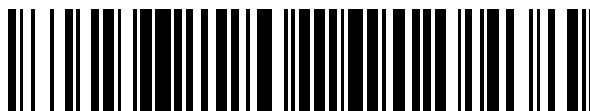


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 481**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2015** **PCT/US2015/025069**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015** **WO15160614**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2015** **E 15718320 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** **EP 3132020**

54 Título: **Recipiente para cultivo celular y su uso**

30 Prioridad:

17.04.2014 US 201461980673 P
25.02.2015 US 201562120566 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.05.2020

73 Titular/es:

CORNING INC. (100.0%)
1 Riverfront Plaza
Corning, NY 14831, US

72 Inventor/es:

KENNEY, DAVID ALAN;
KLADIAS, NIKOLAOS PANTELIS;
KWEI, SHANG-PIN;
RAMMOHAN, ARAVIND RAGHAVAN;
WALL, JOSEPH CHRISTOPHER y
YOUNGBEAR, KATHY MARIE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 762 481 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

Recipiente para cultivo celular y su uso

5 Antecedentes

Campo

10 La presente descripción se refiere en general a artículos de laboratorio, y más específicamente a recipientes y métodos de cultivo celular.

Antecedentes técnicos

15 Las entidades biológicas como bacterias, levaduras, hongos y células animales/vegetales se cultivan comúnmente in vitro en varios tipos de recipientes o matraces. Las células o sus subproductos se utilizan en diversas disciplinas relacionadas con la biotecnología, incluidas la medicina, la farmacología y la investigación e ingeniería genética.

20 Un método para cultivar entidades biológicas consiste en colocarlas en un recipiente parcialmente lleno con un medio de cultivo y agitar el recipiente, por ejemplo, mediante el uso de un agitador orbital a la vez que se expone el medio de cultivo a una fuente de oxígeno. Una ilustración del mecanismo de agitación se representa en la figura 1. El recipiente 100 se coloca en una mesa de agitación 200, que realiza un movimiento circular con un radio igual a la mitad del diámetro de agitación.

25 El crecimiento de microorganismos en dicho recipiente depende del acceso adecuado del medio de cultivo 60 al oxígeno. Para los medios contenidos en los recipientes, el oxígeno se transfiere al cultivo de los medios a través del espacio superior 120 del recipiente. Debido a que la difusión de oxígeno a través de la interfaz gas-líquido es proporcional al área superficial del líquido, cuanto mayor sea el área superficial del líquido, mejor será la aireación del medio biológico. La agitación del recipiente, por ejemplo, crea un vórtice que expone más área superficial del líquido al espacio superior.

30 La tasa de transferencia de oxígeno (OTR) entre el espacio superior 120 y la fase líquida puede describirse como

$$OTR = k_L \alpha (C_L^* - C_L),$$

35 donde $k_L \alpha$ es el coeficiente de transferencia de masa volumétrica, C_L^* es la concentración de oxígeno en la interfaz gas-líquido saturada, y C_L es la concentración de oxígeno en la fase líquida.

El coeficiente de transferencia de masa volumétrica, $k_L \alpha$, es una función de la geometría del recipiente, las condiciones del proceso (por ejemplo, la frecuencia de agitación y el volumen de llenado), así como las propiedades de los medios biológicos. Una relación empírica para $k_L \alpha$ puede representarse como

40
$$k_L \alpha = C_1 d^{1.92} n^{1.16} d_o^{0.38} V_L^{-0.83},$$

donde d es el diámetro interno máximo del recipiente, n es la frecuencia de agitación, d_o es el diámetro de agitación, y V_L es el volumen de llenado.

45 A partir de esta relación empírica, los solicitantes han demostrado que puede lograrse una aireación celular comparable durante el escalado de un recipiente de una capacidad determinada mediante uno o más de lo siguiente (i) un aumento en el diámetro del recipiente, (ii) un aumento de la frecuencia de agitación, y (iii) un aumento del diámetro de agitación. Si el diámetro del recipiente y el diámetro de agitación están limitados a permanecer sin cambios, el enfoque principal para lograr una aireación similar en un recipiente de escalado es aumentar la frecuencia de agitación. Sin embargo, con un aumento de la frecuencia de agitación, las células experimentan mayor estrés hidrodinámico (cizallamiento), que puede ser perjudicial para la viabilidad celular si el estrés excede un valor límite máximo.

50 En consecuencia, existe la necesidad de recipientes de cultivo celular de alto rendimiento (gran volumen) que puedan usarse para medios de cultivo sin los efectos adversos del estrés hidrodinámico, y que sean compatibles con la infraestructura existente.

El documento US 4665035 describe un aparato de fermentación aeróbica en matraz de agitación.

60 El documento US 2005/0277188 A1 describe un contenedor para cultivo celular.

El documento CN 202576417 U describe un cultivo de microorganismos en matraz triangular.

El documento CN 202246687 U describe una botella para cultivo de microorganismos.

65

Breve resumen

De acuerdo con las modalidades de la presente descripción, se describe un recipiente biorreactor de escalado. El recipiente tiene un volumen de líquido mayor que 3 litros (por ejemplo, 4 o 5 litros) y, para lograr una compatibilidad con la infraestructura existente, mantiene el mismo diámetro máximo del recipiente, altura del recipiente, y diámetro de agitación que un recipiente biorreactor de 3 litros, más pequeño. La capacidad de un recipiente de 5 litros es 67 % mayor que la capacidad de un recipiente de 3 litros.

A manera de ejemplo, un recipiente de 5 litros como se describe en la presente descripción, lleno con 2.5 litros de medios biológicos logra una aireación comparable con un recipiente de 3 litros lleno hasta 1.5 litros a la misma frecuencia de agitación. Además, el recipiente de 5 litros excede la aireación de un recipiente de 3 litros a 1.5x la frecuencia de agitación en un 19 % sin exceder el esfuerzo cortante máximo permisible para la viabilidad celular. Los recipientes descritos incluyen opcionalmente una pluralidad de deflectores interiores que interrumpen el vórtice líquido y reducen el esfuerzo cortante máximo transferido a los medios biológicos contenidos dentro del recipiente. Cada deflector se eleva (es decir, convexo) con respecto a una superficie interna del recipiente.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un recipiente para cultivar células como se define en la reivindicación 1. A diferencia de los matraces convencionales, la pared lateral se estrecha hacia adentro con un ángulo de inclinación de 4-10°.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para cultivar células según se define en la reivindicación 11. El recipiente puede agitarse a una frecuencia mayor que 60 rpm.

Las características y ventajas adicionales del tema de la presente invención se expondrán en la descripción detallada a continuación, y en parte serán muy evidentes para los expertos en la materia a partir de esa descripción o serán reconocidas al practicar el tema de la presente descripción como se describe en la presente, que incluye la descripción detallada a continuación, las reivindicaciones, así como los dibujos adjuntos.

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada presentan modalidades del tema de la presente descripción, y están destinadas a proporcionar una visión general o un marco para comprender la naturaleza y el carácter del tema de la presente descripción como se reivindica. Los dibujos adjuntos se incluyen para proporcionar una comprensión adicional del tema de la presente descripción, y se incorporan y constituyen una parte de esta descripción. Los dibujos ilustran diversas modalidades de la materia objeto de la presente descripción y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios y las operaciones de la materia objeto de la presente descripción.

Breve descripción de las figuras

La siguiente descripción detallada de modalidades específicas de la presente descripción se puede entender mejor cuando se lee junto con los siguientes dibujos, donde una estructura semejante se indica con números de referencia semejantes y en donde:

La figura 1 es un diagrama esquemático de un recipiente sometido a agitación orbital;
 La figura 2A es una ilustración esquemática de un recipiente convencional de 3 litros y la figura 2B es una ilustración esquemática de un recipiente de escalado de 5 litros con deflectores;
 La figura 3 es un dibujo que muestra varias perspectivas de un recipiente de escalado de 5 litros con deflectores;
 La figura 4 es una serie de dibujos modelados y fotografías correspondientes que muestran el arrastre de líquido a lo largo de las paredes laterales de un recipiente en función de la frecuencia de agitación;
 La figura 5 es un gráfico de arrastre de líquido versus frecuencia de agitación para los resultados modelados y experimentales;
 La figura 6 es un gráfico que muestra el efecto del esfuerzo cortante sobre la viabilidad celular;
 La figura 7 es un gráfico de esfuerzo cortante máximo frente a la frecuencia de agitación;
 La figura 8 es una ilustración modelada de contornos de la fracción de volumen de aire en (a) un recipiente sin deflectores de 3 litros y (b) un recipiente sin deflectores de 5 litros;
 La figura 9 es un gráfico que compara (a) la aireación y (b) el esfuerzo cortante máximo en recipientes sin deflectores de 3 litros y 5 litros;
 La figura 10 es una ilustración modelada de contornos de la fracción de volumen de aire en (a) un recipiente con deflectores de 3 litros, (b) un recipiente de 5 litros con deflectores de 3 litros, y (c) un recipiente de 5 litros con deflectores como se describe en diversas modalidades;
 La figura 11 es un gráfico que muestra el promedio de la fracción del volumen de aire ponderado en volumen para los recipientes de la figura 10;
 La figura 12 es un gráfico que muestra el esfuerzo cortante máximo en recipientes con deflectores de 3 litros y 5 litros;
 Las Figuras 13A y 13B son ilustraciones modeladas de contornos de la fracción de volumen de aire en recipientes de 5 litros ilustrativos;
 La figura 14 es un gráfico que muestra el promedio de la fracción del volumen de aire en recipientes con deflectores de 3 litros y 5 litros;
 La figura 15 es un gráfico que muestra el esfuerzo cortante máximo en recipientes con deflectores de 3 litros y 5 litros;
 La figura 16 es una ilustración modelada que muestra el efecto del material de la pared del recipiente sobre la aireación;

Las Figuras 17A y 17B son dibujos en perspectiva de un recipiente con deflectores de 5 litros que tiene un canal de vertido en forma de V; y

La figura 18 es un gráfico que compara la densidad celular contra el tiempo para un recipiente con deflectores de 5 litros con un recipiente disponible comercialmente.

5

Descripción detallada

10

Ahora se hará referencia con mayor detalle a diversas modalidades del tema de la presente descripción, algunas de las cuales se ilustran en los dibujos adjuntos. Los mismos números de referencia se usarán a lo largo de todos los dibujos para referirse a las mismas partes o a partes similares.

15

La figura 2 es un dibujo esquemático de un recipiente convencional sin deflectores de 3 litros (Figura 2a) y, como se describe de acuerdo con diversas modalidades en la presente, un recipiente de escalado de 5 litros con deflectores (Figura 2b). Ambos recipientes tienen un fondo con bordes periféricos redondeados que son integrales con una pared lateral con forma cónica que se estrecha hacia adentro.

20

Las paredes del recipiente de 5 litros están ligeramente inclinadas hacia adentro con un ángulo de inclinación de 4-10° (por ejemplo, 4°, 6°, 8° o 10°) desde el eje vertical, a diferencia del recipiente de 3 litros donde el ángulo de inclinación de la pared es de 30°. Las paredes menos inclinadas del recipiente de 5 litros dan como resultado una mayor capacidad de volumen sin ningún cambio en el diámetro máximo del recipiente o su altura total. Un área de transición corta, inclinada hacia adentro 220 une un cuello 210 al cuerpo principal del recipiente 230. En el ejemplo del recipiente de 3 litros, el cuello tiene un diámetro que es aproximadamente el 25 % del diámetro máximo del recipiente. En el ejemplo del recipiente de 5 litros, el cuello tiene un diámetro que es aproximadamente el 33 % del diámetro máximo del recipiente.

25

Los medios de cultivo celular y las células pueden introducirse en el recipiente y retirarse del recipiente a través de una abertura 226. La abertura 226 del recipiente puede volverse a cerrar a manera de una tapa (no mostrada) que se puede unir de forma desmontable para evitar que se derrame el contenido del recipiente. La tapa puede incluir una cara abierta que está cubierta por una lámina de material de filtro. El material de filtro permite que el oxígeno ingrese al interior del recipiente al tiempo que reduce el riesgo de contaminación de su contenido.

30

35

En modalidades, el diámetro externo máximo del recipiente de 5 litros puede variar de aproximadamente 220 a 240 mm, por ejemplo, aproximadamente 220, 230 o 240 mm. Un diámetro externo del cuerpo principal del recipiente 230 puede variar desde un mínimo en el extremo inclinado, adyacente al cuello, de aproximadamente 180 a 220 mm hasta un máximo igual al diámetro externo máximo del recipiente. El diámetro externo del cuello 210 puede variar de aproximadamente 60 a 80 mm, por ejemplo, aproximadamente 60, 70 u 80 mm. La altura del cuello 210 puede variar de aproximadamente 50 a 80 mm, por ejemplo, aproximadamente 50, 60, 70 u 80 mm. Una altura total del recipiente puede variar de aproximadamente 280 a 290 mm, por ejemplo, aproximadamente 285 mm. Una porción exterior del cuello 210 puede ser estriada o de lo contrario rugosa para proporcionar una superficie de agarre. En modalidades, el cuello se desvía a una abertura del recipiente 226 que tiene un área de sección transversal más grande que el cuello. Por ejemplo, la abertura del recipiente 226 puede tener un diámetro que varía de aproximadamente 90 a 100 mm. Una abertura más grande presenta un área de sección transversal más grande para mejorar la ventilación.

40

45

Con referencia a la Figura 2b, se ilustran cuatro deflectores separados simétricamente 280 cada uno en forma de V, un ángulo de la pared lateral de 80°-110° y, en modalidades, una altura medida paralela al eje longitudinal (vertical) que está por debajo de la altura de llenado de 2.5 litros. En modalidades, la altura del deflector está entre 60 % a 120 % de la altura del nivel de llenado de 2.5 litros. Los deflectores corren a lo largo de la pared lateral del recipiente 235 y, donde el fondo del recipiente se une con la pared lateral, se extienden radialmente hacia adentro hacia el eje del recipiente. El grado en que el deflector se extiende hacia adentro en la pared inferior del recipiente puede medirse por el ángulo formado entre la pared del deflector y la pared inferior del recipiente. En la modalidad ilustrada el ángulo es 15°, aunque el ángulo entre la pared del deflector y la pared inferior puede variar de 5° a 30°.

50

55

La figura 3 muestra dibujos de ingeniería en perspectiva de un recipiente de escalado de 5 litros con deflectores de acuerdo con las modalidades. En la vista en sección transversal (A-A) los deflectores definen un paso de 15° con respecto al fondo del recipiente. Cada altura de deflector es 1.96 pulgadas (~49.7 mm) sobre cuya altura cada deflector tiene una profundidad de 0.23 pulgadas (~5.9 mm). Los deflectores terminan con una sección inclinada que tiene un radio de curvatura de 1.04 pulgadas (~26.5 mm). Otras características de los deflectores son visibles en la sección B-B, que incluye un radio interno de curvatura de 0.11 pulgadas (~2.8 mm), un radio externo de curvatura de 0.44 pulgadas (~11.2 mm), y una sección transversal en forma de V, que forma un ángulo de 96°.

60

Durante el uso, los deflectores 280 rompen el vórtice de un líquido agitado y promueven el crecimiento de un material biológico. Los deflectores del biorreactor de 5 litros están diseñados para lograr una aireación similar a la lograda con el biorreactor de 3 litros a la misma frecuencia de agitación, o mejor aireación a 1.5x la frecuencia de agitación sin exceder el esfuerzo cortante máximo permisible para la viabilidad celular.

65

El diseño del recipiente de 5 litros se basa en un análisis computacional de la dinámica de fluidos (CFD) del flujo de dos fases (medios biológicos en líquido y aire) dentro del recipiente en agitación. El CFD se usó para desarrollar un modelo

numérico del recipiente en agitación. El modelo se usó para obtener información sobre la aireación, el esfuerzo cortante máximo y el grado de mezclado. Sobre la base de los datos de referencia para el diseño del recipiente de 3 litros, el análisis CFD se usó para diseñar un recipiente de 5 litros para cumplir o superar el rendimiento del recipiente de 3 litros.

5 Sobre la base de la relación empírica analizada anteriormente, se apreció que para lograr una aireación celular comparable para un mayor volumen de llenado, se necesitaría un aumento en uno o más del diámetro máximo del
recipiente, el diámetro de agitación y la frecuencia de agitación. Específicamente, a manera de ejemplo, para aumentar
el volumen de llenado de 1,5 litros (recipiente de 3 litros) a 2,5 litros (recipiente de 5 litros), según la ecuación anterior,
sería necesario (a) aumentar el diámetro máximo del recipiente en aproximadamente un 25 %, o (b) aumentar el diámetro
10 de agitación en aproximadamente un 300 %, y/o (c) aumentar la frecuencia de agitación en aproximadamente un 45 %.

Para producir un recipiente que sea compatible con la infraestructura existente, el diámetro máximo del recipiente y el
diámetro de agitación deben permanecer sin cambios con respecto al diseño de 3 litros. Si reconocemos que los
recipientes de 3 litros típicamente se agitan a una frecuencia de 60 rpm, para lograr la misma aireación en un recipiente
15 de 5 litros, se necesita una frecuencia de agitación de aproximadamente 90 rpm. Sin embargo, como se analiza a
continuación, la agitación de un recipiente de 5 litros, sin deflectores, probablemente producirá esfuerzos de cizallamiento
que exceden los esfuerzos máximos permisibles para la viabilidad celular.

En modalidades, por medio de la ubicación de los deflectores en el diseño del recipiente de 5 litros, el recipiente de 5 litros
20 lleno hasta 2.5 litros se compara con el recipiente de 3 litros lleno a 1.5 litros a 60 rpm, y excede el rendimiento del
recipiente de 3 litros a 90 rpm sin exceder el esfuerzo cortante máximo permisible para la viabilidad celular a la misma
frecuencia de agitación.

El modelo CFD se validó inicialmente utilizando el diseño del recipiente de 3 litros. En los experimentos, un recipiente de
25 3 litros que contenía agua coloreada se colocó en una mesa de agitación y se agitó orbitalmente a varias frecuencias de
agitación (por ejemplo, 60, 120 y 200 rpm) con un diámetro de agitación de 40 mm. La fuerza centrífuga resultante de la
rotación orbital del recipiente empuja el líquido hacia las paredes laterales del recipiente y la superficie libre del líquido
adquiere una forma cóncava. El desplazamiento del líquido por la pared lateral aumenta con la frecuencia de agitación y
el aumento concomitante en la fuerza centrífuga. En la figura 4 se muestran fotografías y resultados modelados del
30 arrastre de líquido.

El arrastre de líquido predicho por el modelo a lo largo de las paredes laterales del recipiente estuvo de acuerdo con las
mediciones experimentales. En la figura 5 se muestra gráficamente una comparación directa del arrastre de líquido medido
frente al modelado. El dato para la medición del arrastre de líquido resumido en la figura 5 fue la línea de inserción
35 representada por la flecha en la figura 4, que se ubica 3 cm por encima del fondo del recipiente.

Además de las pruebas de arrastre de líquido, se realizaron mediciones de viabilidad celular para establecer una
referencia para el esfuerzo cortante máximo que se puede permitir antes de que exista un efecto sobre la viabilidad celular.
Las mediciones de viabilidad celular se realizaron con células Sf9. Las pruebas se realizaron mediante el uso de un
40 recipiente de 1 litro agitado a 120, 150 y 175 rpm. Se realizaron dos conjuntos de pruebas en cada frecuencia de agitación:
uno con el recipiente lleno hasta 300 ml y uno con el recipiente lleno hasta 500 ml.

Los resultados de las mediciones de viabilidad celular se presentan en la figura 6, que muestra que las células son
afectadas negativamente a frecuencias de agitación de 150 rpm y mayores, mientras que la viabilidad celular no se afecta
45 cuando el biorreactor de 1 litro se agita a 120 rpm.

Se usó un modelo CFD del biorreactor de 1 litro para correlacionar la viabilidad celular medida con el esfuerzo cortante
máximo permisible. Los datos del modelo CFD se usaron para calcular el esfuerzo cortante máximo en las diversas
velocidades de agitación y volúmenes de llenado experimentales. Los resultados del modelo CFD se presentan en la
50 figura 7, que muestra que el esfuerzo cortante máximo a 120 rpm es 0.28 Pa, que se correlaciona con el esfuerzo cortante
máximo permitido para la viabilidad celular.

En la figura 8 se muestran contornos de la fracción del volumen de aire en el recipiente sin deflectores de 3 litros (no
pertenecientes a la invención), así como en el recipiente de 5 litros (no pertenecientes a la invención) cuando se agitan a
55 60 rpm. A medida que el líquido es empujado a las paredes laterales del recipiente, dentro de la región central del
recipiente el aire entra en el volumen que se llena con líquido mientras el recipiente está en reposo. La fracción promedio
del volumen de aire en el volumen de llenado se proporciona en la figura 9a para los recipientes de escalado sin deflectores
de 3 litros y 5 litros. La Figura 9a muestra que el recipiente sin deflectores de 5 litros proporciona 36 % menos aireación
a las células que la contraparte de 3 litros cuando se agita a 60 rpm. Con referencia a la Figura 9b, a 60 rpm el esfuerzo
60 cortante máximo en el recipiente sin deflectores de 5 litros es aproximadamente 2x el esfuerzo cortante máximo en el
recipiente sin deflectores de 3 litros.

Con referencia de nuevo a la Figura 9a, puede observarse que cuando el recipiente sin deflectores de 5 litros se agita a
90 rpm, la aireación celular es similar al recipiente de 3 litros agitado a 60 rpm. Sin embargo, como se observa en la figura
9b, el esfuerzo cortante máximo en el recipiente sin deflectores de 5 litros (a 90 rpm) es 0.29 Pa (Figura 9b), que excede
65 el esfuerzo cortante máximo permisible para la viabilidad celular.

La introducción de deflectores en el recipiente de 5 litros puede interrumpir el vórtice líquido y reducir el esfuerzo cortante máximo. En este sentido, el modelo CFD se usó para analizar varios diseños de deflectores. Los deflectores adecuados proporcionan una combinación de buena aireación celular y bajo esfuerzo cortante.

Los deflectores ilustrativos tienen una forma de V, un ángulo de la pared lateral de 80°-110° y, en modalidades, una altura cuando se mide paralela al eje longitudinal del recipiente de 5 litros que está por debajo del nivel de llenado de 2.5 litros. En modalidades, la altura del deflector puede variar de 60 % a 120 % de la altura del nivel de llenado.

Los deflectores se extienden a lo largo de la pared lateral del recipiente y, donde la pared lateral se une a la pared inferior del recipiente, se extiende radialmente hacia adentro hacia el eje central del recipiente. El grado en que el deflector se extiende hacia adentro en la pared inferior del recipiente puede medirse por el ángulo formado entre la pared del deflector y la pared inferior del recipiente.

En la figura 10 se muestran gráficos de contorno de la fracción del volumen de aire en (a) un recipiente con deflectores de 3 litros, (b) un recipiente con deflectores de 5 litros que utiliza un diseño de deflector del recipiente de 3 litros, y (c) un recipiente con deflectores de 5 litros de acuerdo con las modalidades de la presente descripción.

Una comparación de las figuras 10b y 10c muestra que con los deflectores descritos, el aire entra más profundo en el volumen de llenado de líquido y por lo tanto produce mejor aireación celular. Esto también se demuestra mediante el valor promedio ponderado en volumen de la fracción del volumen de aire como se muestra gráficamente en la figura 11. De la figura 11, que muestra datos para recipientes agitados a 60 rpm, se logra un 25 % de mejora en la aireación celular con el recipiente de escalado de 5 litros que utiliza el diseño de deflector descrito en comparación con el recipiente de 5 litros con deflectores del recipiente de 3 litros.

Con referencia aún a la figura 11, aunque el rendimiento de aireación del recipiente de 5 litros se mejora con el rediseño de los deflectores, todavía está por debajo del rendimiento del recipiente con deflectores de 3 litros. Sin embargo, como se muestra en la figura 12, para una agitación de 60 rpm el esfuerzo cortante máximo del de 5 litros con el deflector rediseñado es un 16 % menor que el esfuerzo cortante máximo en su contraparte de 3 litros. Los datos de la figura 12 sugieren que puede ser posible aumentar el rendimiento de aireación celular del recipiente con deflectores de 5 litros agitándolo a una frecuencia más alta, es decir, superior a 60 rpm. El modelo CFD muestra un aumento significativo en la aireación celular cuando el recipiente con deflectores de 5 litros se agita a 90 rpm. Esto se demuestra en la figura 13, que muestra los contornos de volumen de aire en un recipiente ilustrativo de 5 litros a (a) 60 rpm y (b) 90 rpm.

Con referencia a la figura 14, cuando se agita a 90 rpm, el biorreactor de escalado de 5 litros descrito proporciona un aumento del 19 % en la aireación celular sobre su contraparte de 3 litros. Esto es posible gracias a los deflectores rediseñados, que ayudan a reducir el esfuerzo cortante máximo de manera que incluso cuando el recipiente con deflectores de 5 litros se agita a 90 rpm, el esfuerzo cortante máximo es 0.24 Pa, que es solo 15 % mayor que el esfuerzo cortante para el recipiente con deflectores de 3 litros y menor que el esfuerzo cortante máximo permisible (0.28 Pa). Este resultado se muestra gráficamente en la figura 15.

Si bien el recipiente con deflectores de 5 litros se describe en la presente como que tiene cuatro deflectores, el modelo CFD muestra que es posible utilizar de 2 a 6 deflectores y aún mejorar la velocidad de crecimiento de los medios biológicos. En modalidades, la pluralidad de deflectores se separa uniformemente alrededor del fondo del recipiente.

En modalidades, el recipiente biorreactor de 5 litros está hecho de (o recubierto internamente con) un material hidrofílico, que promueve el arrastre de líquido más arriba en las paredes laterales del recipiente, dejando más espacio en el centro del volumen de llenado de líquido para que el aire entre y por lo tanto, aumente la aireación celular. Opcionalmente, una superficie interna del recipiente puede tratarse para formar una superficie interna hidrófila. Los tratamientos de superficie ilustrativos incluyen el tratamiento de superficie CellBIND® de Corning y los tratamientos de cultivo de tejidos como la exposición a una descarga en corona. El recipiente, en modalidades adicionales, es una parte unitaria que puede formarse, por ejemplo, por moldeo por inyección o moldeo por soplado. El recipiente no tiene marcas de unión. Los materiales ilustrativos del recipiente incluyen policarbonato, polipropileno y polietileno. El recipiente puede incluir una sola cámara.

El efecto del material del recipiente biorreactor sobre la aireación se ilustra en la figura 16. El análisis CFD muestra que cuando el material del recipiente cambia de hidrofóbico (por ejemplo, ángulo de contacto con el líquido = 30°) a hidrofílico (por ejemplo, ángulo de contacto con el líquido = 90°) se logra una mejora del 13 % en el promedio de la fracción del volumen de aire ponderado en volumen. La aireación promedio para el material hidrofóbico de la pared interna del recipiente fue de 0.0785, mientras que la aireación promedio para el material hidrofílico de la pared interna del recipiente fue de 0.0888.

Los recipientes de 5 litros descritos en la presente pueden comprender una pared lateral que termina sobre una superficie casi horizontal (es decir, paralela al fondo del recipiente), que después pasa a un cuello de menor diámetro. El cuello pasa a una salida de mayor diámetro, opcionalmente con rosca. En modalidades adicionales, como se ilustra en las figuras 17A y 17B, el cuello comprende un canal 300 que facilita el vertido suave del contenido líquido del recipiente. El cuello del

canal también simplifica la evacuación de pequeñas cantidades de fluido de la superficie de transición interior casi horizontal 240.

5 En modalidades el canal 300 se extiende de la pared lateral del recipiente 235 al cuello 210. El canal disminuye de aproximadamente 80° (por ejemplo, 79°) a aproximadamente 45° más allá de la horizontal del ángulo de inclinación del recipiente requerido para verter el contenido líquido completo del recipiente.

10 El canal en forma de V conecta una pared lateral sustancialmente vertical 235 a una boquilla de vertido vertical, de diámetro más pequeño 260 que es concéntrica con el diámetro más grande del recipiente. Una transición entre el diámetro más grande del recipiente y la boquilla de vertido es una superficie horizontal ligeramente inclinada 244. La adición del canal minimiza las salpicaduras de la corriente de fluido que sale del recipiente y también ayuda a eliminar cualquier fluido residual que sea difícil de decantar del recipiente.

15 En una evaluación (volumen de llenado de 2.5 litros, velocidad de agitación de 90 rpm) que compara el rendimiento celular (Sf9) en un recipiente con deflectores de 5 litros de acuerdo con las modalidades con un matraz de cultivo óptimo de 5 litros Thomson disponible comercialmente, el número total de células después de 4 días de cultivo en el recipiente con deflectores de 5 litros fue de aproximadamente 2.6×10^{10} en comparación con solo aproximadamente 2×10^{10} en el recipiente comparativo, lo que representa un aumento en el rendimiento celular de aproximadamente 30 %.

20 En una evaluación relacionada (volumen de llenado de 3.5 litros, velocidad de agitación de 100 rpm), se observó un aumento de 300 % en el rendimiento celular después de 4 días de cultivo, lo que demuestra que la diferenciación entre los dos matraces aumenta con el aumento del volumen de llenado. La figura 18 es un gráfico que compara la densidad celular frente al tiempo para el recipiente con deflectores de 5 litros con el recipiente disponible comercialmente.

25 El recipiente biorreactor de 5 litros descrito en la presente tiene el mismo diámetro, altura y diámetro de agitación máximos que un recipiente de 3 litros y por lo tanto es ventajosamente compatible con la infraestructura existente. Con el volumen total más grande, el recipiente de 5 litros permite un aumento de 67 % en el volumen de medios biológicos que pueden cultivarse en el recipiente. Además, cuando se agita a 1.5x la frecuencia de agitación del biorreactor de 3 litros (es decir, 90 rpm frente a 60 rpm), el recipiente de 5 litros logra un aumento de 19 % en la aireación celular sin exceder el límite máximo de esfuerzo cortante para la viabilidad celular

30 Como se usa en la presente descripción, las formas singulares "un", "uno/una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a un "deflector" incluye ejemplos que tienen dos o más de tales "deflectores" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

35 Los intervalos se pueden expresar en la presente como de "aproximadamente" un valor particular y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa un intervalo de este tipo, los ejemplos incluyen desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. Similarmente, cuando los valores se expresan como aproximaciones mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. Se entenderá, además, que los criterios de valoración principal de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro criterio de valoración principal, e independientemente del otro criterio de valoración principal.

40 A menos que se indique expresamente lo contrario, de ninguna manera se pretende que ningún método expuesto en la presente se interprete como que requiere que sus pasos se realicen en un orden específico. En consecuencia, cuando una reivindicación de método no menciona realmente un orden a seguir en sus etapas o no se indica específicamente de cualquier otra manera en las reivindicaciones o descripciones que las etapas están limitadas a un orden específico, no está previsto de ninguna manera que se infiera ningún orden en particular. Cualquier característica o aspecto único o múltiple mencionado en cualquier reivindicación puede combinarse o permutarse con cualquier otra característica o aspecto mencionado en cualquier otra reivindicación o reivindicaciones.

45 También se señala que la mención en la presente se refiere a un componente que está "configurado" o "adaptado para" funcionar en una manera particular. En este sentido, dicho componente se "configura" o "adapta" para incorporar una propiedad, o función particular en una manera particular, donde tales menciones son menciones estructurales en oposición a las menciones de uso previsto. Más específicamente, las referencias en la presente a la manera en que un componente se "configura" o "adapta" denota una condición física existente del componente y, como tal, debe tomarse como una mención definitiva de las características estructurales del componente.

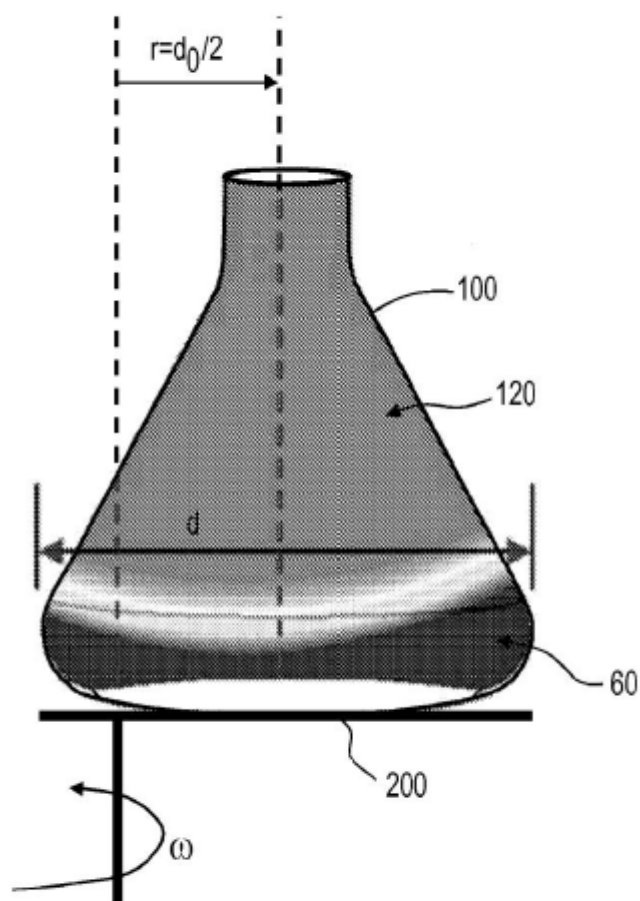
50 Si bien pueden describirse diversas características, elementos o etapas de modalidades particulares mediante el uso de la frase de transición "que comprende", debe entenderse que las modalidades alternativas, que incluyen las que pueden describirse mediante el uso de las frases de transición "que consiste" o "que consiste esencialmente en" están implícitas. Así, por ejemplo, las modalidades alternativas implícitas a un deflector que comprende medios biológicos en líquido y aire incluyen modalidades donde un recipiente consiste en medios biológicos en líquido y aire y modalidades donde un recipiente consiste esencialmente en medios biológicos en líquido y aire.

60 Para los expertos en la técnica será evidente que se pueden hacer diversas modificaciones y variaciones a la presente invención sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un recipiente para cultivar células que comprende:
 5 un cuerpo principal del recipiente (230) definido por un fondo que tiene bordes redondeados que es integral con una pared lateral con forma cónica (235) que se estrecha hacia adentro a una superficie superior (240); un cuello anular alargado integral (210) que se extiende hacia arriba desde la superficie superior (240) hasta una
 10 abertura del recipiente (226); y dos o más deflectores interiores (280) configurados para interrumpir un vórtice de líquido de un medio líquido contenido dentro del recipiente durante la agitación del medio líquido, en donde los deflectores (280) tienen una
 15 sección transversal en forma de V, caracterizado porque:
 la pared lateral (235) está inclinada hacia adentro con un ángulo de inclinación de 4-10°; y los deflectores (280) tienen un ángulo de la pared lateral de 80°-110°.
2. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la superficie superior (240) es sustancialmente horizontal.
3. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cuerpo principal del recipiente (230) tiene un volumen de al menos 5 litros.
4. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el recipiente comprende una parte unitaria.
5. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el recipiente tiene una superficie interna hidrófila.
6. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cuello (210) se une al cuerpo principal del recipiente (230) por medio de un área de transición inclinada.
7. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el diámetro del cuello (210) es menor que un diámetro de la abertura del recipiente (226).
8. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el diámetro del cuello (210) es al menos 30 % de un diámetro máximo del recipiente.
9. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 1, donde los deflectores (280) se elevan con respecto a una superficie interna del recipiente.
10. El recipiente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cuello (210) comprende además un canal de vertido (300).
11. Un método de cultivo de células, que comprende:
 40 introducir un medio de cultivo en el recipiente de conformidad con la reivindicación 1; introducir al menos una línea celular seleccionada en el recipiente; y agitar el recipiente a una frecuencia mayor que 60 rpm.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la frecuencia es 90 rpm.

FIG. 1



D: diámetro del matraz
 D_0 : diámetro de agitación
 ω : velocidad angular del agitador

FIG. 2A



FIG. 2B

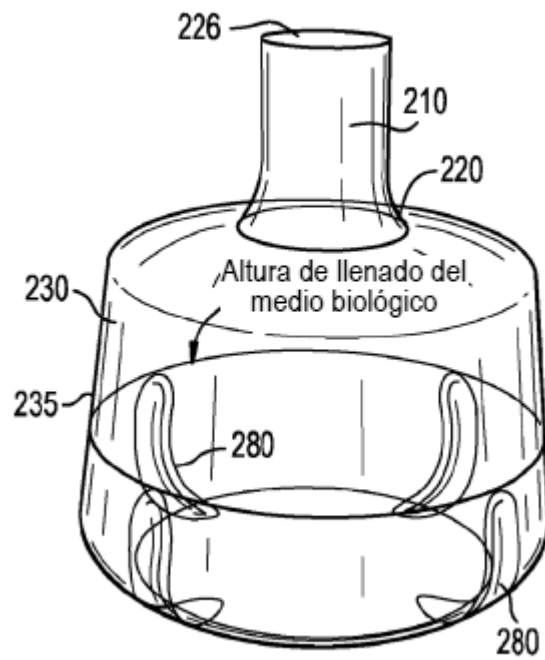


FIG. 3A

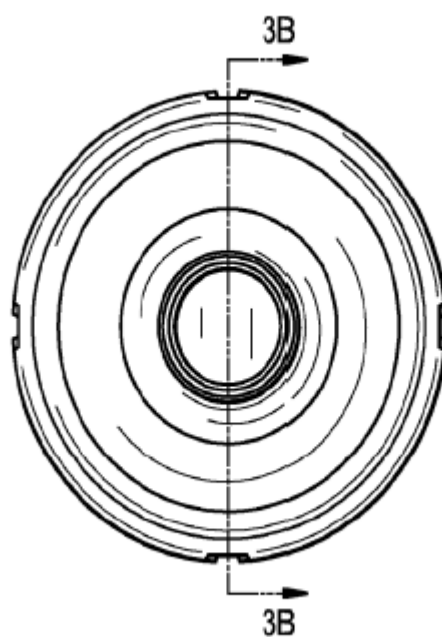


FIG. 3B

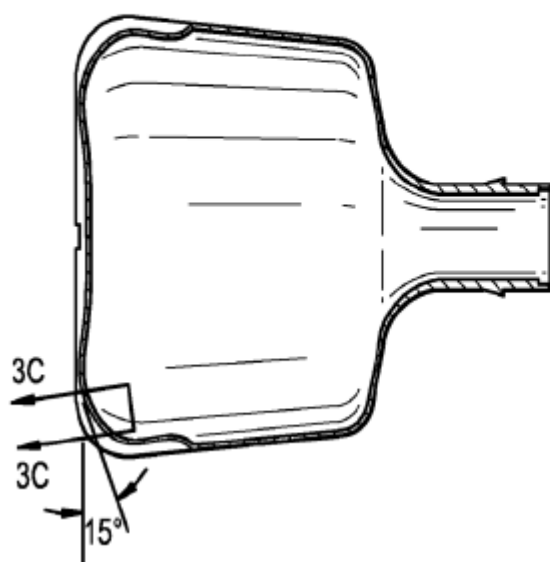


FIG. 3C



FIG. 4A

60 rpm

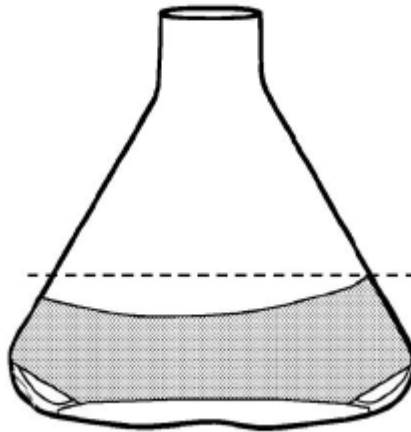
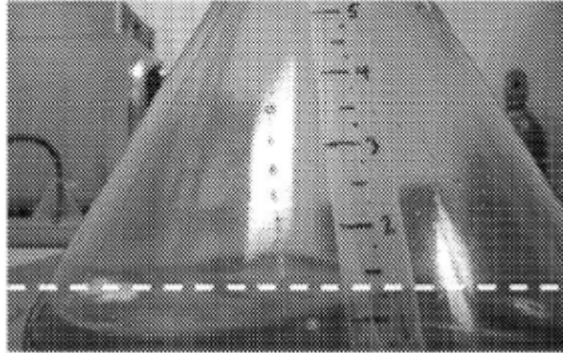


FIG. 4B

120 rpm

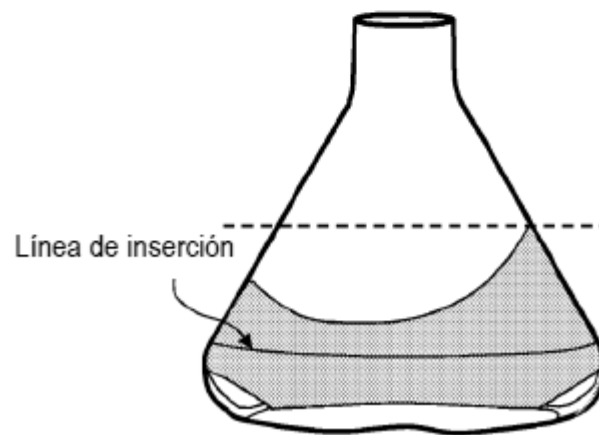
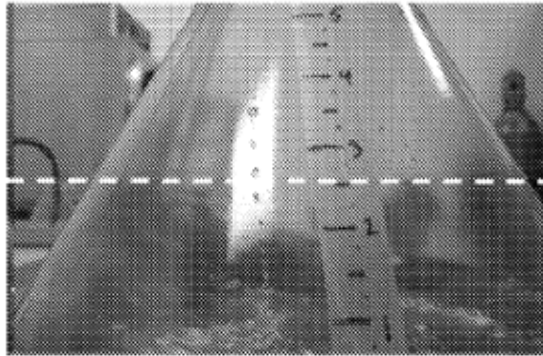


FIG. 4C

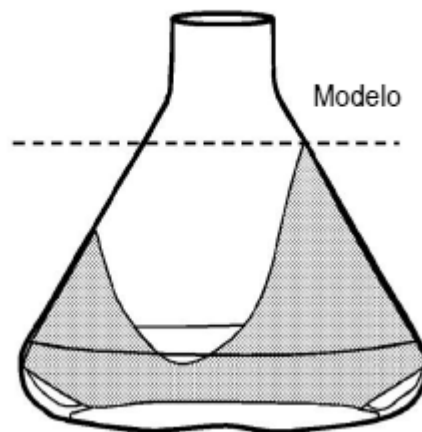
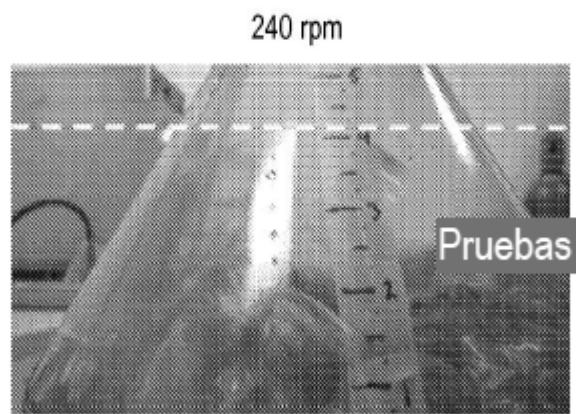


FIG. 5

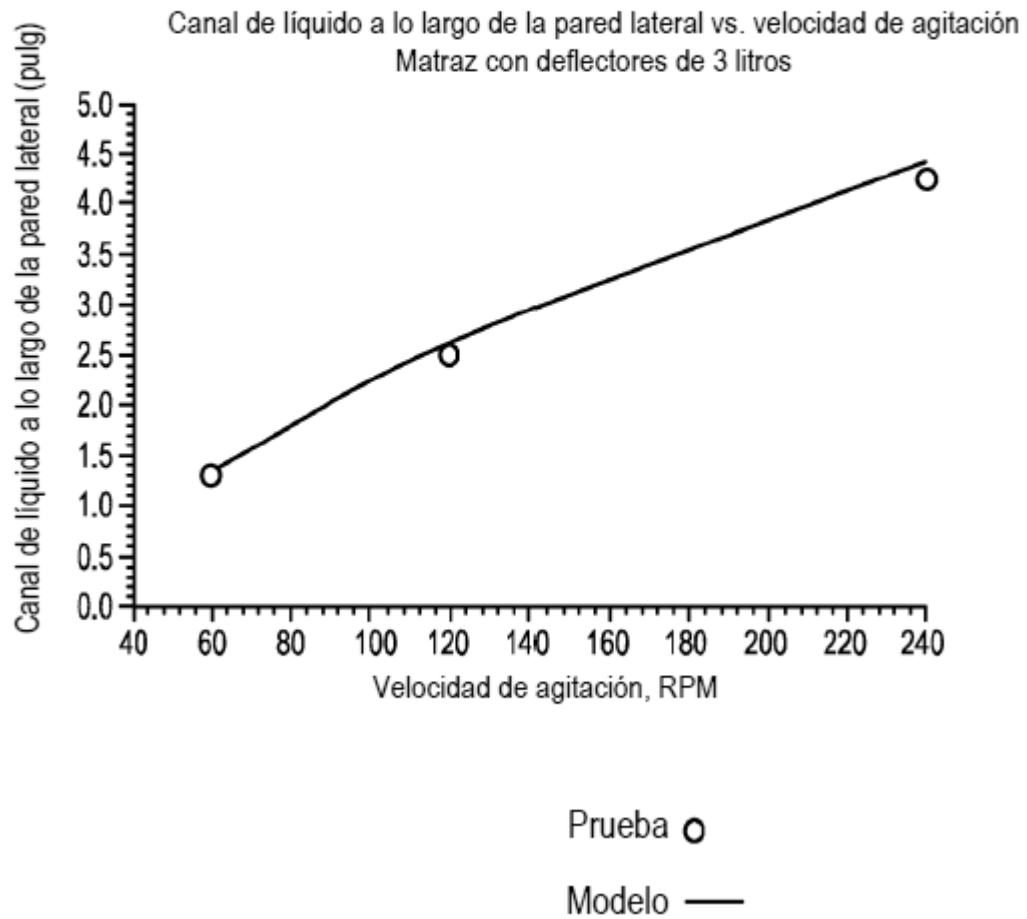


FIG. 6
Viabilidad de células Sf9

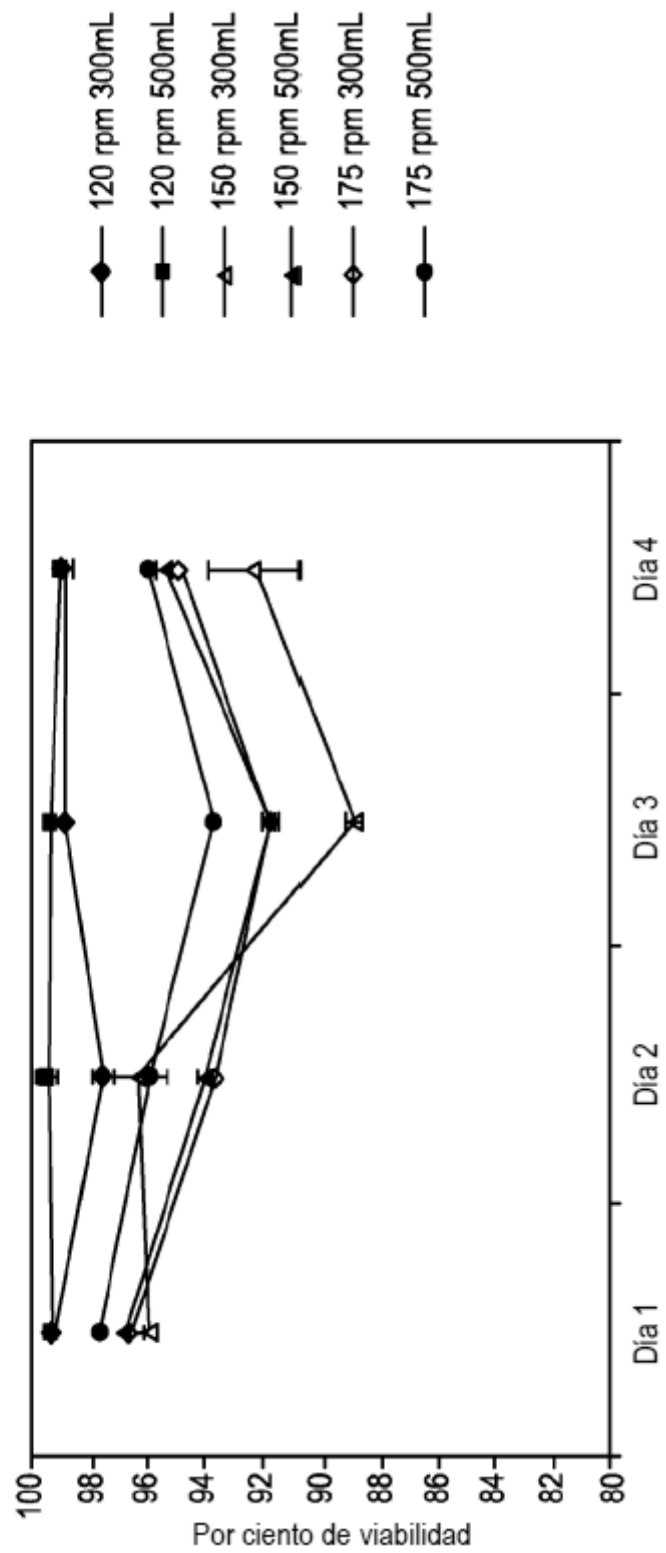
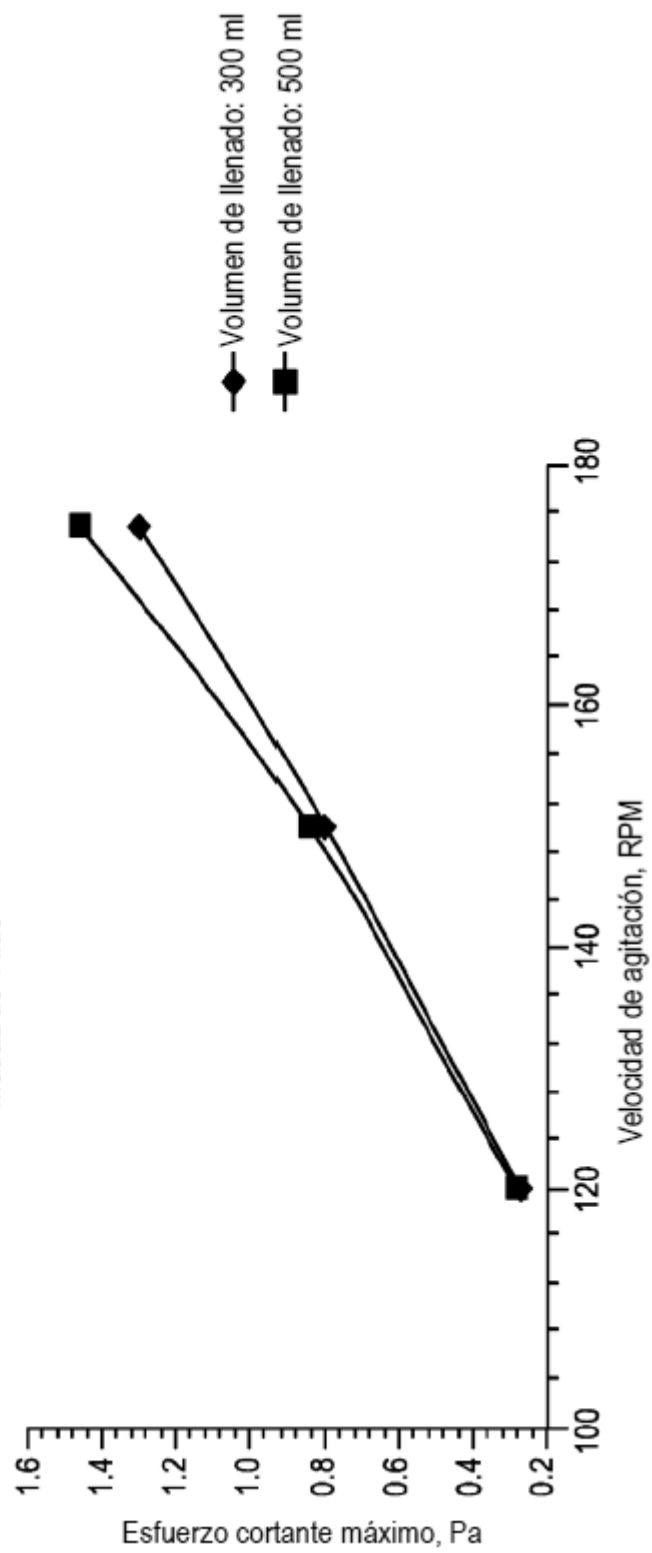


FIG. 7

Esfuerzo cortante máximo vs. velocidad de agitación
Matraz de 1 litro



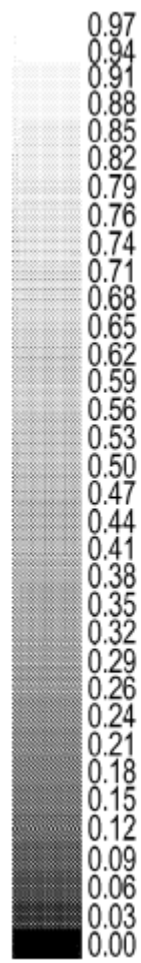
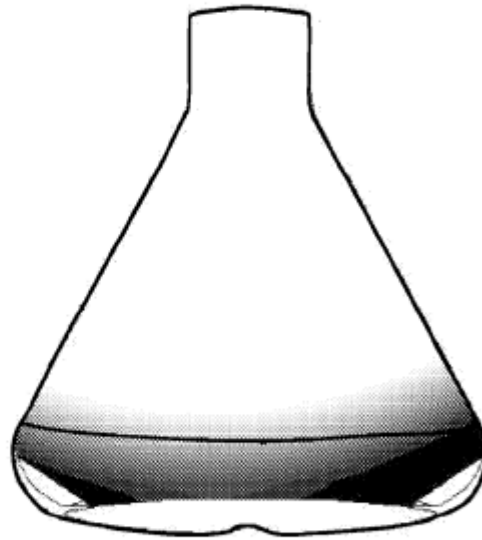


FIG. 8A

Sin deflectores de 3 litros



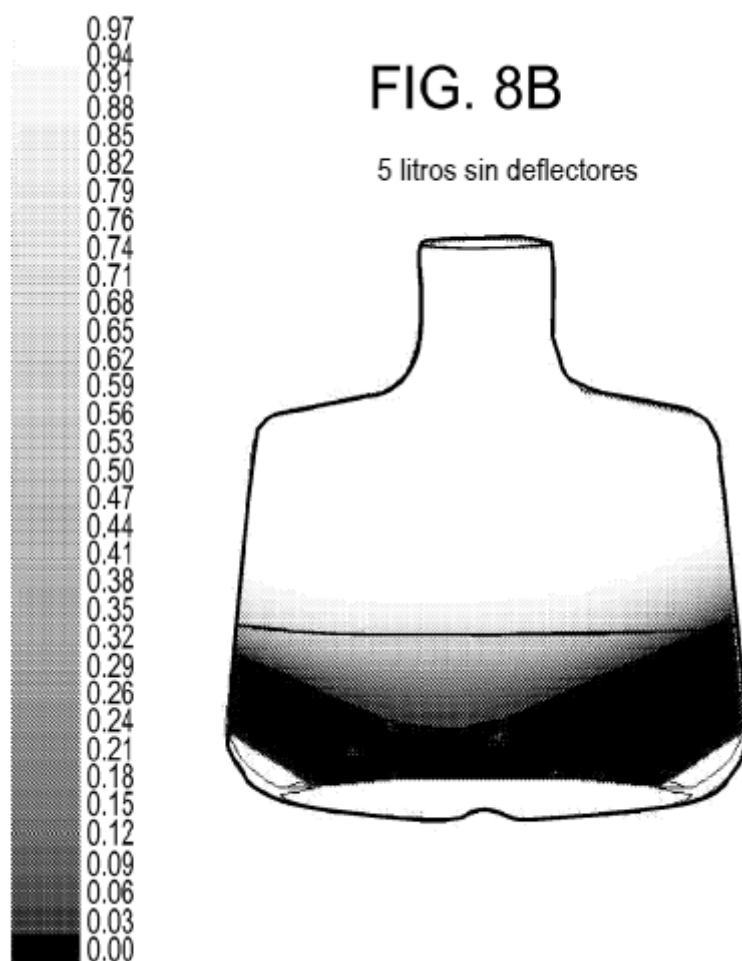


FIG. 9A

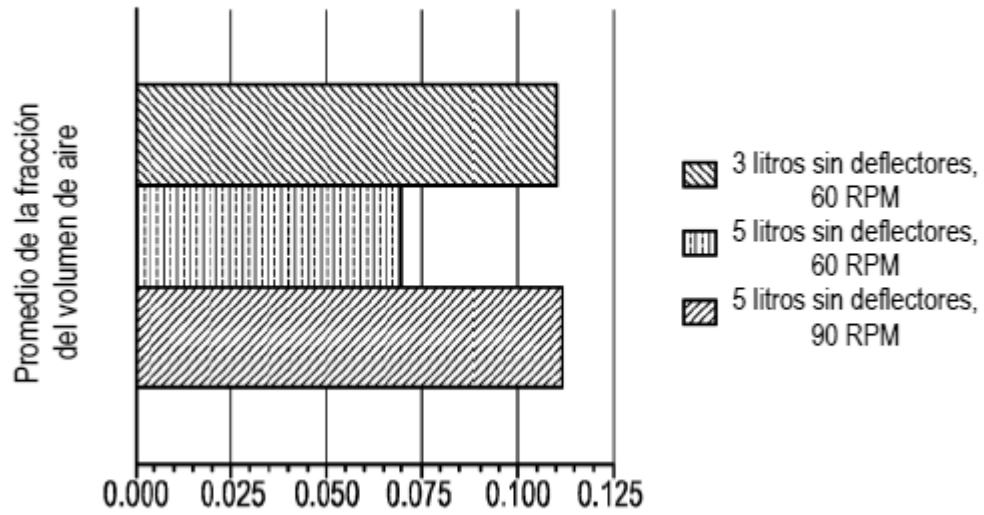
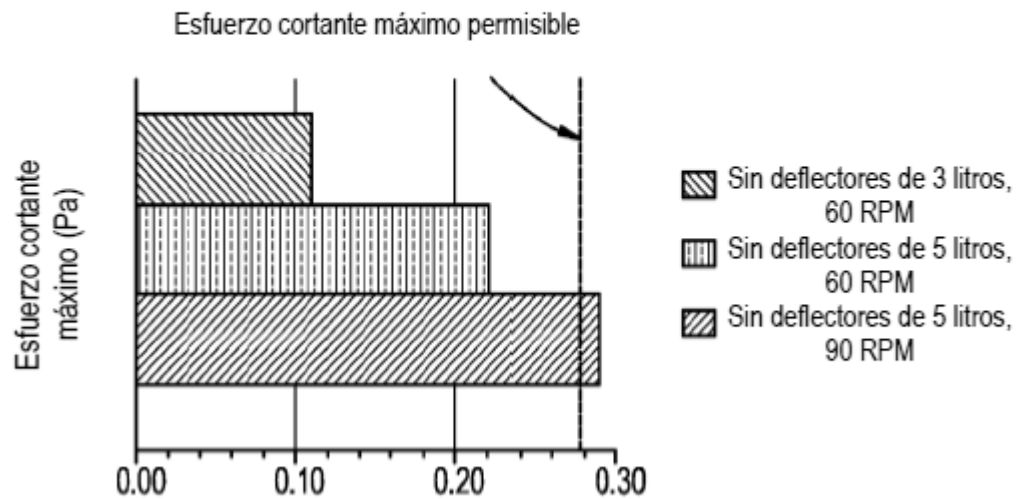
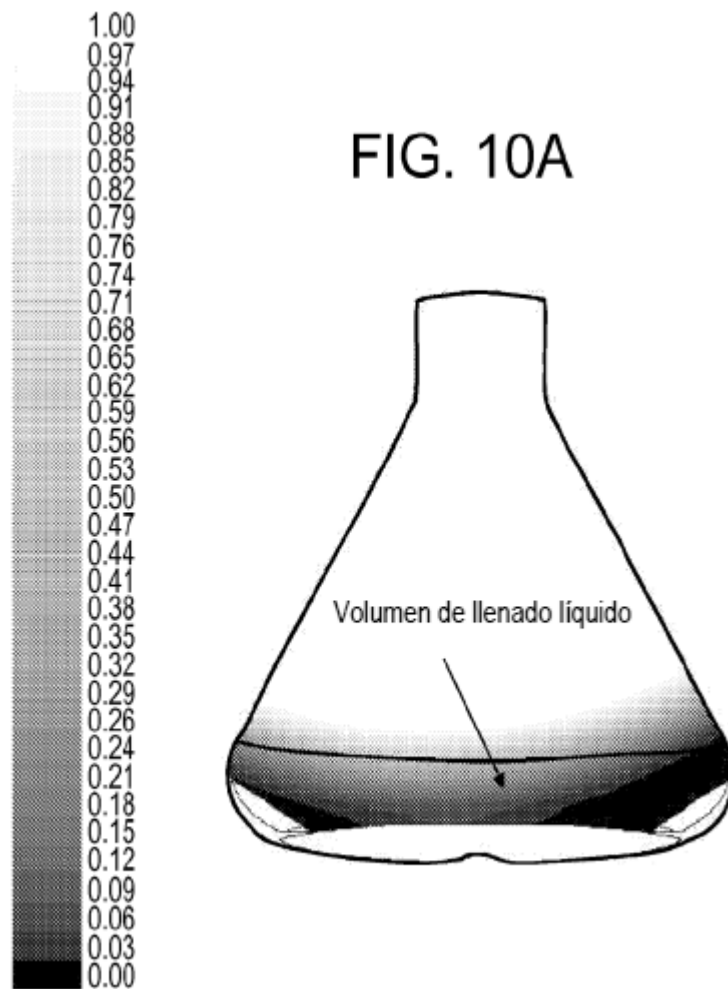
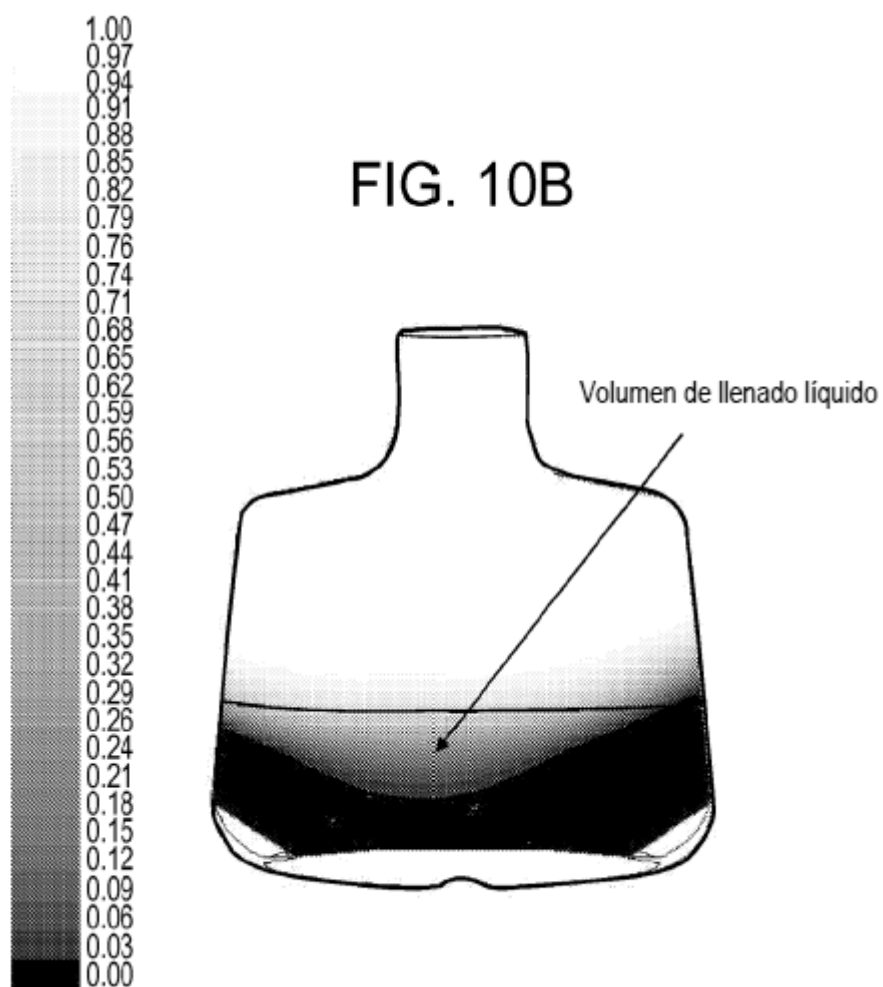


FIG. 9B







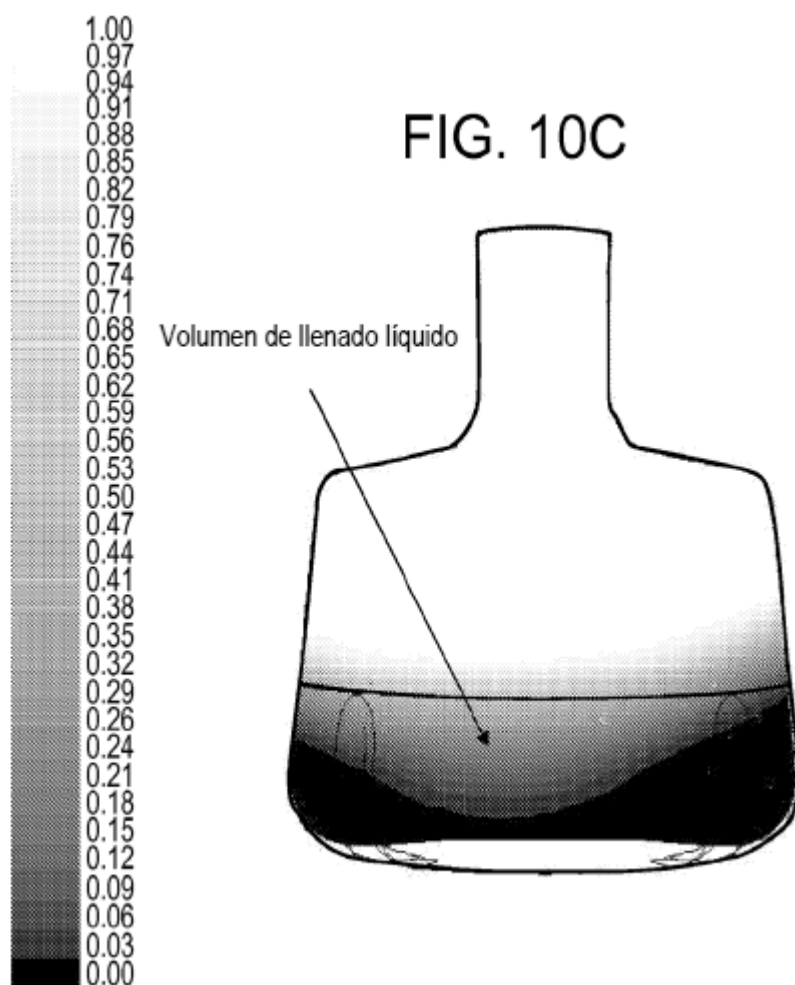


FIG. 11

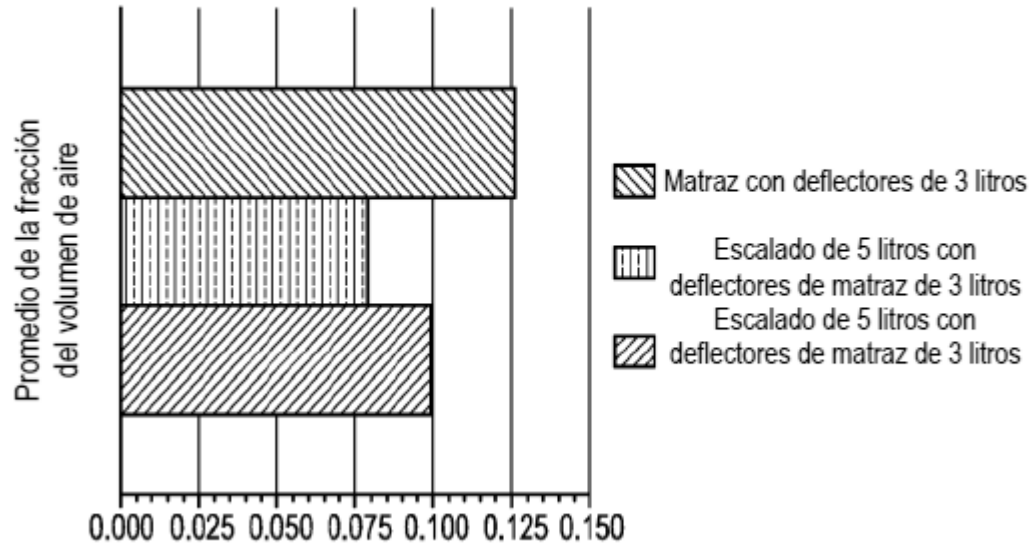
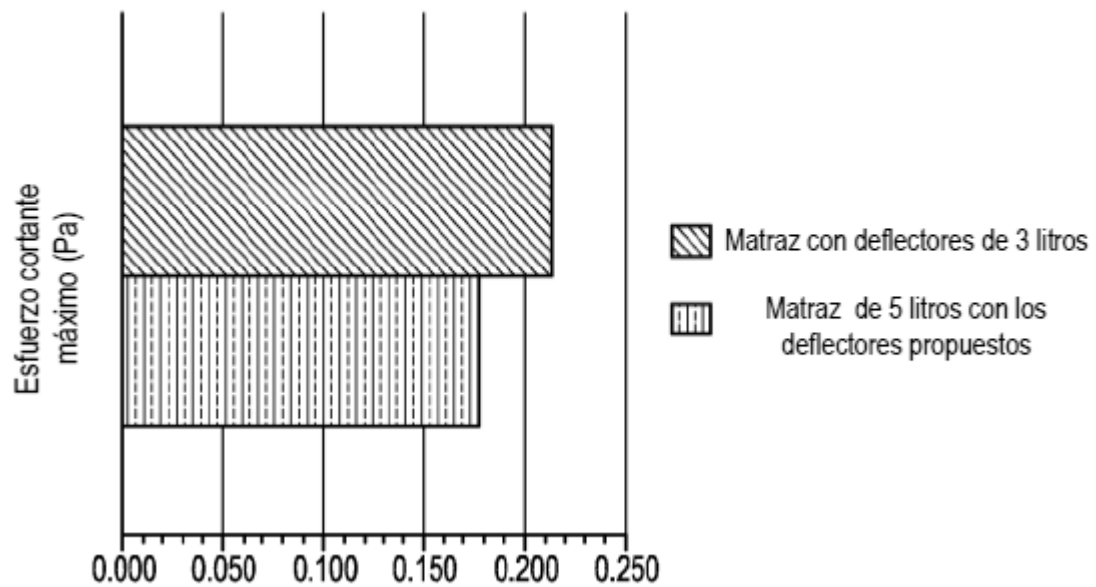
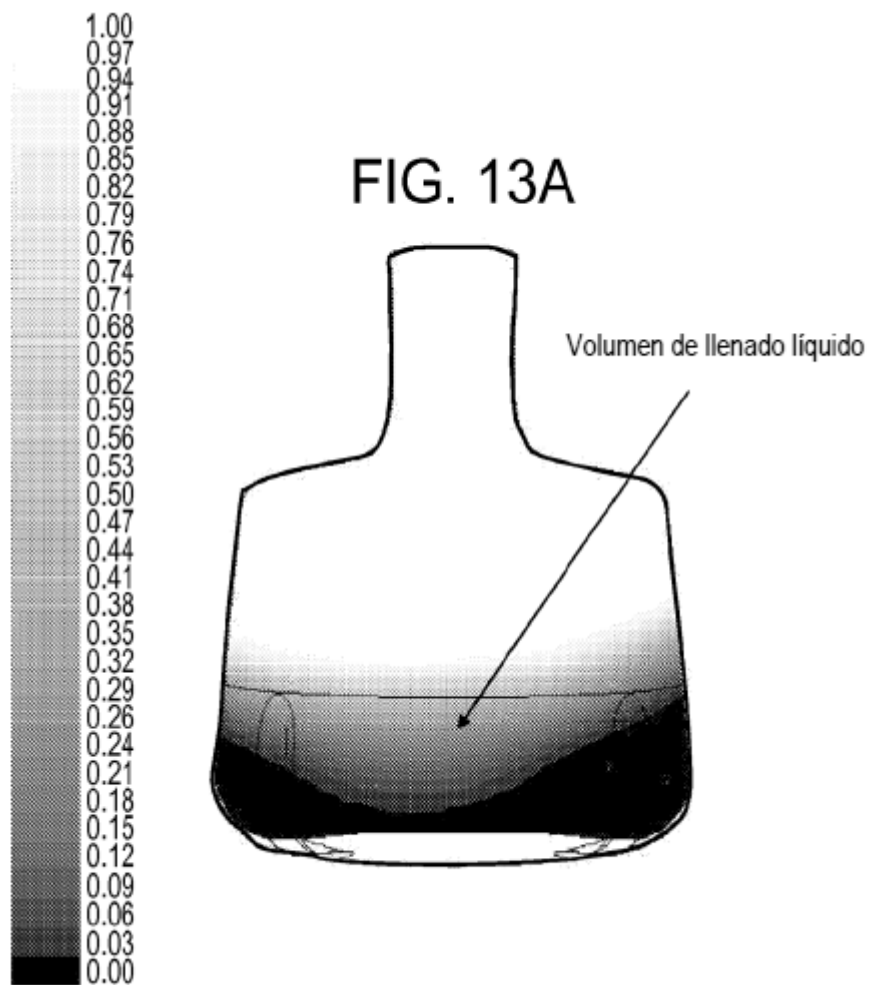


FIG. 12





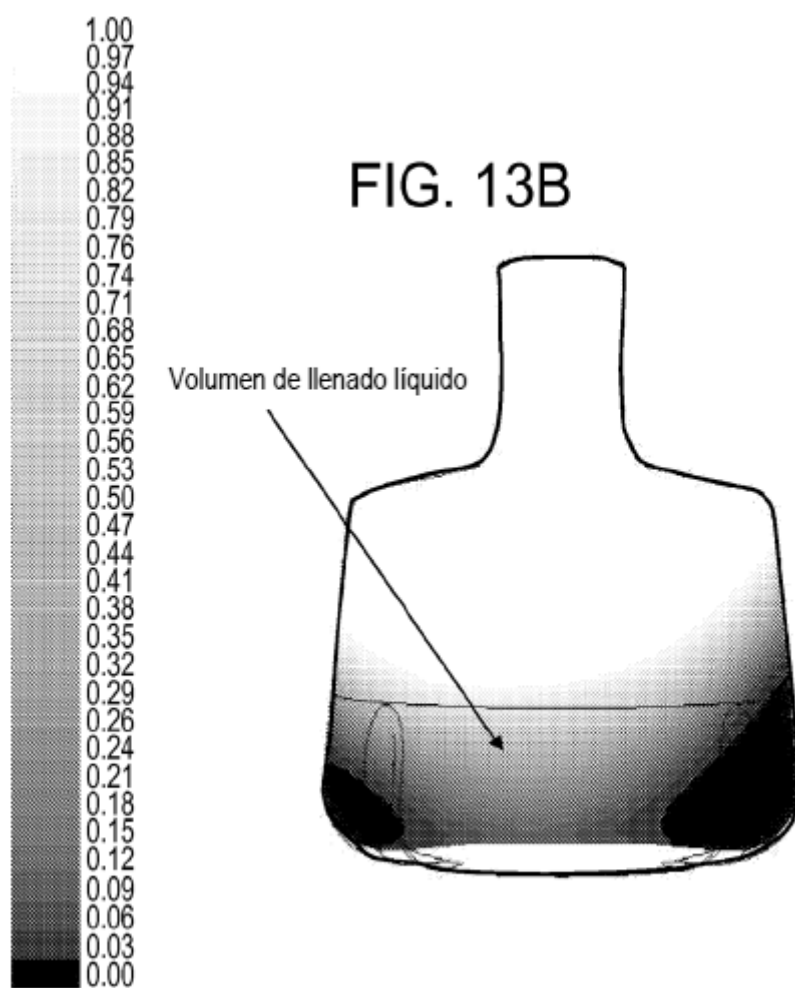


FIG. 14

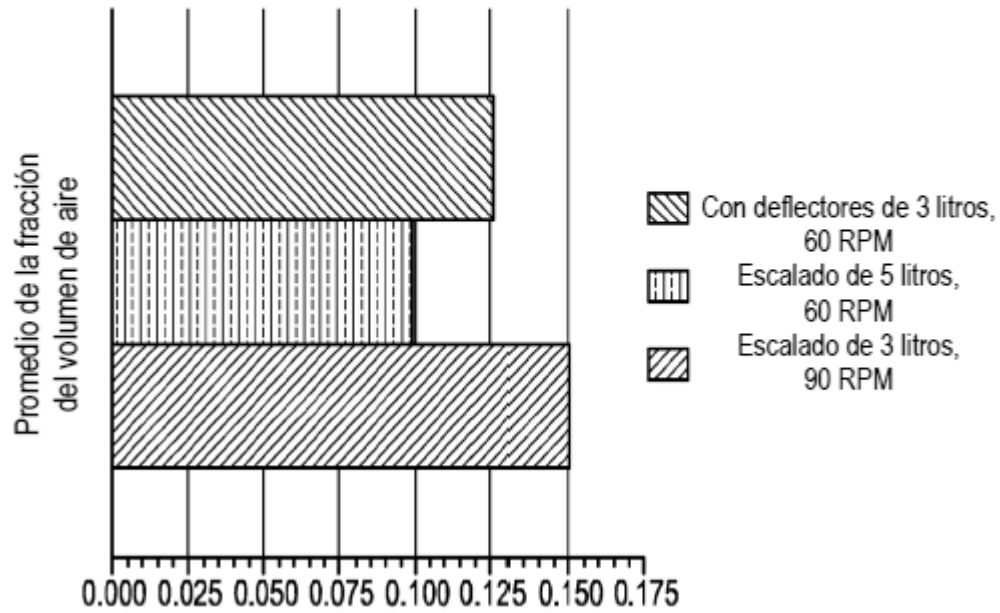


FIG. 15

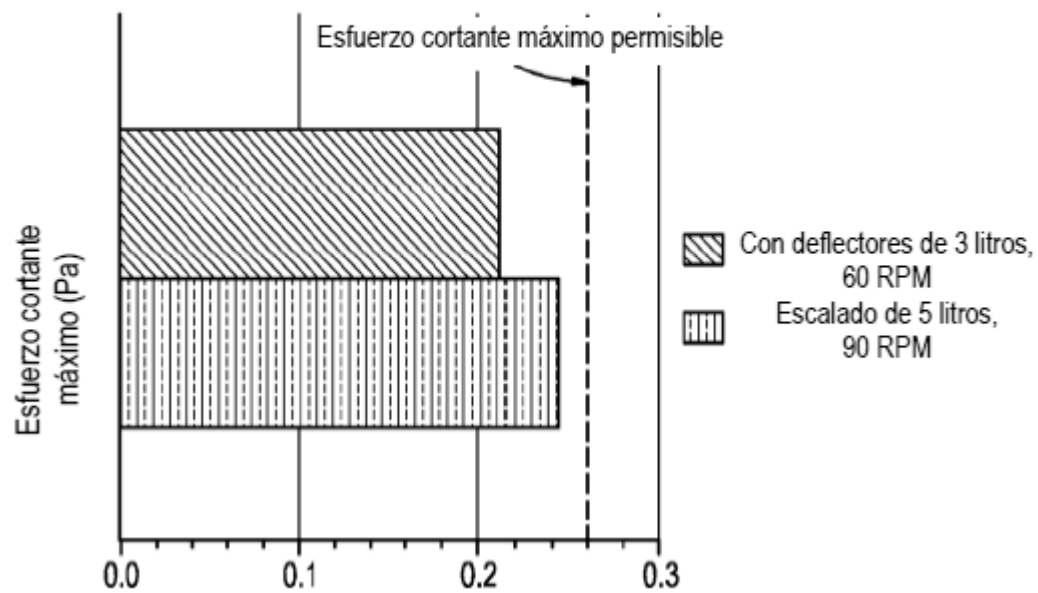


FIG. 16A

Ángulo de contacto con la pared: 30°

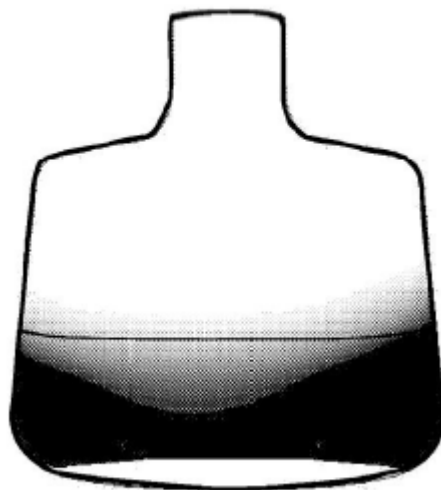


FIG. 16B

Ángulo de contacto con la pared: 90°

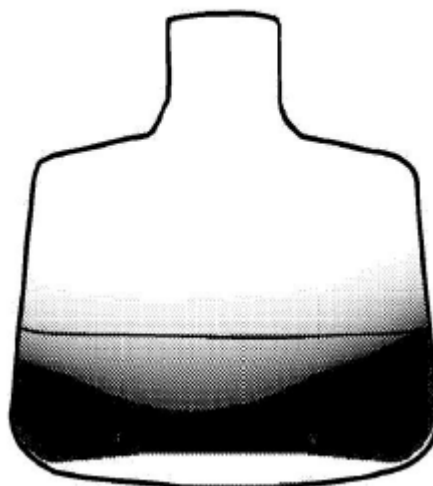


FIG. 17B

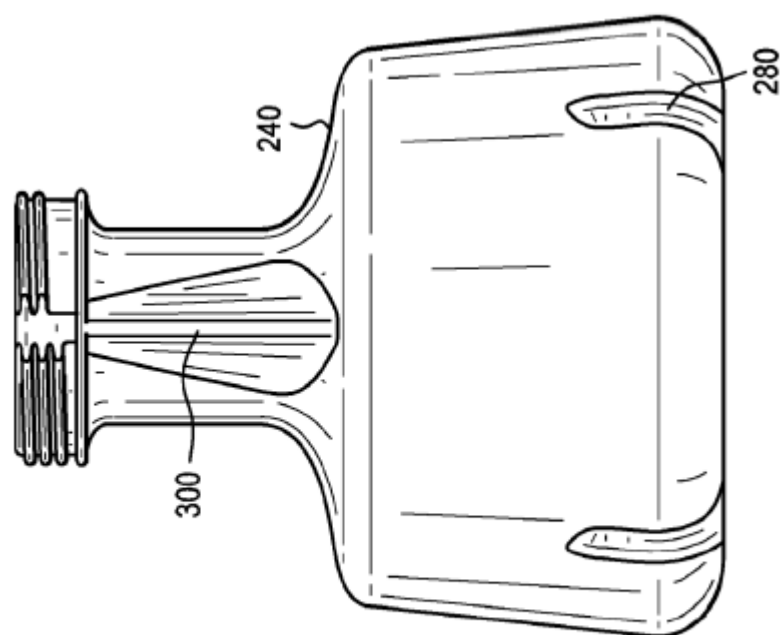


FIG. 17A

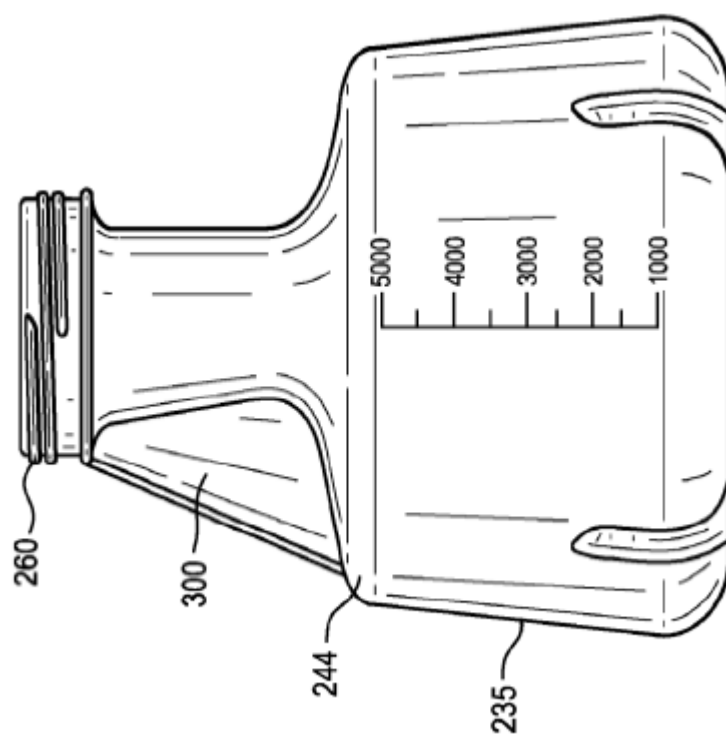


FIG. 18

