbag™ limitaría la concentración de CO_{2(ac)} en el medio:

$$CO_{2(ac)} = \frac{pCO_{2(g)}}{H} \quad (6)$$

donde H = constante de la ley de Henry para CO₂.

Por el contrario, para disminuir el pH del cultivo, se podría incrementar la concentración de CO_{2(g)} en el gas de entrada para incrementar el CO_{2(ac)}, y, de este modo, desplazar los equilibrios en la ecuación 4 hacia la derecha.

Procedimiento de la invención

En el procedimiento de la invención, las células eucariotas se cultivan en un medio de cultivo y temperatura adecuados para permitir la viabilidad de las células. Como se conoce por un experto en la técnica, se pueden cultivar diferentes tipos de células en diferentes medios. El experto en la técnica puede elegir fácilmente qué medio es el más adecuado para un tipo de célula particular y/o aplicación particular. En el procedimiento de la invención, el medio debe contener un sistema tamponador con bicarbonato para permitir la modulación del pH por el CO₂. El medio puede contener agentes adicionales que actúen como un tampón.

Las células eucariotas que se pueden usar en el procedimiento de la invención incluyen células animales, que pueden ser células de invertebrado, así como de vertebrado. Las células de invertebrado incluyen células de insecto (por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda*, *Bombyx mori* y *Trichoplusia ni*). Las células de vertebrado incluyen células de mamífero y no mamífero. Las células de vertebrado incluyen, pero no se limitan a, células de ranas (por ejemplo, *Xenopus laevis*), lagomorfos (por ejemplo, conejos y liebres), roedores (por ejemplo, ratas, hámsteres, jerbos de Mongolia, jerbos y ratones), gatos, perros, ovejas, ganado bovino, cabras, cerdos, caballos, primates no humanos y seres humanos.

Las células usadas en el procedimiento de la invención pueden ser células recombinantes o no recombinantes. Las células recombinantes pueden incluir células genomanipuladas para expresar proteínas particulares (tales como las células transfectadas de forma estable o transitoria), o células genomanipuladas para producir ARN particulares (por ejemplo, ARNip, ribocimas y similares).

Las células en el medio apropiado se disponen en el recipiente de cultivo y se infunde gas en el espacio libre superior. En algunos modos de realización, la tasa de liberación del espacio libre superior está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,002 a 0,1 hvm. En algunos modos de realización, la tasa de liberación del espacio libre superior está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,007 a 0,08 hvm. En algunos modos de realización, la tasa de liberación del espacio libre superior está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,009 a 0,06 hvm. En algunos modos de realización, la tasa de liberación del espacio libre superior está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,01 a 0,04 hvm. En algunos modos de realización, la tasa de liberación del espacio libre superior está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,02 a 0,03 hvm. Todavía en otros modos de realización, la tasa de liberación del espacio libre superior está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,009 a 0,024 hvm. En otros modos de realización, la tasa de liberación del espacio libre superior está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,007 a 0,02 hvm. El "hvm" es la proporción del caudal volumétrico del gas (l/min) con respecto al volumen del espacio libre superior (l).

En algunos modos de realización, por ejemplo, en una bolsa de WAVE Bioreactor™ de 50 l, con un volumen de cultivo de 20 l y un volumen del espacio libre superior de 30 l, el caudal de gas en el recipiente es de 0,1 l/min a 1 l/min. En algunos modos de realización, el caudal de gas en la bolsa es de 0,2 l/min. En algunos modos de realización, el caudal es de 0,3 l/min. En otros modos de realización, el caudal de gas es de 0,4 l/min. Todavía en otros modos de realización, el caudal de gas es de 0,5 l/min. En otros modos de realización, el caudal de gas es de 0,6 l/min. En otros modos de realización, el caudal de gas es de 0,7 l/min. Todavía en otros modos de realización, el caudal es de 0,8 l/min. En otros modos de realización, el caudal es de 0,9 l/min.

En general, el cultivo celular se debe mantener dentro de un intervalo de aproximadamente 6 a 8. En algunos modos de realización, el pH se mantiene dentro de un intervalo de aproximadamente 6,6 a 7,6. En algunos modos de realización, el pH se mantiene dentro de un intervalo de aproximadamente 6,9 a 7,5. En algunos modos de realización, el pH se mantiene dentro de un intervalo de aproximadamente 6,8 a 7,2. En algunos modos de realización, el pH se mantiene dentro de un intervalo de aproximadamente 7,0 a 7,3. Aunque el procedimiento de la invención no requiere la monitorización del pH para mantener un pH que sea propicio para el crecimiento de las células en cultivo, en algunos modos de realización del procedimiento de la invención, se puede monitorizar (de forma intermitente o continua) el pH del cultivo. La medición se puede tomar *in situ* o fuera de línea.

En algunos modos de realización del procedimiento de la invención, el OD se mantiene por encima de un 10 %. En otros modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 20 %. En otros modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 30 %. En otros modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 40 %. En otros modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 50 %. En otros modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 60 %. En otros modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 70 %. En otros modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 80 %. En otros modos de realización, el OD se mantiene por encima de un 90 %.

La monitorización de la concentración de CO₂ en medio líquido es bien conocida en la técnica y se puede conseguir usando una tecnología disponible comercialmente. La medición se puede tomar *in situ* o fuera de línea.

En un modo de realización ilustrativo particular del procedimiento de la invención, se usa un procedimiento por lotes en el que las células se cultivan de manera gradual. En este procedimiento, se usa una bolsa de 50 l del sistema WAVE Bioreactor™ con un volumen de trabajo de 20 l de cultivo, en la que el espacio libre superior se infunde con gas complementado con CO₂ al 8 % (v/v) de gas durante el primer día, CO₂ al 5 % (v/v) de gas el segundo día y CO₂ al 2 % (v/v) de gas después de esto. El WAVE Bioreactor™ se somete a oscilación a 21 rpm a 10°, y 0,2 l/min para la inoculación, y, a continuación, a 23 rpm, ángulo de oscilación de 10° y 0,2 l/min para el paso de aumento a escala. En esta disposición, no es necesario monitorizar el pH, ya que el pH se mantendrá por los parámetros usados.

En un modo de realización ilustrativo particular del procedimiento de la invención, se usa un procedimiento por perfusión. En este procedimiento, se usa una bolsa de 50 l de WAVE Bioreactor™ con un volumen de trabajo de 20 l de cultivo. La bolsa se infunde con gas que se complementa con O₂ al 30 % (v/v) dos días después del inicio de la perfusión. El caudal de gas se incrementa gradualmente de 0,2 l/min en el día 0, a continuación, se incrementa a 0,4 l/min en el día 3, a continuación, se incrementa nuevamente a 0,6 l/min en el día 6. En esta disposición, no es necesario monitorizar el pH, ya que el pH se mantendrá por los parámetros usados.

En otro modo de realización ilustrativo particular del procedimiento de la invención, se usa un procedimiento por perfusión. En este procedimiento, se usa una bolsa de 50 l de WAVE Bioreactor™ con un volumen de trabajo de 20 l de cultivo. La bolsa se infunde con gas que se complementa con O₂ al 30 % (v/v) dos días después del inicio de la perfusión. El caudal de gas se mantiene a un caudal constante de 0,6 l/min. En esta disposición, no es necesario monitorizar el pH, ya que el pH se mantendrá por los parámetros usados.

Aún en otro modo de realización ilustrativo particular del procedimiento de la invención, se usa un procedimiento por perfusión. En este procedimiento, se usa una bolsa de 50 l de WAVE Bioreactor™ con un volumen de trabajo de 20 l de cultivo. La bolsa se infunde con gas que se complementa con O₂ al 30 % (v/v) dos días después del inicio de la perfusión. El caudal de gas se mantiene a un caudal constante de 1,0 l/min. En esta disposición, no es necesario monitorizar el pH, ya que el pH se mantendrá por los parámetros usados.

Será evidente para un experto en la técnica que los parámetros de las condiciones de cultivo (concentraciones de gas, caudales, hvm, tasa de oscilación, ángulos de oscilación, etc.) se pueden ajustar usando las enseñanzas en el presente documento para lograr un pH con el intervalo deseado.

Aparato

El recipiente para contener el medio de cultivo celular no se limita a ningún tamaño particular. El recipiente de la divulgación se puede adaptar al tamaño de los biorreactores y bolsas de cultivo desechables usados comúnmente como se usa en la técnica, y se puede adaptar para cultivos más grandes o más pequeños.

El recipiente no se limita al material usado para crear el recipiente. El recipiente puede estar fabricado de un material sólido, tal como vidrio o un plástico duro, o puede estar fabricado de un material elástico, tal como un plástico blando, tal como el que se usa para producir bolsas de biorreactor desechables.

El recipiente puede contener opcionalmente deflectores para incrementar la turbulencia del medio cuando se agita.

El recipiente se puede equipar con uno o más orificios para permitir la adición o retirada de gas y líquidos. El gas se puede cargar en el espacio libre superior y retirar del espacio libre superior a través de uno o más orificios. En un

aspecto, existe un único orificio que permite tanto la admisión como el escape de gas. En otros aspectos, existen dos orificios: uno para la admisión de gas y otro para el escape de gas. En otros aspectos, se usa una pluralidad de orificios para permitir la admisión y el escape de gas.

5 En algunos aspectos, el aparato también puede comprender un monitor para el pH que monitoriza de forma continua o intermitente el pH del medio de cultivo celular. El monitor para el pH se puede usar en comunicación con un sistema automatizado para gasificar o desgasificar el espacio libre superior del recipiente para alterar la concentración de CO₂ y, de este modo, ajustar el pH del medio de cultivo celular.

10 En algunos aspectos, el aparato de la divulgación comprende un monitor para CO₂ que monitoriza de forma continua o intermitente la presión parcial del CO₂ disuelto como una indicación de la concentración de CO₂ en el medio. El monitor para CO₂ se puede usar en comunicación con un sistema automatizado para gasificar o desgasificar el espacio libre superior del recipiente para alterar la concentración de CO₂ disuelto, de modo que se module la concentración real de CO₂ como se mide por el monitor para CO₂ para ajustar la concentración a un valor predeterminado.

15 En algunos aspectos, el aparato de la divulgación comprende un monitor para la temperatura que monitoriza de forma continua o intermitente la temperatura del medio de cultivo celular. El monitor para la temperatura se puede usar en comunicación con un sistema automatizado para incrementar o disminuir la temperatura de modo que se module la temperatura real como se mide por el monitor para ajustarla a un valor predeterminado.

20 Los diversos monitores para parámetros se pueden usar solos o en combinación y se pueden controlar usando un sistema automatizado controlado por un ordenador. El ordenador se puede programar para realizar los cálculos necesarios para determinar la cantidad de CO₂ que se va a infundir con el gas o desgasificar del espacio libre superior para ajustar el pH del medio de cultivo celular. El ordenador también puede realizar cálculos con respecto a la temperatura, tasa de agitación, perfusión del medio y otros parámetros, así como controlar los medios para ajustar los parámetros de manera automatizada.

25 Opcionalmente, el aparato de la divulgación incluye un agitador para agitar el recipiente de modo que el medio de cultivo celular no sea estático, sino que esté en una interfase dinámica con el gas del espacio libre superior. La agitación facilita la difusión de gas dentro y fuera del medio de cultivo celular. El agitador puede ser de cualquier forma conocida en la técnica, pero incluye dichos ejemplos no limitantes de agitadores, agitadores orbitales, dispositivos rotativos, agitadores en forma de ocho, plataformas de oscilación, plataformas de rotación y similares.

30 El sistema automatizado de suministro de gas y purga de gas puede incluir una válvula y un sistema de bomba para suministrar gas a presión a través de filtros estériles con un medidor de control para controlar la tasa de flujo de gas en el recipiente. Se puede emplear cualquier medio conocido en la técnica para suministrar gas y retirar gas. El gas se puede introducir en respuesta a una señal calculada en un ordenador cuando la concentración de CO₂ disuelto en el medio de cultivo celular se desvíe de un valor predeterminado. Si la concentración medida de CO₂ se desvía del valor predeterminado, el sistema automatizado calcula la cantidad de CO₂ necesaria que se va a añadir al sistema o retirar del sistema, y el gas con la cantidad apropiada de CO₂ se introduce en el espacio libre superior a medida que el gas residente se purga a través del orificio de escape. El ordenador puede realizar cálculos que impliquen las ecuaciones 1, 2 y/o 3 como se define en el presente documento y otros cálculos para regular el sistema, como será conocido por un experto en la técnica en base a la literatura disponible, los sistemas disponibles comercialmente y las enseñanzas en el presente documento.

35 De forma alternativa, o junto con un sistema de respuesta que usa una concentración monitorizada de CO₂, el sistema automatizado también puede medir el pH del medio de cultivo y responder cuando el pH medido se desvíe de un pH predeterminado para cultivar las células. El sistema automatizado puede responder a una desviación de la concentración de CO₂ y/o pH e introducir una cantidad apropiada de CO₂ con gas mientras que el gas residente se purga de modo que module apropiadamente el pH del medio de cultivo.

40 El aparato y procedimiento se describirán ahora en un ejemplo no limitante con referencia a la **fig. 1**. El recipiente de cultivo (40) contiene medio de cultivo celular y células (110) y espacio libre superior (130). Un orificio de admisión de gas (70) con filtro (50) se conecta al recipiente (40) para permitir la infusión de gas en el espacio libre superior (130). Un orificio de escape de gas (80) con filtro (60) se conecta al recipiente (40) para permitir el escape de gas fuera del espacio libre superior (130). El recipiente descansa sobre la plataforma (30) que se conecta al oscilador (20) y a la base (10) para permitir un movimiento de oscilación y agitación del medio de cultivo celular (110). La agitación y el flujo de gas dentro del espacio libre superior (130) permite la difusión de O₂ y CO₂ dentro y fuera del medio de cultivo celular (110). El filtro de perfusión (90) opcional para retener a las células en el recipiente de cultivo se conecta por medio del conducto (100) a un orificio para el medio (120) para permitir la retirada del medio de cultivo consumido del cultivo celular según sea necesario.

45 Las células se cultivan en medio de cultivo celular (110) en un recipiente (40). El espacio libre superior (130) en el recipiente (40) se llena con gas. El flujo de gas a través del orificio de admisión de gas (70) y fuera del orificio de escape de gas (80) permite que el gas fluya a través del espacio libre superior (130) y fluya fuera CO₂ que se

difunde fuera del medio de cultivo celular (110) en el espacio libre superior (130) a medida que se agita el cultivo por el movimiento de oscilación de la plataforma (30) sobre el oscilador (20) acoplado a la base (10). La reducción de CO₂ disuelto en el medio de cultivo celular (110) provoca un incremento del pH del medio de cultivo celular (110).

El medio de cultivo celular (110) se puede complementar opcionalmente con medio recién preparado suministrado a través del conducto para el medio (140) a través del orificio para el medio (150) y retirar a través del filtro de perfusión (90) de forma ascendente a través del conducto para el medio (100) y hacia afuera a través del orificio de salida para el medio (120). En este rasgo característico del procedimiento de la invención, se suministra medio recién preparado a medida que el medio de cultivo celular original se agota en cuanto a nutrientes y a medida que los productos de desecho celular se acumulan y el pH disminuye. El medio recién preparado se suministra con un pH predeterminado que es suficiente para provocar un incremento del pH del medio de cultivo celular total tras la mezcla para llevar al medio de cultivo celular a un intervalo de pH óptimo predeterminado.

EJEMPLOS

A. Principios:

Puesto que la mayoría de los sistemas de cultivo de células de mamífero utilizan un medio de cultivo celular que contiene bicarbonato, el control del pH en el cultivo de células de mamífero se realiza predominantemente por adiciones de base/CO₂. El control del pH se aprovecha del sistema tampón ácido carbónico-bicarbonato. Se ha descubierto que en dicho sistema, por ejemplo, un biorreactor de bolsa desechable, el pH del cultivo se puede modular manipulando la concentración de CO₂ disuelto en el medio, que se puede modular modulando la concentración de CO₂ en el espacio libre superior. El ajuste del pH bidireccional se muestra como posible en los ejemplos en el presente documento modulando la concentración de CO₂ en el espacio libre superior. Este procedimiento eliminará el uso de base para incrementar el pH en un sistema de biorreactor de cultivo celular. Si se necesita disminuir el pH del cultivo celular en el biorreactor desechable, la concentración de CO₂ en el espacio libre superior se puede incrementar complementando el gas entrante con CO₂. Esto posibilitará que el CO₂ se transfiera al cultivo celular. Si se necesita incrementar el pH del cultivo celular en la bolsa desechable, se puede disminuir la concentración de CO₂ en el espacio libre superior o se puede incrementar la tasa de liberación del espacio libre superior para facilitar la retirada de CO₂ del cultivo celular.

Este procedimiento de mantenimiento del pH se puede extender a un sistema de biorreactor en el que la transferencia de gas en el biorreactor se facilite principalmente por la gran área de superficie creada en el biorreactor.

Estrategia para el mantenimiento del pH en base a la adición/retirada de CO₂ en un procedimiento para bancos de células:

Durante los pasos iniciales del cultivo celular, cuando existe un número relativamente más pequeño de células, el pH del cultivo celular típicamente se eleva. Para controlar el pH, típicamente se añade CO₂ al biorreactor para reducir el pH. Normalmente, esta adición se consigue inyectando gas CO₂ a través del cultivo celular en un biorreactor con depósito agitado normal. En un biorreactor desechable de la invención, la concentración de CO₂ en el espacio libre superior se altera de modo que la dirección de transferencia de CO₂ sea desde la fase gaseosa a la fase líquida. A medida que se incrementa la concentración celular durante el transcurso del cultivo, la concentración de CO₂ en el cultivo celular también se incrementa y de ahí que típicamente disminuya el pH. En un biorreactor con depósito agitado normal con la autorregulación del pH normal, se añadirá base para controlar el pH. La adición de base incrementa el pH del cultivo celular. En el biorreactor desechable de la invención, se puede conseguir el incremento del pH invirtiendo la dirección de transferencia de CO₂ disminuyendo la concentración de CO₂ en el espacio libre superior, así como incrementando la tasa de liberación del espacio libre superior. Este procedimiento de mantenimiento del pH del cultivo celular controlando la concentración de CO₂ en los medios permite la eliminación del uso de una base. En base al requisito (incremento o bien disminución del pH), la concentración de CO₂ en el espacio libre superior se puede disminuir o incrementar, respectivamente.

Se puede usar un sistema de biorreactor desechable como el sistema de biorreactor para generar bancos de células con alta densidad celular, tales como, pero sin limitarse a, bancos de células patrón (MCB) y bancos de células de trabajo (WCB). Se considera que un procedimiento de cultivo celular por perfusión posibilita la producción de bancos de células con alta densidad celular en el biorreactor desechable. Se propone el enfoque de adición/retirada de CO₂ para el mantenimiento del pH mientras que se desarrolla el procedimiento de cultivo celular para generar MCB y WCB. Además del enfoque de transferencia de gas para mantener el pH, la perfusión del cultivo celular permite oportunidades adicionales para mantener el pH. En un procedimiento de cultivo celular por perfusión, los medios de cultivo celular recién preparados se añaden de forma continua al biorreactor mientras que el medio de cultivo consumido se retira de forma continua. La perfusión permite la retirada de subproductos del cultivo celular que podrían afectar potencialmente al pH del cultivo celular. Además de la retirada de los subproductos del cultivo celular, el pH de los medios de cultivo celular recién preparados entrantes también puede alterar el pH del cultivo celular. Si se sabe que el pH del cultivo celular va a disminuir, el pH de los medios entrantes se puede incrementar para compensar la disminución del pH. De forma alternativa, la tasa de perfusión también se puede alterar para

controlar el pH del cultivo. Todos los enfoques anteriores tienen una repercusión en el pH, pero el factor más importante que afectará al pH es el procedimiento de transferencia de CO₂. La transferencia de CO₂ también es un enfoque más fiable, ya que el caudal de gas y la complementación con CO₂ en un biorreactor desechable se pueden controlar eficazmente sin muchos problemas.

Durante los intentos iniciales de cultivar células CHO en el WAVE Bioreactor™ sin autorregulaciones del pH y OD, se identificaron varios obstáculos (**figura 5**): (1) un crecimiento lento durante el paso de cultivo por lotes (días 0-6) a aproximadamente 0,3 día⁻¹; (2) un crecimiento progresivamente más lento durante el paso de cultivo por perfusión (día 6 en adelante), descendiendo de aproximadamente 0,5 día⁻¹ durante los primeros 3 días a menos de 0,3 día⁻¹ después de esto; (3) el pH del cultivo inicial a veces sobrepasó el 7,3, y el pH del cultivo posterior con frecuencia descendió por debajo de pH 6,8; y (4) los niveles de OD frecuentemente estaban por debajo de un 20 % de saturación de aire después del comienzo de la perfusión en el día 6. Se encontraron los mismos obstáculos usando líneas de células CHO que producían otros MAb (datos no mostrados). Se atribuyó el lento crecimiento en el cultivo por lotes al alto pH inicial, y el descenso de la tasa de crecimiento en el cultivo por perfusión al pH y OD decrecientes.

En ausencia de autorregulación del pH en el WAVE Bioreactor™, el pH en estos cultivos tamponados con bicarbonato debería depender del contenido de CO₂ en el espacio libre superior de la Cellbag™. A pesar de la presencia de los tampones bicarbonato y HEPES en el medio, el pH del cultivo finalmente debería descender con el tiempo como resultado de la acumulación de lactato. Para mantener el pH del cultivo en el intervalo deseado de 6,8-7,2, la estrategia fue manipular la concentración de CO₂ en la Cellbag™. Se podría incrementar la transferencia de CO₂ en el medio para disminuir el pH durante los pasos iniciales del cultivo por lotes. Por el contrario, se separaría por extracción el CO₂ del medio para incrementar el pH durante los últimos pasos del cultivo por lotes o por perfusión. En ausencia de autorregulación del OD en el WAVE Bioreactor™, los niveles de OD deberían descender con densidades celulares crecientes. Para mantener el OD >20 % de saturación de aire, se incrementaría la transferencia de O₂ en los cultivos incrementando el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) para el sistema WAVE Bioreactor™ y complementando el gas de entrada con O₂.

B. Materiales y procedimientos:

1. Líneas de células CHO y medio de cultivo

Todas las líneas celulares usadas en los ejemplos se derivaron de un huésped carente de dihidrofolato reductasa (DHFR-) de CHO adaptado para crecer en cultivo en suspensión libre de suero. Se generó cada línea celular que producía un anticuerpo monoclonal (MAb) específico transfectando el huésped DHFR con un plásmido de ADN que codificaba genes para DHFR, la cadena ligera (LC) de MAb y la cadena pesada (HC) de MAb. Las células transfectadas de forma estable se mantuvieron posteriormente pasándolas cada 2-5 días en medios selectivos patentados definidos químicamente que contenían metotrexato. El mismo medio que contenía 1,0 g/l de Pluronic F-68, 2,44 g/l de bicarbonato de sodio y HEPES 15 mM, además de una combinación patentada de nutrientes, se usó para cultivar células en el WAVE Bioreactor™ tanto en modos por lotes como por perfusión.

2. Sistema WAVE Bioreactor™

El sistema WAVE Bioreactor™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) usado para cultivar las células CHO en modo por lotes o por perfusión consistía en una plataforma de oscilación, una unidad de controlador y una bolsa preesterilizada, flexible y desechable con filtros para gas de entrada y de salida y múltiples orificios de muestreo (Singh, 1999; Tang *et al.*, 2007). Cada sistema se equipó con una almohadilla térmica y una caja de mezcla de gases para proporcionar el control de temperatura y la composición del gas de entrada requerida (O₂ y/o CO₂ mezclados con aire), respectivamente. Todos los experimentos de cultivo celular se realizaron usando una Cellbag™ de 50 l a un volumen de trabajo de 6 o 20 l, un punto de ajuste de la temperatura de 37 °C, una tasa de oscilación de 19-25 rpm y un ángulo de oscilación de 8-12°. Las sondas de pH u OD en línea no se instalaron en el WAVE Bioreactor™; en su lugar, se sometieron a prueba diferentes estrategias para la mezcla de gases y el caudal de gas para determinar su capacidad de mantener los niveles de pH y OD del cultivo dentro del intervalo objetivo.

3. Cultivo por lotes en el WAVE Bioreactor™

El cultivo por lotes se inició a 6 l en el WAVE Bioreactor™ inoculando una Cellbag™ regular o bien una para perfusión a ~7,5 × 10⁵ células/ml. Unos días después de la inoculación, cuando el cultivo acumuló suficiente masa celular, se añadió medio recién preparado para incrementar el volumen de trabajo a 20 l. Para cada pase, el cultivo se mantuvo durante 2-5 días en modo por lotes.

4. Cultivo por perfusión en el WAVE Bioreactor™

A menos que se establezca de otro modo, el cultivo por perfusión se inició después de que el cultivo por lotes acumulara suficiente masa celular a un volumen de trabajo de 20 l en una Cellbag™ para perfusión, con una tasa de oscilación de 23 rpm y un ángulo de oscilación de 10°, y una tasa de perfusión de 1 volumen de trabajo por día. El

dispositivo de retención de células en la Cellbag™ para perfusión consistía en un filtro que flotaba en la superficie del líquido durante el procedimiento de cultivo (Tang *et al.*, 2007). El filtro de perfusión retuvo las células en la Cellbag™ mientras se añadían ambos medios recién preparados y el filtrado se retiró de forma continua. Se mantuvo un volumen constante en el WAVE Bioreactor™ de perfusión haciendo coincidir la tasa de adición del medio recién preparado con la tasa de retirada del filtrado de un volumen de trabajo por día.

5. Cultivos en el biorreactor con depósito agitado

Para comparar el rendimiento entre cultivos en un WAVE Bioreactor™ y un biorreactor con depósito agitado, se inocularon células de la misma fuente del tren de semillas tanto en un biorreactor WAVE Bioreactor™ como en un biorreactor con depósito agitado de acero inoxidable de 20 l (Applikon, Foster City, CA, EE. UU.) a $\sim 7,5 \times 10^5$ células/ml. Las células se cultivaron en primer lugar en modo por lotes y, a continuación, se inició la perfusión tras la acumulación de suficiente masa celular. El volumen de trabajo fue de 7 l en modo por lotes y 15 l en modo por perfusión en el biorreactor con depósito agitado. La temperatura del cultivo, el OD y la agitación se mantuvieron en puntos de ajuste de 37 °C, un 30 % de saturación de aire y 125 rpm, respectivamente. El pH del cultivo se mantuvo a 7,15, con una banda muerta de 0,03, por adición de carbonato de sodio 1 M para incrementar el pH o bien por inyección de gas CO₂ para disminuir el pH. Durante el funcionamiento por perfusión, se usó el sistema de centrifugadora de Centritech (Centritech AB, Norsborg, Suecia) para separar las células del medio de crecimiento; las células se retuvieron por la centrifugadora y se devolvieron al biorreactor mientras que se retiraba el sobrenadante (Johnson *et al.*, 1996). Se mantuvo un volumen constante en el biorreactor haciendo coincidir la tasa de adición del medio recién preparado con la tasa de retirada del sobrenadante de un volumen de trabajo por día.

6. Análisis de muestras fuera de línea

Los cultivos se muestrearon y analizaron para determinar la concentración de células viables (CCV) y la viabilidad (Vi-Cell AS, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE. UU.), así como para el pH, OD, pCO₂, glucosa y lactato (Bioprofile 400, Nova Biomedical, Waltham, MA, EE. UU.).

Ejemplo 1: Estudios libres de células: Mediciones de transferencia de gas

Las características de transferencia de gas en la Cellbag™ afectan al rendimiento del cultivo debido a sus efectos sobre los niveles de OD y pH. Como primera etapa para mantener el pH y el OD dentro de los intervalos deseados, se realizaron estudios libres de células en la Cellbag™ para medir la transferencia de O₂ y CO₂.

A. Estudios de transferencia de O₂

La transferencia de O₂ en la Cellbag™ de 50 l se caracterizó usando un medio de cultivo simulado calculando el coeficiente volumétrico de transferencia de O₂ (k_{La}) en diversas combinaciones de tasas de oscilación (20, 30 y 40 rpm), ángulos de oscilación (8°, 10° y 12°) y caudales de gas (0,1, 0,2 y 0,3 l/min). El procedimiento de gasificación dinámica clásico se usó para calcular el k_{La} (Dunn y Einsele, 1975). El medio de prueba usado para estos estudios se diseñó para simular el medio de cultivo celular patentado: estaba compuesto por 1,0 g/l de Pluronic F-68, 2,44 g/l de bicarbonato de sodio y HEPES 15 mM. Se usó una sonda de OD OxyProbe® conectada a un transmisor modelo 40 del mismo fabricante (Broadley-James Corporation, Irvine, CA, EE. UU.) para proporcionar mediciones de OD en línea.

En preparación para las pruebas de transferencia de O₂, después de que se llenara una Cellbag™ de 50 l con 25 l de medio simulado, se hizo pasar nitrógeno (N₂) a través del orificio de entrada para gas. La bolsa se sometió a oscilación para facilitar la transferencia de N₂ al medio simulado. El flujo de N₂ en el espacio libre superior se detuvo cuando el contenido de OD del medio de simulación descendió por debajo de un 10 % de saturación de aire. Después de este procedimiento de desoxigenación, la bolsa se presionó para extraer el N₂ residual del espacio libre superior. A continuación, se añadió gas comprimido al espacio libre superior en la bolsa mientras que se minimizaba la alteración de la interfase líquido-gas. Tan pronto como la bolsa se infló completamente, se iniciaron las pruebas de transferencia de O₂ en las condiciones de prueba definidas para la tasa de oscilación, el ángulo de oscilación y el caudal de gas. El incremento resultante de la concentración de OD se registró y se usó para determinar el k_{La} del sistema. Además, se midió el OD fuera de línea cada minuto durante los primeros cinco minutos, y, después de esto, cada cinco minutos para verificar la exactitud de las lecturas de OD en línea.

A un caudal de aire constante, el incremento de la tasa de oscilación o el ángulo de oscilación incrementó k_{La} (fig. 2A), presuntamente incrementando el área de superficie para la transferencia de oxígeno. Los números de k_{La} que se obtuvieron a la tasa de oscilación más baja sometida a prueba (20 rpm) son comparables con lo que otros investigadores informaron para el sistema WAVE Bioreactor™ (Mikola *et al.*, 2007; Singh, 1999). Estos números de k_{La} también son comparables con los obtenidos para los biorreactores con depósito agitado internos (datos no mostrados).

En un estudio de transferencia de O₂ del sistema WAVE Bioreactor™ a una tasa de oscilación constante de 20 rpm, incrementando el caudal de aire de 0,01 vvm a 0,05 vvm se incrementó k_{La} de $\sim 2 \text{ h}^{-1}$ a $\sim 3 \text{ h}^{-1}$ en la escala de 2 l, e

incrementando el caudal de aire de 0,01 vvm a 0,1 vvm se incrementó k_{La} de $\sim 0,5 \text{ h}^{-1}$ a $\sim 3 \text{ h}^{-1}$ en la escala de 20 l, (Singh, 1999). En cambio, en el estudio en la escala de 50 l, incrementando el caudal de aire de 0 vvm a 0,02 vvm en dos combinaciones diferentes de tasa de oscilación y ángulo de oscilación no se incrementó k_{La} (**fig. 2B**). Los caudales de aire máximos que se usaron pueden haber sido demasiado bajos para afectar a la movilidad del líquido en la interfase gas-líquido para tener cualquier efecto significativo sobre k_{La} .

La capacidad de transferencia de oxígeno de la bolsa desechable de 50 l se evaluó determinando el coeficiente de transferencia de masa, k_{La} . La **fig. 2C** muestra la concentración de OD con el tiempo para un caudal de gas constante y la **fig. 2D** muestra el efecto del caudal de gas sobre el oxígeno disuelto. Para las condiciones de oscilación intensa (tasa de oscilación y ángulo de oscilación más altos), el coeficiente de transferencia de masa es alto. De forma sorprendente, la tasa de liberación del espacio libre superior, sin embargo, no tiene un efecto sobre k_{La} con respecto a la transferencia de oxígeno. El medio simulado se desoxigenó antes del inicio del experimento. La concentración de oxígeno en el gas fue más alta que la concentración de oxígeno en el medio simulado. De ahí que el oxígeno se transfiriera desde la fase gaseosa a la fase líquida. Con condiciones de oscilación intensa, se incrementa la interfase gas-líquido debido a que hay más formaciones de ondas (esto se denomina en el presente documento como tener una interfase dinámica). Este incremento del área de superficie parece provocar la alta tasa de transferencia de oxígeno. Cuando se incrementa o disminuye el caudal de gas, la tasa de liberación del espacio libre superior se cambia en consecuencia. El cambio en la liberación del espacio libre superior no cambia la concentración diferencial de oxígeno entre la fase gaseosa y la líquida. De ahí que el caudal de gas parezca no tener efecto sobre el coeficiente de transferencia de masa para el oxígeno. Cuando la concentración de oxígeno en el medio simulado se iguala a la del espacio libre superior, la transferencia de oxígeno se detendrá.

B. Estudios de transferencia de CO_2

Después de que el medio simulado se desoxigenara por el procedimiento usado para los estudios de transferencia de O_2 , se suministró CO_2 a la Cellbag™ a través del mismo orificio de entrada usado para suministrar N_2 . El suministro de CO_2 se detuvo cuando la sonda de pH en línea leyó 7,0, y el espacio libre superior se liberó usando el mismo procedimiento descrito en los estudios de transferencia de O_2 . Cuando la bolsa estaba completamente inflada, se iniciaron las pruebas de transferencia de CO_2 en las condiciones de prueba definidas para la tasa de oscilación, el ángulo de oscilación y el caudal de gas. El incremento resultante del pH se registró con una sonda de pH en línea desechable conectada a un transmisor pH20 proporcionado por el mismo fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.). El pH se incrementó debido a que se separó por extracción el CO_2 del medio simulado basado en bicarbonato. Para verificar la exactitud de las lecturas de pH en línea, se midió el pH fuera de línea en el medio simulado cada minuto durante los primeros cinco minutos, y cada cinco minutos después de esto. Trazando las mediciones de pH en línea frente al tiempo, la pendiente de la línea de mejor ajuste proporcionó la tasa de cambio de pH y, de este modo, indicó la tasa de transferencia de CO_2 desde el medio simulado al espacio libre superior en Cellbag™.

Aunque otros investigadores han caracterizado la transferencia de O_2 en el WAVE Bioreactor™ (Mikola *et al.*, 2007; Singh, 1999), no se han encontrado informes sobre la transferencia de CO_2 en sistemas de cultivo celular con agitación inducida por ondas. Para caracterizar la transferencia de CO_2 en el WAVE Bioreactor™, se usó un medio simulado que contenía bicarbonato de sodio a la misma concentración (2,44 g/l) que en el medio de cultivo celular de los inventores. En este sistema libre de células tamponado con bicarbonato, la retirada de CO_2 de la fase líquida incrementaría el pH del sistema en ausencia de un control del pH activo. En lugar de depender de sondas de CO_2 para las mediciones de CO_2 directas en el medio simulado, se usó el perfil de pH de una sonda de pH en línea en el WAVE Bioreactor™ para evaluar la tasa relativa de separación por extracción de CO_2 .

En este estudio, el perfil de pH en el WAVE Bioreactor™ se separó en dos fases (**figs. 3A y 3B**). En la primera fase, el pH se incrementó rápidamente entre 0 y 5 minutos a $\sim 1\text{-}4$ unidades de pH por hora. En la segunda fase, el pH se incrementó más gradualmente de 5 a 60 minutos a $< 0,5$ unidades de pH por hora. Durante esta segunda fase (5-60 minutos), diferentes tasas de oscilación y ángulos de oscilación tuvieron una repercusión insignificante en la tasa de incremento del pH: al caudal de aire constante de 0,2 l/min, el pH se incrementó a 0,2 unidades por hora, independientemente de la condición de oscilación (**figura 3A**). En cambio, los caudales de aire más altos incrementaron la tasa de cambio de pH durante esta segunda fase (5-60 minutos): cuando el caudal de aire se incrementó de 0 l/min a 0,6 l/min, la tasa de cambio de pH se incrementó de 0-0,1 unidades por hora a 0,4 unidades por hora (**figura 3B**). En ausencia de flujo de aire (0 l/min), el incremento de pH mínimo ($\leq 0,1$ unidades por hora) observado durante la segunda fase (5-60 minutos) sugiere que el intercambio de CO_2 entre el medio simulado y el espacio libre superior en la Cellbag™ se aproximó a un equilibrio en aproximadamente 5 minutos. Para lograr un incremento de pH adicional transcurridos los primeros 5 minutos, se podría aumentar la fuerza impulsora para la separación por extracción de CO_2 incrementando el caudal de aire para incrementar la tasa de liberación del espacio libre superior y, de este modo, minimizar la concentración de CO_2 en el espacio libre superior.

La **fig. 3C** muestra la tasa calculada de cambio de pH para los datos de la **fig. 3A**. La **fig. 3D** muestra la tasa calculada de cambio de pH para los datos de la **fig. 3B**. El comportamiento bifásico se puede explicar por las altas tasas de transferencia de gas creadas tanto por la alta área de superficie de las ondas como por el recorrido continuo del espacio libre superior por el gas entrante. La alta área de superficie facilita la rápida transferencia de

CO₂ desde la fase líquida a la fase gaseosa. La transferencia rápida es el resultado de la concentración diferencial de CO₂ entre la fase gaseosa y la líquida. Esta diferencia en la concentración fue la más alta durante el inicio del experimento y esta diferencia se redujo de forma continua a medida que se transfería más CO₂ desde la fase líquida a la fase gaseosa. A medida que se redujo la concentración diferencial de CO₂ entre el gas y la fase líquida, también se redujo la tasa de cambio de pH. En la **fig. 3A**, la tasa de cambio de pH fue muy alta para la primera fase (0-5 minutos) en comparación con la segunda fase (5-60 minutos). El caudal de gas se mantuvo igual para los casos mostrados en la **fig. 3A**. Después de la transferencia inicial de CO₂, la tasa de transferencia de CO₂ depende de la concentración de CO₂ en el espacio libre superior. Para la misma tasa de liberación del espacio libre superior, la tasa de cambio de pH después de los 5 minutos iniciales fue la misma independientemente de las condiciones de oscilación. El valor calculado para la tasa de cambio de pH se muestra en la **fig. 3C**.

Cuando se cambió el caudal de gas, también cambió la tasa de liberación del espacio libre superior. Los datos para la elevación del pH para diferentes caudales de gas se muestran en la **fig. 3B**. También se observó un comportamiento bifásico para estos casos. Sin embargo, entre los casos con el mismo caudal de gas y los casos donde se varió el caudal de gas, la diferencia es que la tasa de cambio de pH de la segunda fase (5-60 minutos) varió dependiendo del caudal de gas en comparación con su similitud para casos con el mismo caudal de gas. Puesto al cambiar el caudal de gas cambia la tasa de liberación del espacio libre superior, el CO₂ en el espacio libre superior se liberó a diferentes tasas.

La rápida transferencia de gas inicial es el resultado de la propiedad de la bolsa desechable de crear una gran área de superficie. Esta transferencia de gas inicial depende principalmente de las condiciones de oscilación (tasa de oscilación y ángulo de oscilación). Sin embargo, la retirada ininterrumpida de CO₂ del medio depende de la concentración de CO₂ en el espacio libre superior. La tasa de liberación del espacio libre superior depende del caudal de gas.

Ejemplo 2: Estudios característicos del crecimiento celular

A. Cultivos por lotes

1. Experimento inicial

Medio de cultivo celular:

Se usó un medio de cultivo celular libre de suero para cultivar células de ovario de hámster chino (CHO). El medio de cultivo celular se derivó de una mezcla 1:1 de DMEM y medios basados en F-12 de Ham modificando algunos de los componentes, tales como aminoácidos, sales, azúcar y vitaminas. Este medio carece de glicina, hipoxantina y timidina. Este medio consistió en HEPES 15 mM (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) y 2,44 g/l de bicarbonato de sodio. La concentración de estas sales se puede modificar. El medio se complementó con oligoelementos, insulina humana recombinante y un agente protector de células, Lutrol F-68 Prill (se puede usar un equivalente).

Cultivo de células de mamífero:

Se cultivaron células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas a partir de un banco de viales de 1 ml o 10 ml almacenado en nitrógeno líquido. El vial congelado seleccionado se descongeló en un medio de cultivo que contenía bicarbonato de sodio en un matraz de centrifugadora, un matraz de agitación enérgico o bien en un biorreactor con depósito agitado. Las células se pasaron cada 2-7 días. Este cultivo se denomina el "tren de semillas". Las células del tren de semillas se transfirieron a la bolsa desechable para iniciar el cultivo celular en la bolsa desechable.

Análisis:

Se usó un analizador de gases en sangre (NOVA BioProfile® 400) para el análisis fuera de línea. Se midieron el pH del cultivo celular, la presión parcial del oxígeno disuelto y CO₂, la concentración de glucosa, lactato y amoníaco usando este analizador fuera de línea. Se realizaron las mediciones de la viabilidad celular y de la concentración de células viables (CCV) usando ViCell™ AS o ViCell™ XR de Beckman-Coulter. Además de las mediciones de la concentración de células, también se midió la cantidad de biomasa registrando el porcentaje de hematocrito (% PCV).

Ejemplo 3: Análisis detallado usando varias líneas de células CHO

A. Procedimiento por lotes:

Disminuyendo la concentración de CO₂ en el gas suministrado a la Cellbag™ durante el transcurso del cultivo por lotes, se debería poder reducir el pH alto inicial (>7,3) y minimizar la disminución de pH posterior en el sistema WAVE Bioreactor™. Después de someter a prueba diferentes estrategias para el recubrimiento con gas CO₂ en

cultivos por lotes en el WAVE Bioreactor™ usando varias líneas de células CHO (datos no mostrados), se definió una estrategia gradual "8-5-2" para tanto los pasos de inoculación como de aumento de escala: el aire bombeado en la Cellbag™ se complementó con gas CO₂ a un 8 % (v/v) durante el primer día, a un 5 % (v/v) durante el segundo día y a un 2 % (v/v) después de esto.

En base a los resultados de los estudios libres de células, se seleccionó la siguiente tasa de oscilación, ángulo de oscilación y caudal de aire como los puntos de ajuste del procedimiento para los cultivos por lotes en el WAVE Bioreactor™: 21 rpm, ángulo de oscilación de 10° y 0,2 l/min para la inoculación; 23 rpm, ángulo de oscilación de 10° y 0,2 l/min para el paso de aumento de escala. Para someter a prueba la fiabilidad de estos puntos de ajuste del procedimiento, se diseñó un experimento factorial completo (**tabla 1**). Cuando las condiciones del procedimiento se desviaron de los puntos centrales, se observó un efecto insignificante sobre el crecimiento celular y los perfiles de pCO₂, y el pH del cultivo permaneció dentro de 6,8-7,2 y OD >50 % para ambas líneas celulares sometidas a prueba (**fig. 4**).

Tabla 1. Condiciones sometidas a prueba en cultivos por lotes en el WAVE Bioreactor™ para líneas celulares que producen MAb B y MAb C (**fig. 4**). El experimento factorial completo se diseñó alrededor de tres parámetros del procedimiento en la tasa de oscilación, ángulo de oscilación y caudal de aire en el espacio libre superior para tanto los pasos de inoculación como de aumento de escala en el cultivo por lotes.

Inoculación				Aumento de escala			
Símbolo	Tasa de oscilación (rpm)	Ángulo de oscilación (°)	Caudal de aire en el espacio libre superior (l/min)	Símbolo	Tasa de oscilación (rpm)	Ángulo de oscilación (°)	Caudal de aire en el espacio libre superior (l/min)
■ □ ■	19	8	0,1	■ □ ■	21	8	0,1
■ ◇ ■	19	12	0,1	■ ◇ ■	21	12	0,1
■ ■ ■	19	8	0,3	■ ■ ■	21	8	0,3
■ ◆ ■	19	12	0,3	■ ◆ ■	21	12	0,3
— □ —	23	8	0,1	— □ —	25	8	0,1
— ◇ —	23	12	0,1	— ◇ —	25	12	0,1
— ■ —	23	8	0,3	— ■ —	25	8	0,3
— ◆ —	23	12	0,3	— ◆ —	25	12	0,3
— ● —	21	10	0,2	— ● —	23	10	0,2

B. Cultivos por perfusión

En los intentos iniciales del cultivo por perfusión en el WAVE Bioreactor™, el pH del cultivo típicamente descendió por debajo de 6,8 y el OD frecuentemente descendió por debajo de un 30 % de saturación de aire después del comienzo de la perfusión en el día 6 (**fig. 5**). Para minimizar el descenso de pH sin incrementar la tasa de perfusión, se investigó la posibilidad de incrementar el caudal de aire en la Cellbag™ debido a que los estudios de transferencia de gas libres de células demostraron que el caudal de aire incrementado incrementaba el pH (**fig. 3**). Para superar el descenso del OD, se complementó el flujo de aire en la Cellbag™ con O₂ al 30 % (v/v) dos días después del inicio de la perfusión. Se seleccionó este momento debido a que coincidía con el descenso del OD observado previamente (**fig. 5**).

Ejemplo 4: Un procedimiento por lotes por perfusión

Este procedimiento por perfusión comprendía dos etapas por lotes seguidas de una etapa por perfusión. Se inoculó una bolsa desechable de 50 l a un volumen de trabajo de 6 l con una densidad celular objetivo de 5 a 7,5 x 10⁵ células/ml en la etapa de inoculación. Tres días después de la inoculación, se añadieron medios recién preparados para incrementar el volumen de la bolsa desechable a 20 l para la etapa de aumento de escala. La etapa de inoculación y la etapa de aumento de escala constituyeron las etapas por lotes. La estrategia para la reducción de CO₂ para las etapas por lotes se empleó como se describe en el procedimiento por lotes. Al final de la etapa de aumento de escala de 3 días, se inició la perfusión. Se añadió de forma continua medio recién preparado a la bolsa desechable y el medio de cultivo consumido se retiró de forma continua de la bolsa desechable mientras que se retenían las células. El medio de cultivo celular se perfundió a una tasa de 20 litros por día (1 volumen por día). El punto de ajuste del pH de los medios de perfusión fue de 7,2 unidades. Al comienzo de la perfusión, la concentración de CO₂ en el gas entrante se ajustó a cero. La tasa de liberación del espacio libre superior se incrementó para facilitar la retirada de CO₂. El incremento de la tasa de liberación del espacio libre superior siguió un

incremento en una única etapa o bien un incremento en múltiples etapas como se muestra en la **fig. 7**. El intervalo de tasas de oscilación fue de entre 19 y 25 rpm. El intervalo de ángulos de oscilación fue de entre 8 y 12 grados. La temperatura se mantuvo a 37 °C. El oxígeno se complementó 48 horas después del comienzo de la perfusión para satisfacer la demanda de oxígeno de las células. La concentración de oxígeno en el gas entrante se ajustó a un 30 % a las 48 horas después del inicio de la perfusión.

La **fig. 6** muestra el rendimiento del cultivo celular para el procedimiento por lotes-por perfusión (etapa por lotes (días 0-6) y etapa por perfusión (días 6-14)) (**fig. 6A**). La **fig. 6B** muestra el % de viabilidad celular. La **fig. 7A** muestra los puntos de ajuste de la tasa de liberación del espacio libre superior para los tres experimentos diferentes. Los puntos de ajuste de la tasa de liberación del espacio libre superior para la etapa por perfusión siguieron diferentes perfiles (días 6-14): (1) dos tasas de liberación del espacio libre superior constantes: 0,02 hvm (-▲-) y 0,1 hvm (◆); y (2) un incremento en una etapa de la tasa de liberación del espacio libre superior: 0,007 hvm a 0,013 hvm a 0,02 hvm (-■-). Se estudió tanto el incremento en una única etapa así como el incremento en múltiples etapas. La **7B** muestra la concentración de CO₂ disuelto fuera de línea. La **fig. 6D** muestra el crecimiento celular en el recuento de células viables (CCV). La leyenda para las **figs. 6 y 7**: ◆, ■, ▲ muestran tres desarrollos diferentes. Como se muestra en la **fig. 6C**, se podría mantener el pH dentro de un intervalo deseado modulando el CO₂ mediante liberación del espacio libre superior.

Ejemplo 5: Comportamiento de seis líneas de células CHO en condiciones "8-5-2"

Para someter a prueba la fiabilidad de este procedimiento en el WAVE Bioreactor™ para sustentar el crecimiento celular y para mantener el pH y OD en los intervalos deseados, se seleccionaron seis líneas celulares que cubren el intervalo de crecimiento celular y comportamientos metabólicos típicamente observados en las líneas de células CHO internas.

Con las condiciones del procedimiento optimizadas, las seis líneas celulares crecieron con viabilidades altas a lo largo de los pasos de cultivo por lotes y por perfusión (**fig. 8**). En todos los casos, el pH permaneció dentro del intervalo deseado de 6,8-7,2, y el OD sobrepasó un 20 % de saturación de aire.

Ejemplo 6: Comparación entre los cultivos en el procedimiento en el WAVE Bioreactor™ con "8-5-2" y en el biorreactor con depósito agitado convencional

Para comparar el rendimiento del cultivo entre el procedimiento en el WAVE Bioreactor™ de la invención y el procedimiento en el biorreactor con depósito agitado con control del pH y OD, se realizaron cultivos paralelos en ambos sistemas (**fig. 9**). Los perfiles de crecimiento y viabilidad fueron similares entre los dos sistemas de biorreactor: las tasas de crecimiento en el WAVE Bioreactor™ y en el biorreactor con depósito agitado fueron comparables a ~0,5 día⁻¹. A pesar de la falta de autorregulación en línea para el pH y OD en el sistema WAVE Bioreactor™, los perfiles de pH y OD no difirieron significativamente entre los dos cultivos en el biorreactor.

La invención proporciona un procedimiento de control de procedimiento para mantener el pH del cultivo en el intervalo de 6,8-7,2 y OD >20 % de saturación de aire en el sistema WAVE Bioreactor™ que se hizo funcionar tanto en modos por lotes como por perfusión sin depender de la autorregulación del pH y OD. Después de identificar los obstáculos en el cultivo de células CHO en el sistema WAVE Bioreactor™ sin control del pH y OD, se realizaron estudios libres de células para determinar los efectos de la tasa de oscilación, el ángulo de oscilación y el caudal de gas en la transferencia de O₂ y CO₂ en el sistema WAVE Bioreactor™. Ajustando estos parámetros del procedimiento junto con la concentración de CO₂ y O₂ en el gas de entrada, se mantuvo el pH y OD del cultivo dentro del intervalo deseado para los cultivos por lotes y por perfusión de seis líneas de células CHO recombinantes. Eliminando la necesidad de usar sondas de pH y OD, este procedimiento proporciona un procedimiento más simple y más rentable para cultivar células en el sistema WAVE Bioreactor™. También proporciona un procedimiento alternativo para cultivar células en caso de fallo de la sonda de pH u OD en los WAVE Bioreactors™ equipados con estas sondas.

También se debe entender que los ejemplos específicos descritos en el presente documento solo son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. La invención solo está limitada por las reivindicaciones adjuntas.

REFERENCIAS CITADAS

- Cronin CN, Lim KB, Rogers J. 2007. Production of selenomethionyl-derivatized proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Sci* 16: 2023-2029.
- 5 Dunn IJ, Einsele AJ. 1975. Oxygen transfer coefficients by the dynamic model. *J Appl Chem Biotechnol* 25: 707-720.
- deZengotita VM, Schmelzer AE, Miller WM. 2002. Characterization of hybridoma cell responses to elevated pCO₂ and osmolality: Intracellular pH, cell size, apoptosis, and metabolism. *Biotechnol Bioeng* 77: 369-380.
- 10 Haldankar R, Li D, Saremi Z, Baiklov C, Deshpande R. 2006. Serum-free suspension large-scale transient transfection of CHO cells in WAVE bioreactors. *Mol Biotechnol* 34: 191-199.
- Johnson M, Lanthier S, Massie B, Lefebvre G and Kamen A. 1996. Use of the Centritech lab centrifuge for perfusion culture of hybridoma cells in protein-free medium. *Biotech Prog* 12: 855-864.
- 15 Langheinrich C and Nienow AW. 1999. Control of pH in large-scale, free suspension animal cell bioreactors: Alkali addition and pH excursions. *Biotechnol Bioeng* 66: 171-179.
- 20 Lin A, Kimura R, Miller WM. 1993. Production of tPA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions. *Biotechnol Bioeng* 42: 339-350.
- Ling WLW, Deng L, Lepore J, Cutler C, Connon-Carlson S, Wang Y, Voloch M. 2003. Improvement of monoclonal antibody production in hybridoma cells by dimethyl sulfoxide. *Biotechnol Prog* 19: 158-162.
- 25 Link T, Bäckstrom M, Graham R, Essers R, Zörner K, Gätgens J, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Hansson GC, Noll T. 2004. Bioprocess development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium. *J Biotechnol* 110: 51-62.
- 30 Miller WM, Blanch HW, Wilke CR. 1988. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: Effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH. *Biotechnol Bioeng* 32: 947-965.
- Mikola M, Seto J, Amanullah A. 2007. Evaluation of a novel Wave Bioreactor cellbag for aerobic yeast cultivation. *Bioprocess Biosyst Eng* 30: 231-241.
- 35 Osman JJ, Birch J, Varley J. 2001. The response of GS-NS0 myeloma cells to pH shifts and pH perturbations. *Biotechnol Bioeng* 75: 63-73.
- Osman JJ, Birch J, Varley J. 2002. The response of GS-NS0 myeloma cells to single and multiple pH perturbations. *Biotechnol Bioeng* 79: 398-407.
- 40 Rao G, Moreira A, Brorson K. 2009. Disposable bioprocessing: the future has arrived. *Biotechnol Bioeng* 102: 348-356.
- 45 Restelli V, Wang MD, Huzel N, Ethier M, Perreault H, Butler M. 2006. The effect of dissolved oxygen on the production and glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 94: 481-494.
- Royce PNC, Thornhill NF. 1991. Estimation of dissolved carbon dioxide concentrations in aerobic fermentations. *AIChE J* 37L 1680-1686.
- 50 Singh V. 1999. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology* 30: 149-158.
- Tang YJ, Ohashi R, Hamel JFP. 2007. Perfusion culture of hybridoma cells for hyperproduction of IgG2a monoclonal antibody in a Wave bioreactor-perfusion culture system. *Biotechnol Prog* 23: 255-264.
- 55

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cultivar por lotes células eucariotas que comprende:
 - 5 proporcionar un inoculante de cultivo celular que comprende células eucariotas en un líquido de cultivo que contiene bicarbonato en un recipiente,

teniendo dicho recipiente paredes que encapsulan dicho cultivo celular y un espacio libre superior en fase gaseosa por encima de dicho cultivo celular, y en el que dicho recipiente comprende al menos un orificio que
10 proporciona una entrada y un escape de gas a y desde dicho espacio libre superior;

agitar dicho recipiente; y

proporcionar gas a dicho espacio libre superior a través de dicho orificio, en el que dicho gas contiene una
15 cantidad de CO₂, y en el que dicha cantidad de CO₂ en dicho gas se modula con el tiempo para ajustar el pH de dicho cultivo celular para mantener un pH predeterminado de dicho cultivo celular, en el que dicho CO₂ se proporciona en una cantidad de un 8 % (v/v) de dicho gas en el día 1, en una cantidad de un 5 % (v/v) de dicho gas en el día 2 y en una cantidad de un 2 % (v/v) de dicho gas después de esto.
 - 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha agitación es por oscilación de dicho recipiente a una tasa de oscilación de 15 a 30 rpm y un ángulo de oscilación de 5° a 15°.
 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la tasa de oscilación es de entre 19 y 25 rpm y el ángulo de
25 oscilación es de entre 8° y 12°.
 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la tasa de liberación de dicho gas es de entre 0,002 y 0,1 volumen del espacio libre superior por minuto (hvm).
 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la tasa de liberación de dicho gas es de entre 0,007 y
30 0,08 hvm.
 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la tasa de liberación de dicho gas es de entre 0,007 y 0,02 hvm.
 - 35 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas células eucariotas son células de vertebrado.
 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dichas células de vertebrado se seleccionan del grupo que consiste en células de rana, células de conejo, células de roedor, células de oveja, células de cabra, células de perro, células de gato, células de vaca, células de caballo, células de primate no humano y células de ser
40 humano.
 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho recipiente es un envase rígido.
 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el dicho recipiente es un envase elástico.
 - 45 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho recipiente es una bolsa de cultivo desechable.
 12. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además monitorizar de forma intermitente el pH del cultivo celular.
 - 50 13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se proporciona dicho gas a dicho espacio libre superior de modo que el cultivo celular mantenga una presión parcial del CO₂ disuelto a un nivel de aproximadamente 1 a 200 mmHg.
 - 55 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que se proporciona dicho gas a dicho espacio libre superior de modo que el cultivo celular mantenga una presión parcial del CO₂ disuelto a un nivel de aproximadamente 10 a 150 mmHg.
 - 60 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que se proporciona dicho gas a dicho espacio libre superior de modo que el cultivo celular mantenga una presión parcial del CO₂ disuelto a un nivel de aproximadamente 20 a 120 mmHg.
 - 65 16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se proporciona dicho gas a dicho espacio libre superior de modo que el cultivo celular mantenga una presión parcial del CO₂ disuelto a un nivel de aproximadamente 20 a 80 mmHg.

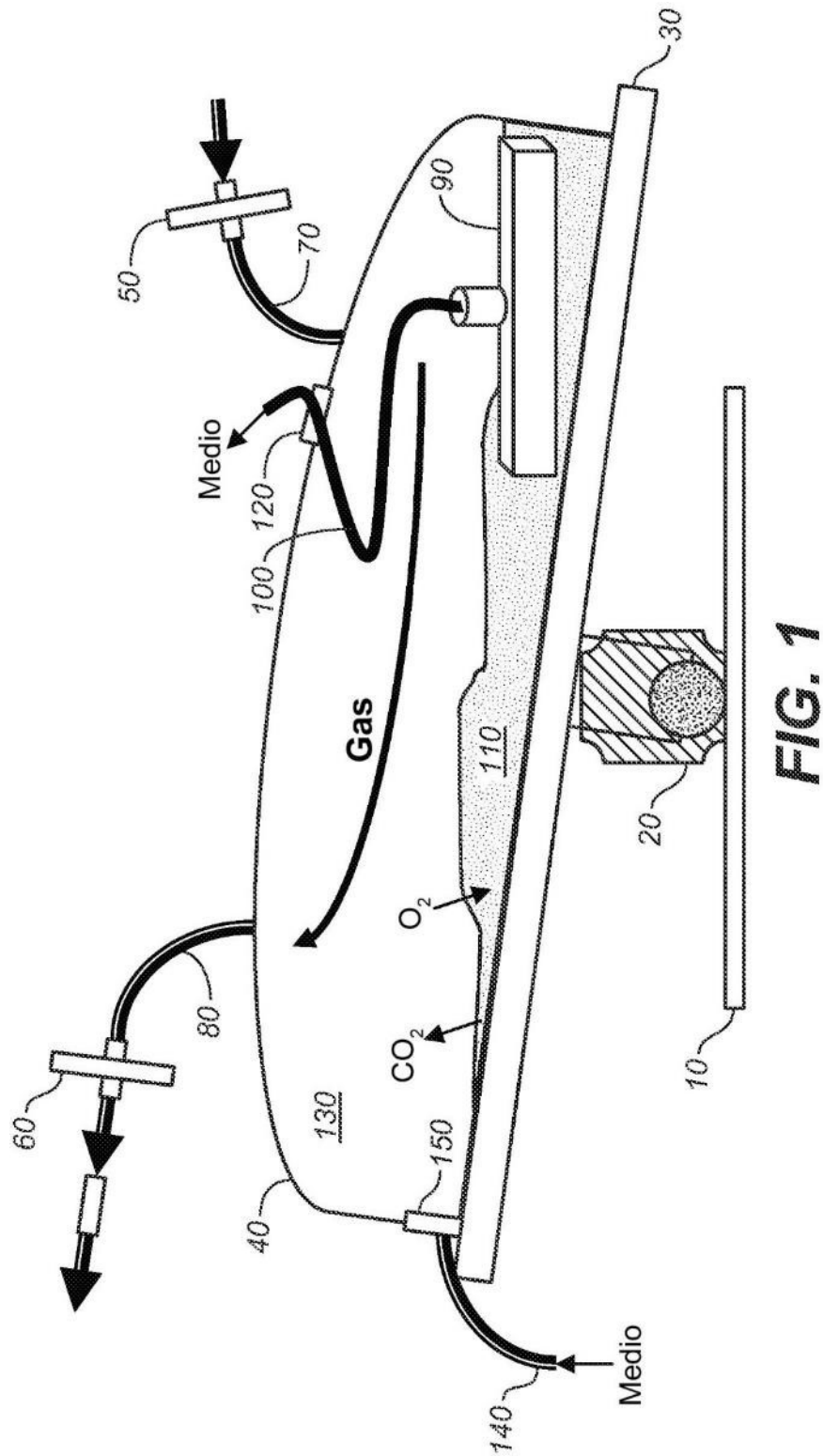


Figura 2

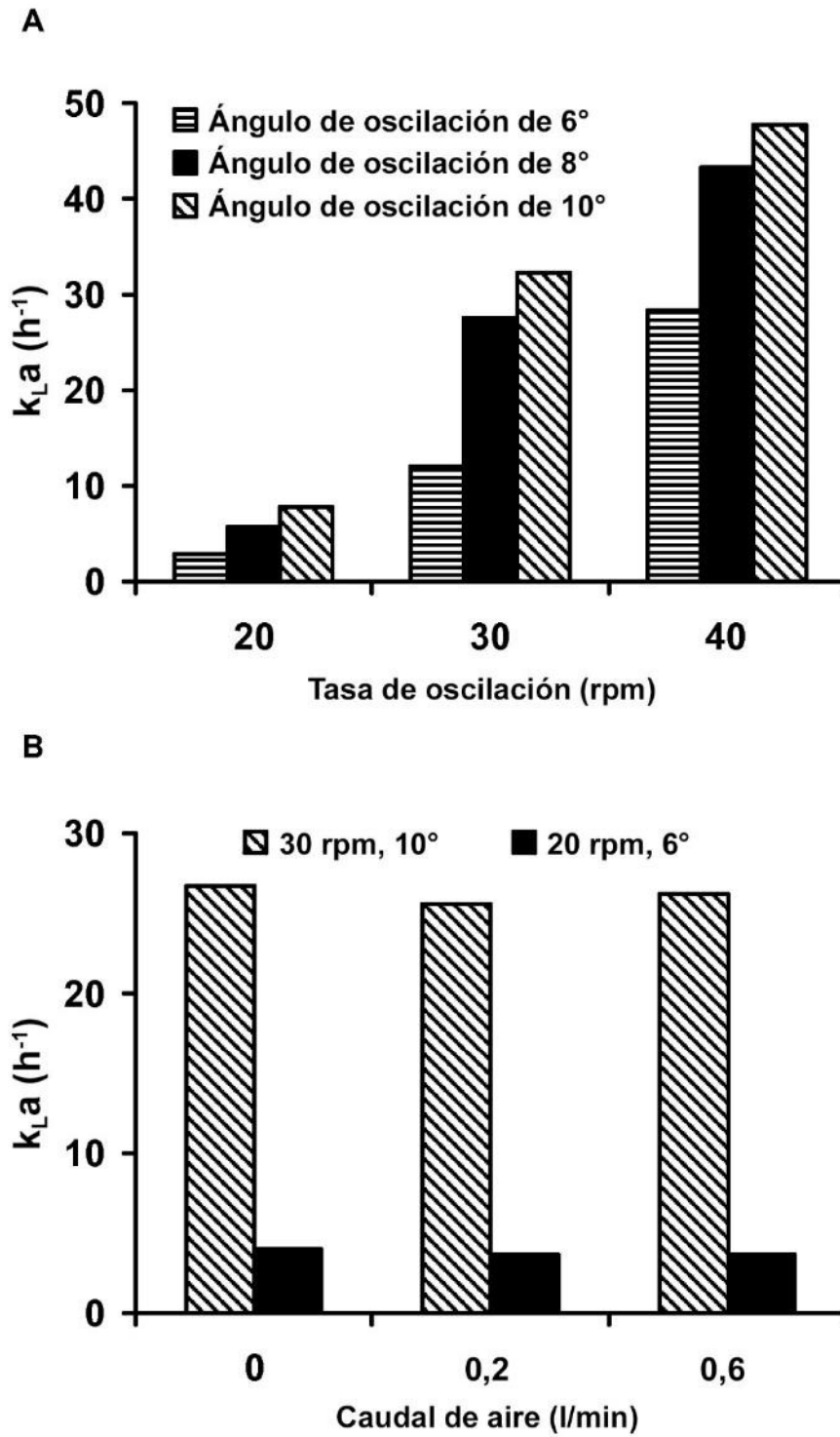


Figura 2

C

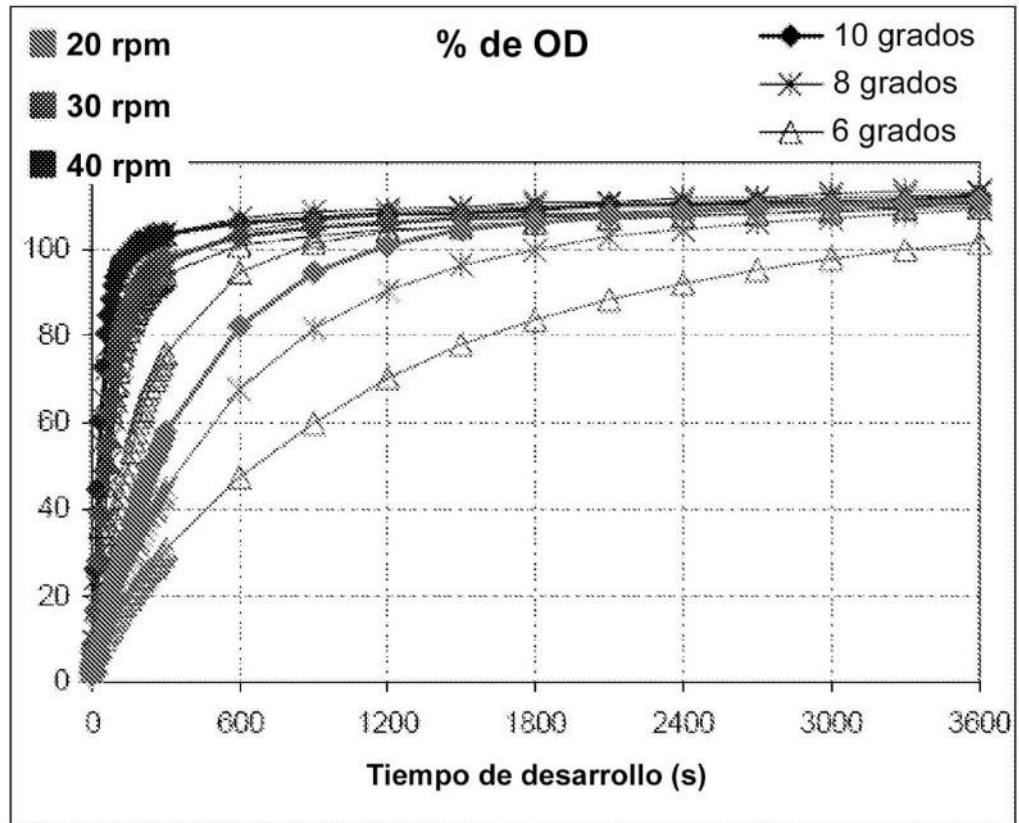


Figura 2

D

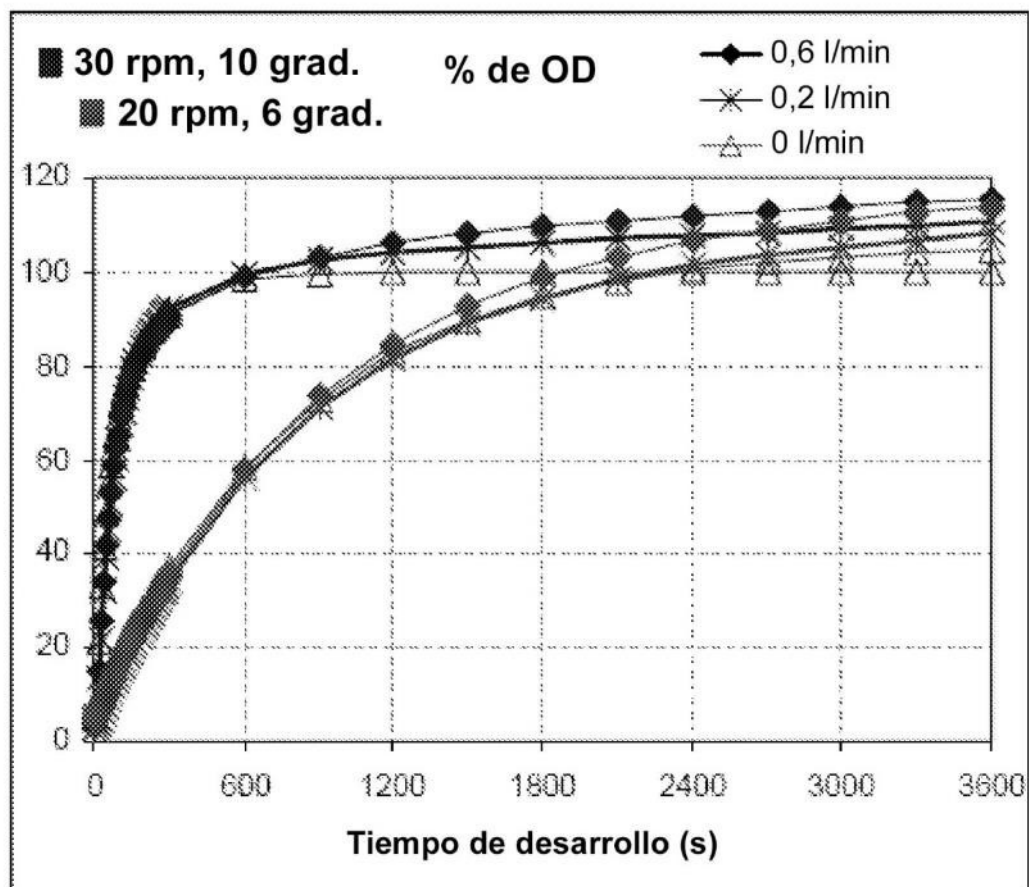


Figura 3

A

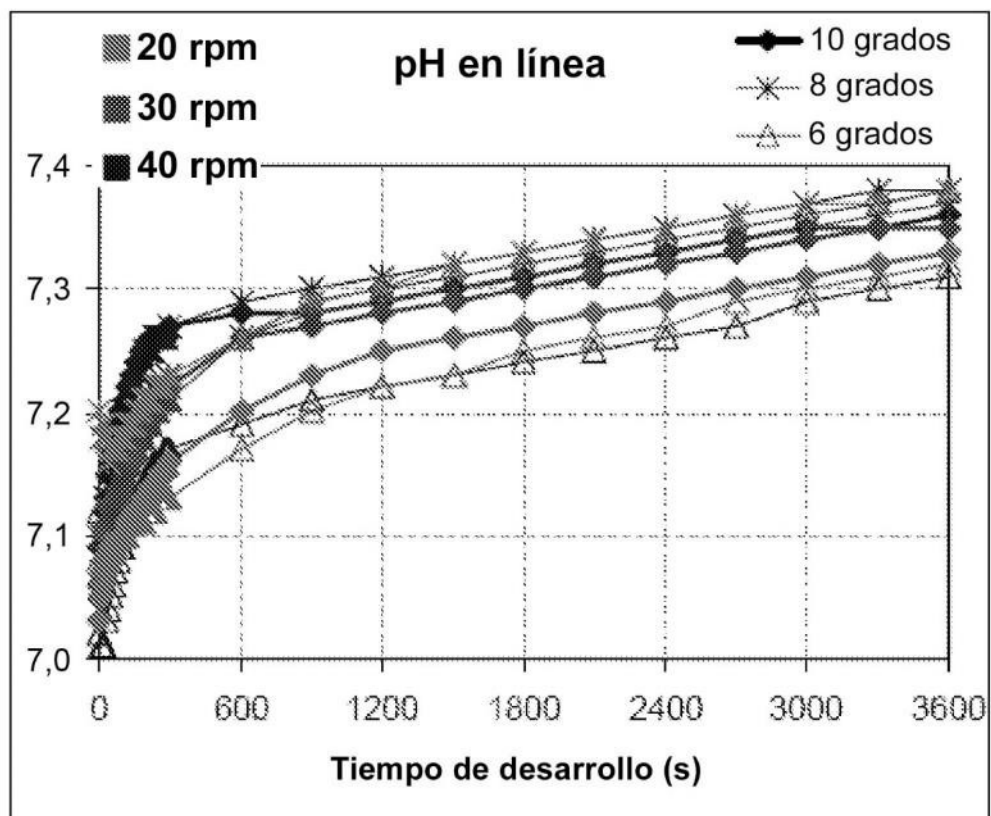


Figura 3

B

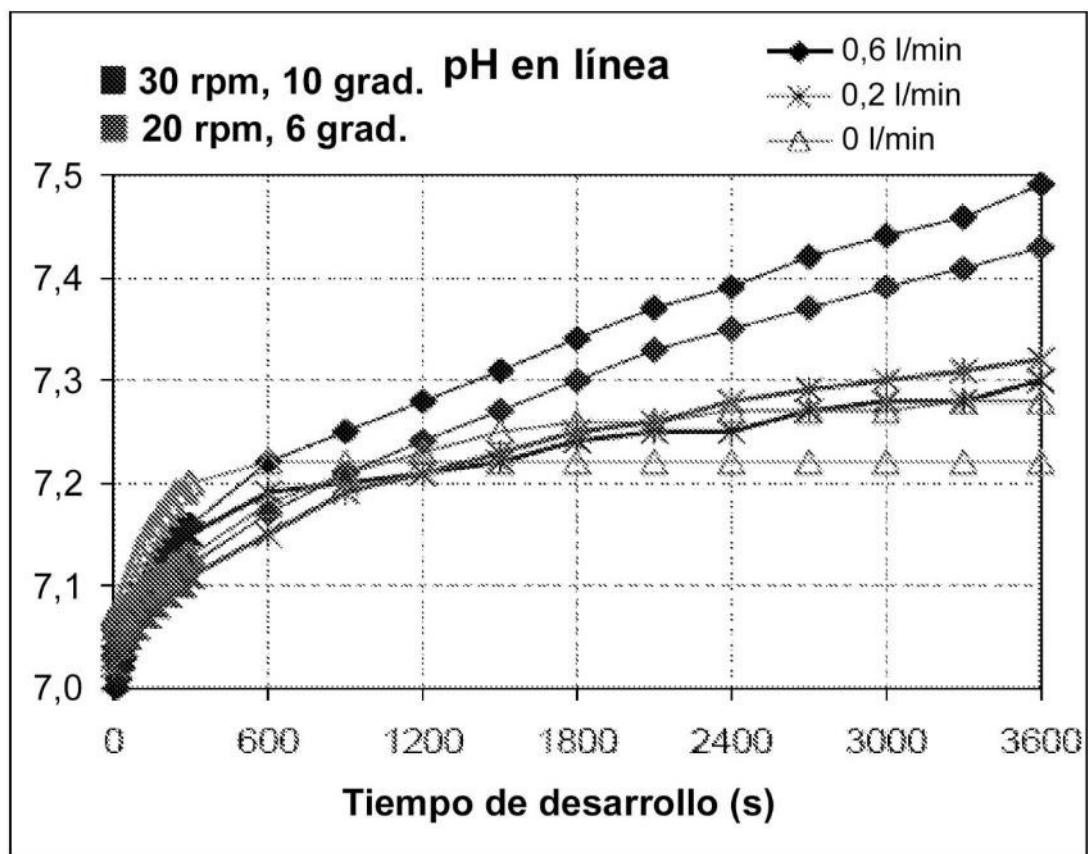


Figura 3

C

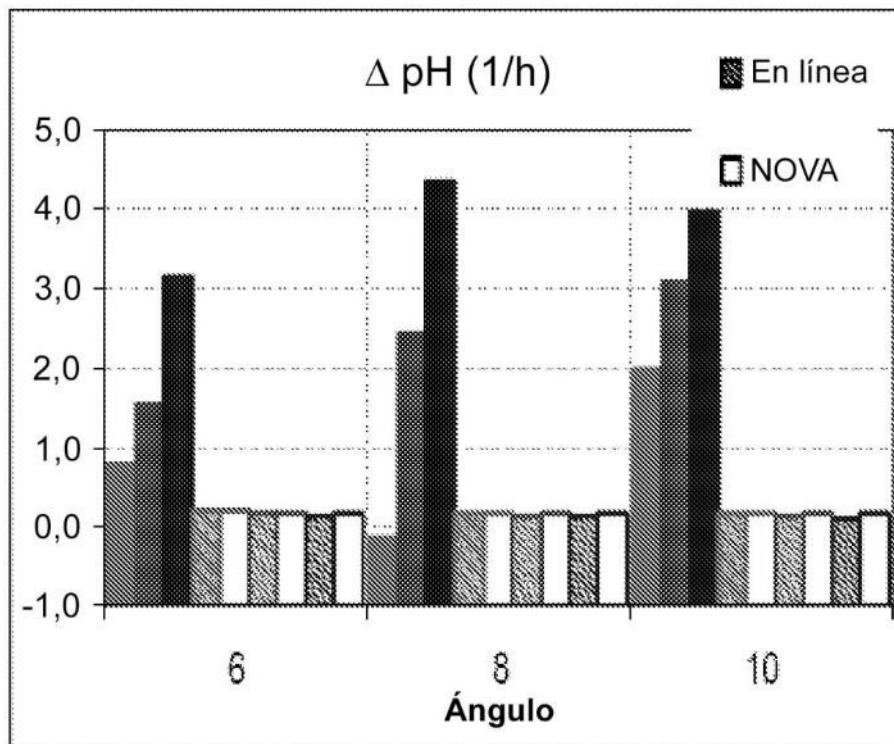


Figura 3

D

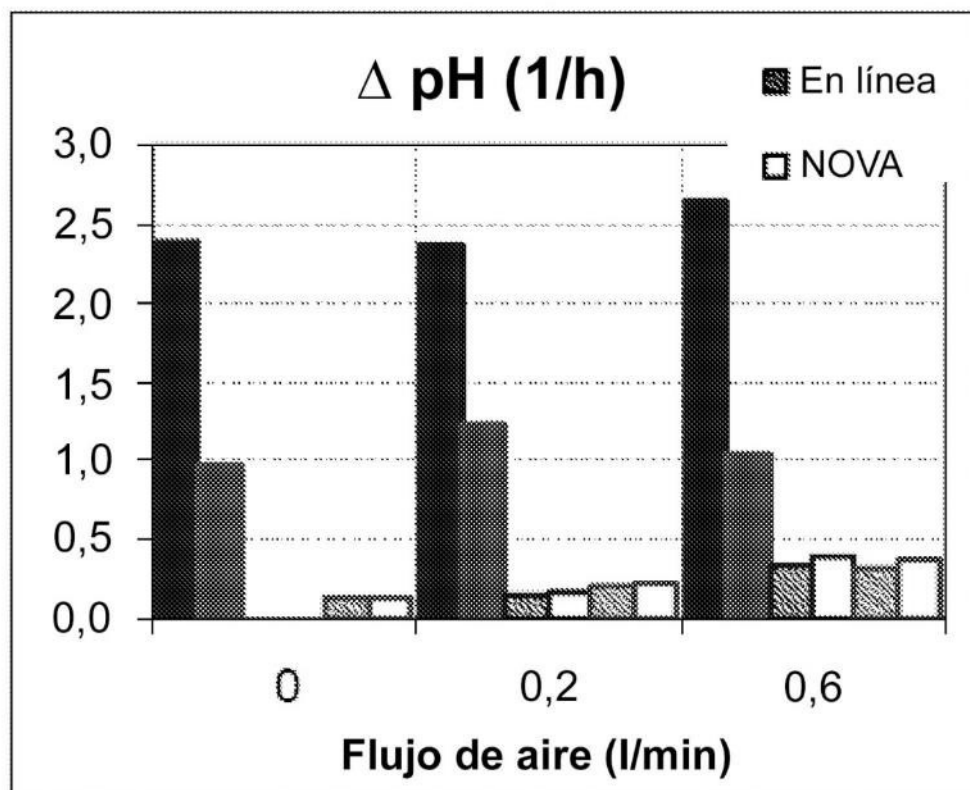


Figura 4

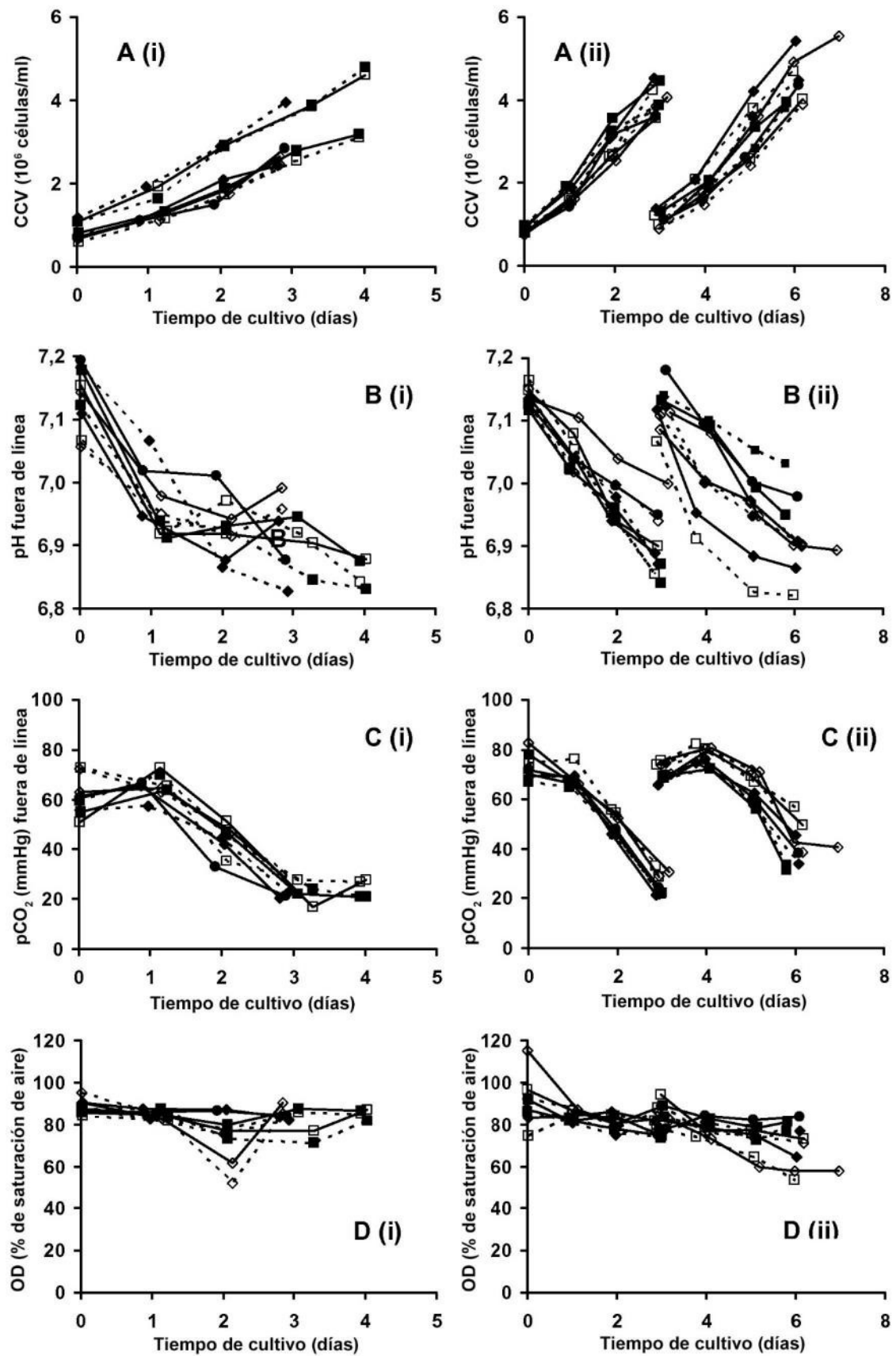


Figura 5

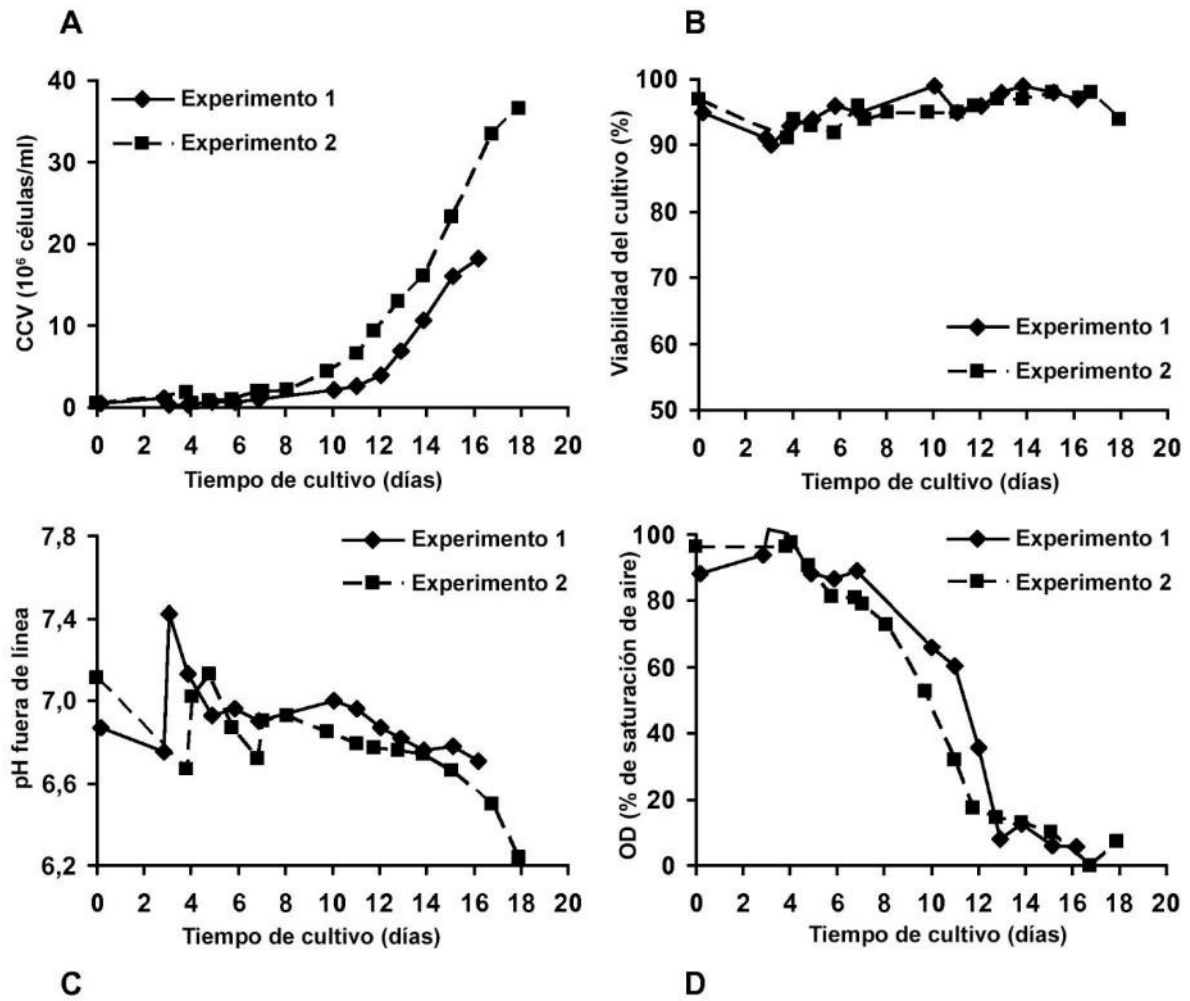


Figura 6

A

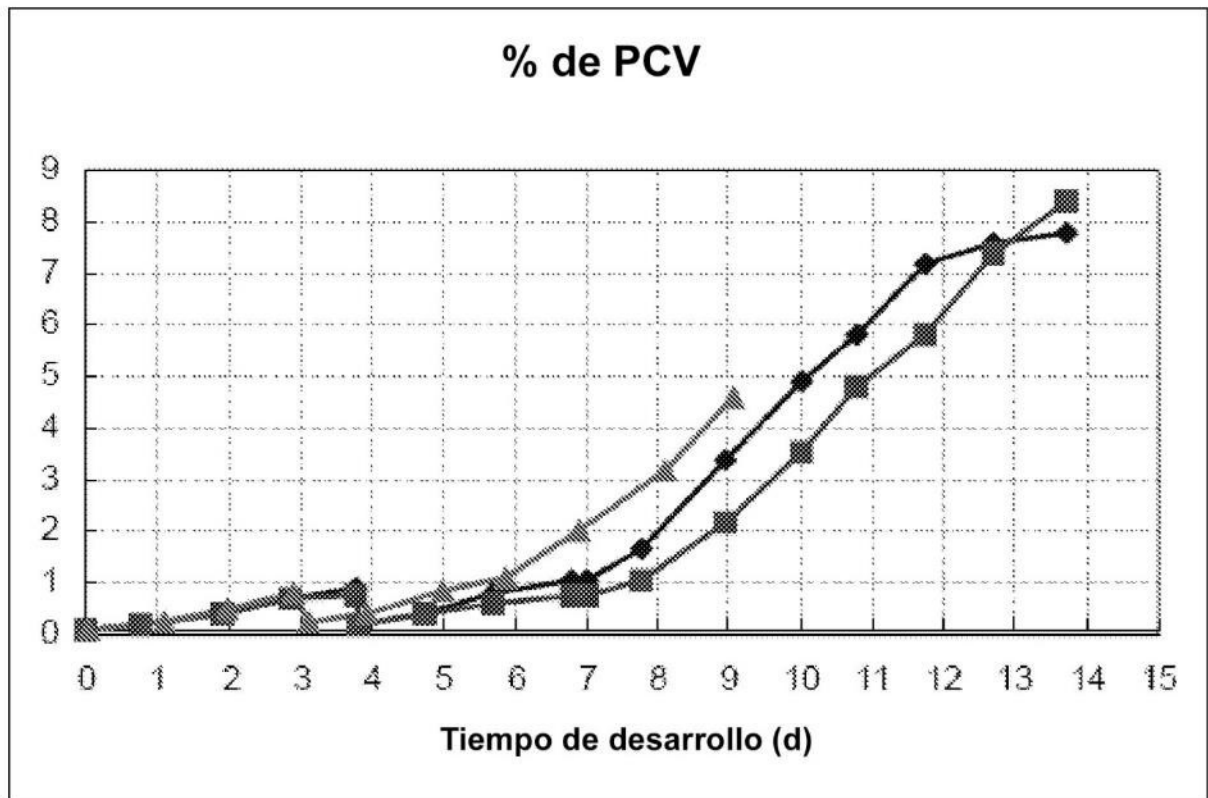


Figura 6

B

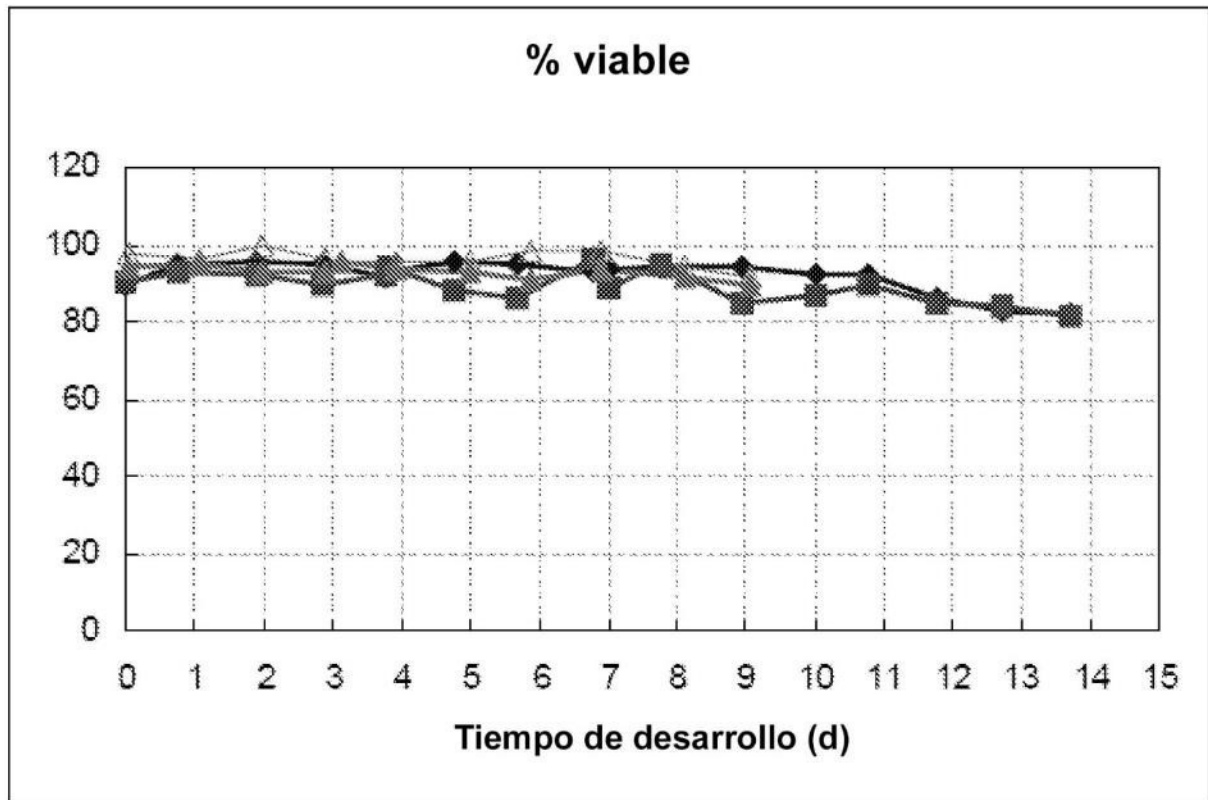


Figura 6

C

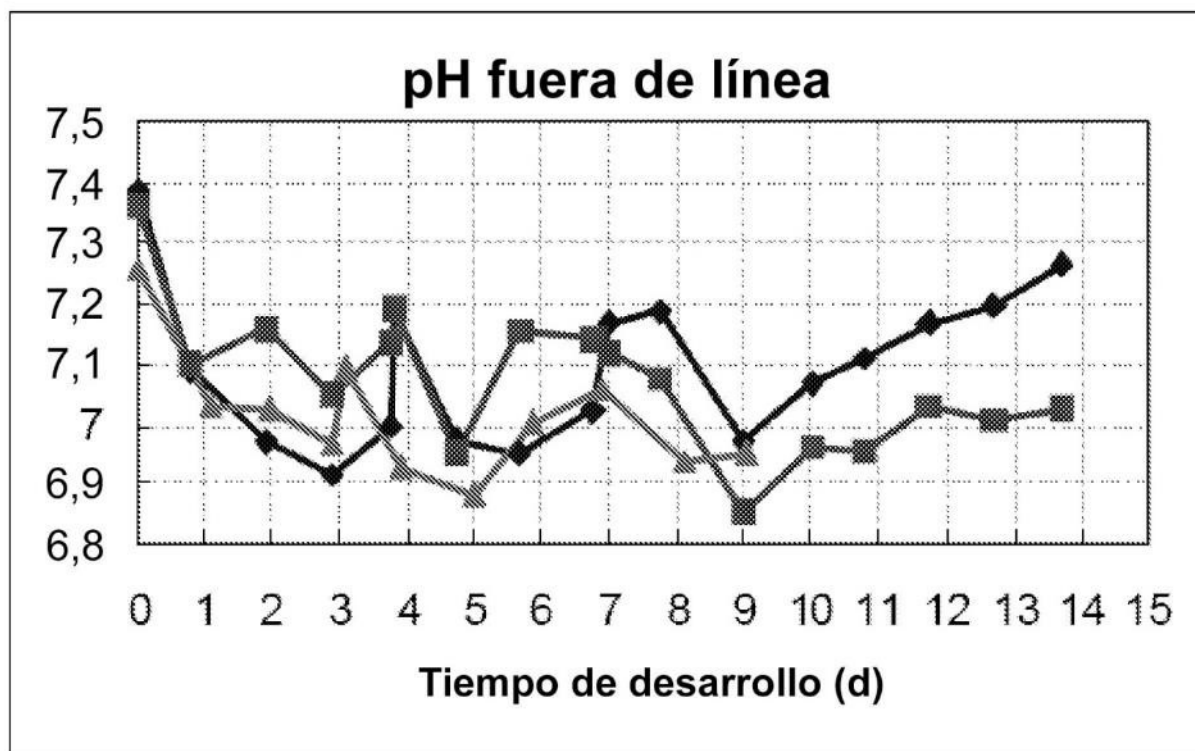


Figura 6

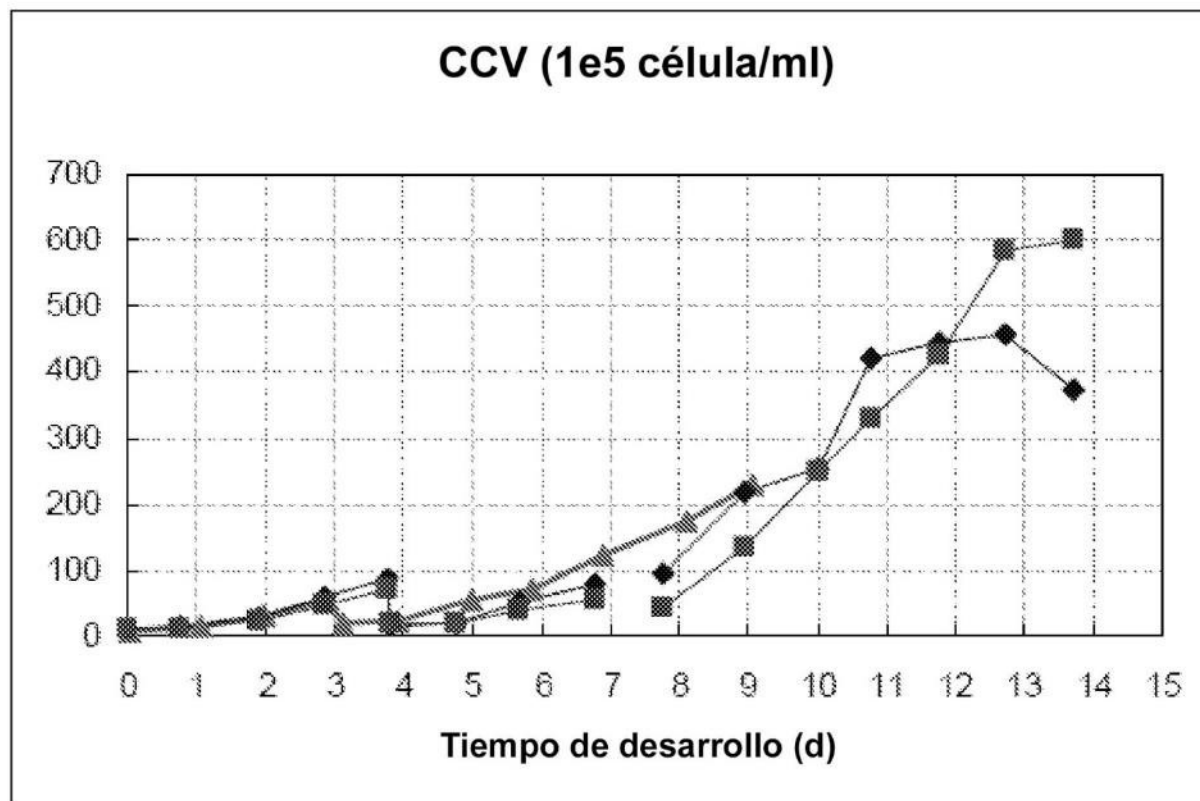
D

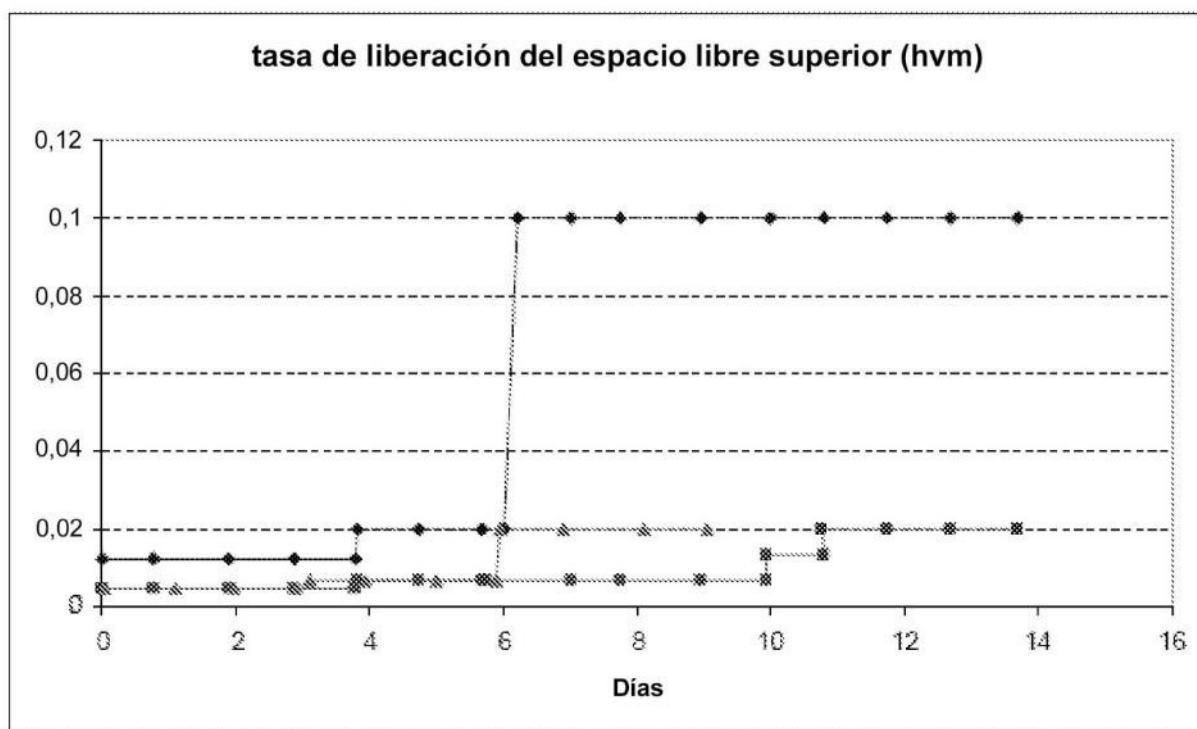
Figura 7**A**

Figura 7

B

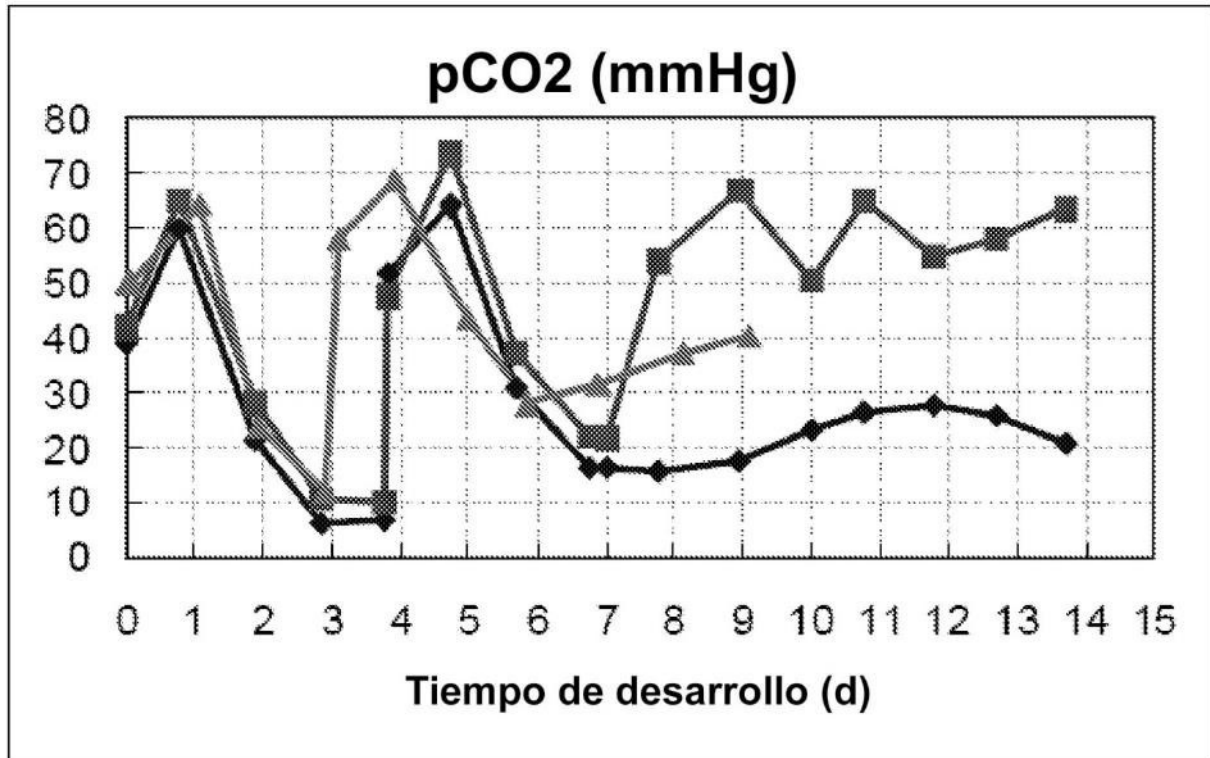


Figura 8

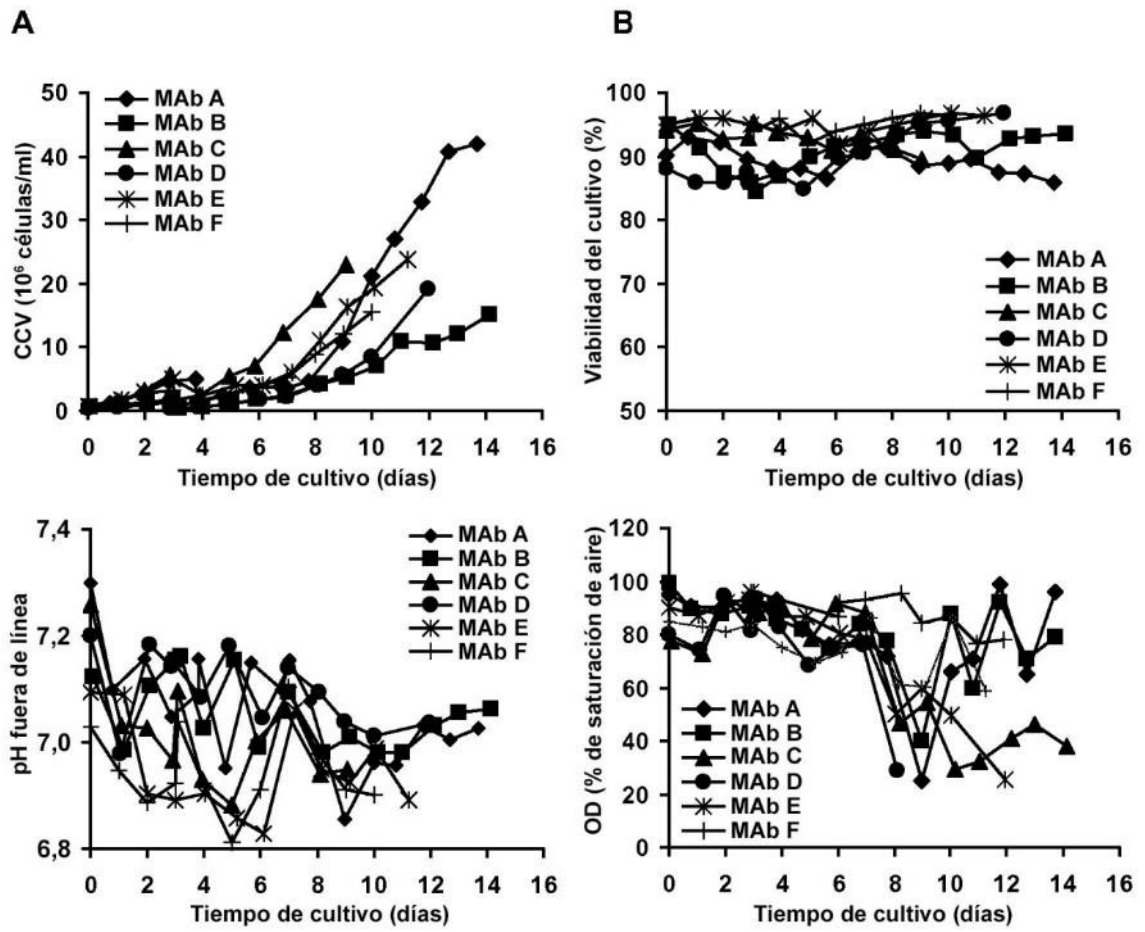
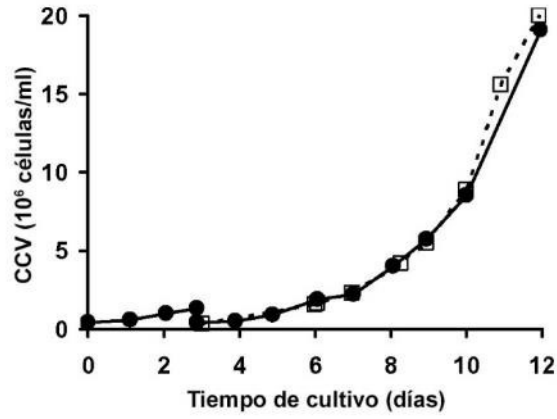
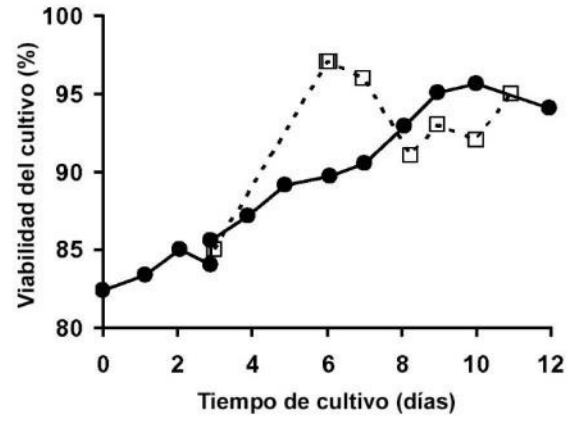


Figura 9

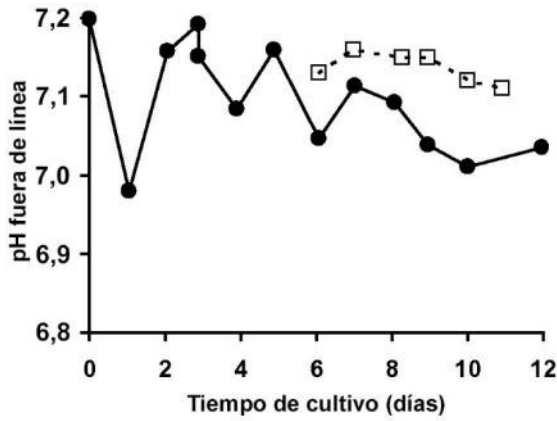
A



B



C



D

