

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 046**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2020** **PCT/EP2020/088013**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.07.2021** **WO21136798**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2020** **E 20842243 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 4085126**

54 Título: **Recipiente de cultivo celular de un solo uso con uno o más sensores en línea in situ**

30 Prioridad:

02.01.2020 EP 20150132

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

13.11.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SCHWALD, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 987 046 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 de cultivo celular de un solo uso con uno o más sensores en línea *in situ*

5 La presente invención está en el campo del cultivo de células de mamíferos. Con más detalle, la presente invención se refiere, entre otros, a un recipiente de cultivo celular de pequeño volumen de un solo uso, también denominado biorreactor de pequeño volumen de un solo uso (SUSVB), que comprende uno o más, especialmente dos o más, sensores *in situ*, así como como su uso en cultivos de pequeño volumen de células de mamíferos.

10 Antecedentes

La aceleración del desarrollo de bioprocesos para productos biológicos y vacunas se puede posibilitar por tecnologías automatizadas de alto rendimiento, que pueden aliviar la significativa carga de recursos de la experimentación estadística multifactorial requerida para controlar los atributos de calidad de producto de
15 productos biológicos complejos (Bareither, R., *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 110 (2013) 3126-3138).

Recientemente, Bareither, R., *et al.*, proporcionaron evaluaciones de prueba de concepto de un reactor a pequeña escala desechable automatizado para el desarrollo de procesos corriente arriba de alto rendimiento estableciendo un reactor de 250 ml desechable con depósito agitado a pequeña escala similar a los de laboratorio y escala piloto
20 con respecto al rendimiento del proceso para procesos biológicos industriales para la producción de proteínas terapéuticas y anticuerpos monoclonales usando cultivos de células CHO, *Pichia pastoris* y *E. coli* (Biotechnol. Bioeng. 110 (2013) 3126-3138). Esto incluyó crecimiento, viabilidad celular, valor de producto y calidad de producto similares. Se demostró que la tecnología era sólida en múltiples series y cumplió con los requisitos de capacidad para realizar procesos de alta densidad celular (>400 g/l de peso de células húmedas) con alimentaciones
25 exponenciales y procesos sofisticados desencadenados por acontecimientos.

Los recipientes de cultivo celular de un solo uso son bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, los sistemas ambr® 15 y 250 comercializados por Sartorius Stedim Biotech.

30 El documento US 2019/048305 informó de un biorreactor de perfusión y un procedimiento para usar el mismo para realizar un cultivo celular continuo, en el que el reactor comprende un único puerto de sensor (240) con un único sensor (254) montado en el mismo.

35 El documento US 2019/153381 informó de un biorreactor de perfusión y procedimientos de uso relacionados, en el que el reactor comprende como elemento sensor un sensor RAMAN en el espacio libre superior, es decir, un sensor sin contacto de medio de cultivo.

El documento US 8.026.096 informó de eritropoyetina activa *in vivo* producida en células de insecto usando biorreactores de dos litros o más de volumen de trabajo.

40

Sumario de la invención

Los biorreactores de pequeño volumen de un solo uso (SUSVB) disponibles comercialmente proporcionan, en el mejor de los casos, el control de la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH y solo tienen capacidades para la(s)
45 adición/adiciones de alimentación y el muestreo. Sin embargo, no existe la opción de un segundo sensor de metabolitos *in situ*, es decir, en contacto directo con el medio de cultivo. Por tanto, si, por ejemplo, además del control del pH se requiere una supervisión adicional de la glucosa, inevitablemente se tendrá que realizar un análisis fuera de línea por muestreo. Esto incrementa, entre otras cosas, los esfuerzos de manipulación así como el riesgo de contaminación del cultivo.

50

Se ha descubierto ahora por los autores de la presente invención que usando un biorreactor de pequeño volumen de acuerdo con la presente invención se pueden acortar los plazos para el análisis y para el desarrollo de procesos biológicos. Adicionalmente se pueden reducir los costes. Todo esto se logra sin perder la transferibilidad con y hacia procesos posteriores a gran escala.

55

Un aspecto de la presente invención es un biorreactor de pequeño volumen, como se define en la reivindicación 1, que comprende uno o más sensores *in situ*, en el que al menos un sensor *in situ* es para la determinación de glucosa.

60 En un modo de realización preferente, el biorreactor de pequeño volumen comprende dos o más sensores *in situ*, en el que un sensor *in situ* es para la determinación de glucosa y un sensor *in situ* es para la determinación del valor de pH. En un modo de realización preferente, ambos sensores están sumergidos, es decir, en contacto directo con el medio de cultivo.

65 El sensor de pH es un electrodo de pH. En un modo de realización, el sensor de glucosa es un sensor electroquímico y/o basado en enzimas.

En el modo de realización según la invención, el biorreactor de pequeño volumen comprende dos o más sensores *in situ*, en el que un sensor *in situ* es para la determinación de glucosa y un sensor *in situ* es para la determinación del valor de pH, en el que el sensor de pH es un electrodo de pH y el sensor de glucosa es un sensor electroquímico y/o basado en enzimas. En un modo de realización preferente, ambos sensores están sumergidos, es decir, en contacto directo con el medio de cultivo.

En un modo de realización, el biorreactor de pequeño volumen tiene un volumen de trabajo de 20 ml a 350 ml. En un modo de realización, el volumen de trabajo es de 25 ml a 300 ml. En un modo de realización, el volumen de trabajo es de 50 ml a 280 ml. En un modo de realización, el volumen de trabajo es de 55 ml a 270 ml.

En un modo de realización, el biorreactor de pequeño volumen se hace funcionar a un volumen de desde 60 ml a 260 ml. En un modo de realización, el biorreactor de pequeño volumen se hace funcionar a un volumen de desde 90 ml a 250 ml.

En un modo de realización, el biorreactor de pequeño volumen tiene un volumen total de 500 ml o menos.

En un modo de realización, el biorreactor de pequeño volumen tiene un volumen total de 450 ml o menos.

En un modo de realización, el biorreactor de pequeño volumen tiene un volumen total de 400 ml o menos.

En un modo de realización, el biorreactor de pequeño volumen comprende un recipiente de cultivo (105) y una placa de espacio superior de reactor (104).

En un modo de realización, los al menos dos sensores *in situ* comprenden además un sensor de lactato.

En un modo de realización, el área de puerto de suministro comprende de una a cuatro entradas para líquidos conectadas a tuberías de alimentación individuales (118, 119, 120, 121) y la entrada de gas rociadora (116).

En un modo de realización, dos impulsores (109, 112) están conectados al árbol de agitador.

En un modo de realización, el biorreactor de pequeño volumen comprende la entrada de gas rociadora (116) conectada a una entrada de gas de espacio libre superior (132).

En un modo de realización, el sensor de glucosa determina la concentración de glucosa cada 20 segundos y/o el sensor de glucosa proporciona una señal si hay un cambio en la concentración de glucosa. En un modo de realización, el valor de concentración de glucosa determinado se transmite por cable o de forma inalámbrica al ordenador. En un modo de realización, la transmisión de la concentración de glucosa es por wifi, RFID o Bluetooth. En un modo de realización, el sensor de glucosa tiene un intervalo de trabajo de hasta 8 g/l de glucosa o hasta 3 g/l de glucosa. En un modo de realización, el sensor de glucosa es un sensor electroquímico y/o basado en enzimas. En un modo de realización, el sensor de glucosa es un electrodo serigrafiado recubierto con una enzima inmovilizada. En un modo de realización, el material base del sensor de glucosa es polímero conforme a USP de clase VI.

En un modo de realización, el biorreactor de pequeño volumen es un biorreactor de un solo uso.

En un modo de realización, el recipiente de cultivo (105) y la placa de espacio superior de reactor (104) están hechos de material no metálico. En un modo de realización, el recipiente de cultivo (105) y la placa de espacio superior de reactor (104) son (están hechos) de plástico.

En un modo de realización, la placa de espacio superior de reactor (104) comprende además un puerto de muestreo (102).

En un modo de realización, el biorreactor de pequeño volumen es esterilizable.

En un modo de realización, el biorreactor de pequeño volumen es un biorreactor de pequeño volumen esterilizado por radiación. En un modo de realización, el biorreactor de pequeño volumen es un biorreactor de pequeño volumen esterilizado dos veces por radiación. En un modo de realización, la radiación es radiación beta y/o gamma.

Descripción detallada de la invención

A diferencia de los primeros años de producción bioterapéutica, en los últimos años se ha aceptado ampliamente que para el desarrollo de proteínas terapéuticas, tales como anticuerpos, el parámetro decisivo no es solo el valor de producto sino también atributos específicos de calidad de producto tales como, sin ser limitantes, el perfil de subproductos o el perfil/patrón de glucosilación (véase, por ejemplo, Bareither, R. y Pollard, D., Biotech. Prog. 155

(2011) 217-224).

Por tanto, existe la necesidad de evaluar y diseñar estas propiedades lo antes posible, preferentemente durante la selección de clones y el desarrollo del proceso. Como además no se trata de un proceso sin tiempo, típicamente se requieren rondas consecutivas de experimentación usando múltiples reactores en paralelo. Por tanto, el procedimiento debe ser adecuado para un alto rendimiento.

En vista de las limitaciones ecológicas y económicas, no se pueden usar cultivos a escala para el desarrollo de procesos. Por tanto, se emplea un sistema de reducción de escala adecuado que ha demostrado reflejar de forma fiable el proceso y el rendimiento de proceso a (gran) escala comercial posterior.

La invención como se reivindica en la reivindicación 1 se define por un biorreactor de pequeño volumen que comprende un recipiente de cultivo (105) que

- tiene un volumen de trabajo de desde 20 ml a 350 ml,
- comprende un árbol de agitador (108) con al menos un impulsor (112) fijado al mismo,
- comprende un conducto de alimentación (107) que comprende i) un tubo de rociado conectado a un rociador (127) en su extremo, y ii) al menos una tubería de alimentación (118) con una abertura en su extremo,
- comprende dos o más deflectores (114; 126) que se extienden desde la pared del recipiente de cultivo (105) en dirección al centro del recipiente de cultivo (105) (perpendicular a la pared del recipiente de cultivo), y
- una placa de espacio superior de reactor (104),

en el que la placa de espacio superior de reactor (104) comprende

- un adaptador (122) para conectar el eje de accionamiento de un motor al árbol de agitador (108),
- una entrada de gas rociadora (116) conectada al tubo de rociado en el conducto de alimentación (107), opcionalmente una entrada de gas conectada al espacio libre superior (132),
- una salida de gas conectada al espacio libre superior del recipiente de cultivo (117),
- al menos una entrada para líquidos de una tubería de alimentación (118) que es parte del conducto de alimentación (107),
- un puerto de sensor *in situ* (130) con un electrodo de pH (101) montado en el mismo, y
- un área de puerto de suministro (133) que comprende la entrada de gas rociadora y la entrada de la al menos una tubería de alimentación (118),

en el que tanto el recipiente de cultivo (105) como la placa de espacio superior de reactor (104) están hechos sustancialmente de material no metálico, caracterizado por que el biorreactor de pequeño volumen comprende un sensor de glucosa *in situ*.

Los otros modos de realización se definen en las reivindicaciones dependientes 2-8 y en la reivindicación 9 se define un procedimiento para cultivar una célula de mamífero usando el pequeño biorreactor como se define en la reivindicación 1.

Definiciones generales

El término "anticuerpo" indica una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los diferentes genes de la región constante así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina. Los anticuerpos pueden existir en una variedad de formatos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂ así como monocatenarios (scFv) o diacuerpos o triacuerpos, como formas monovalentes, divalentes, trivalentes, tetravalentes y pentavalentes y hexavalentes, así como anticuerpos monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o tetraespecíficos.

Un "polipéptido" es un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, bien producido de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácido se pueden denominar "péptidos", mientras que las moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos de aminoácido se pueden denominar "proteínas". Un polipéptido también puede comprender componentes distintos de aminoácido, tales como grupos carbohidrato, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes distintos de aminoácido se pueden añadir por la célula, en la que se

produce el polipéptido, y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de su estructura de cadena principal de aminoácido o del ácido nucleico que codifica los mismos. Las adiciones, tales como grupos carbohidrato, en general, no se especifican, pero, no obstante, pueden estar presentes.

5

El término sensores "*in situ*" indica un sensor que tiene contacto físico directo con un medio de cultivo.

Modos de realización del biorreactor de pequeño volumen de acuerdo con la presente invención

10 Los biorreactores de pequeño volumen de un solo uso (SUSVB) disponibles comercialmente proporcionan medios para el control de, como máximo, la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH, de los que solo el valor de pH se controla por un sensor *in situ*. Adicionalmente, estos SUSVB tienen puertos para la adición de nutrientes o fluidos correctores, así como capacidades para muestreo. No obstante, no está disponible un segundo sensor de metabolitos *in situ* debido al diámetro/tamaño y área limitados de la placa de espacio superior (104). Por tanto, si, 15 por ejemplo, además de un electrodo de pH *in situ* se requiere una supervisión de glucosa adicional, esto solo se puede realizar por análisis fuera de línea usando muestreo.

Se ha descubierto ahora por los autores de la presente invención que es posible montando un sensor de glucosa adicional en la misma área que la usada para las tuberías de suministro de líquido y gas, es decir, el área de puerto 20 de suministro (133), se puede proporcionar un SUSVB esterilizable que comprende dos sensores *in situ*.

La provisión de un sensor de glucosa en un SUSVB de acuerdo con la presente invención permite la determinación continua *in situ* de la concentración de glucosa. De este modo se alivia el muestreo requerido previamente, es decir, la toma de muestras para la determinación de glucosa. La presencia de un sensor de glucosa en el SUSVB 25 permite la determinación de la concentración de glucosa en tiempo real, es decir, sin desviación temporal. De este modo se puede supervisar más estrechamente el comportamiento de crecimiento y el estado metabólico del cultivo, es decir, se pueden tomar medidas correctivas antes que con el muestreo.

Es especialmente ventajoso que con el SUSVB de acuerdo con la presente invención se puede realizar la 30 determinación de glucosa sin interferir con el cultivo, lo que se requiere por muestreo.

Por tanto, integrando un sensor de glucosa *in situ* directamente en el SUSVB se pueden evitar una o más de las siguientes desventajas: menor densidad celular; menor rendimiento de producto; cambios ambientales, tales como dióxido de carbono, temperatura, agitación de pH; agresión metabólica; expresión génica cambiada; cambios en el 35 volumen de cultivo; y lo más importante, la contaminación.

En un modo de realización, el sensor de glucosa determina la concentración de glucosa cada 20 segundos y/o el sensor de glucosa proporciona una señal si hay un cambio en la concentración de glucosa. En un modo de 40 realización, el valor de concentración de glucosa determinado se transmite por cable o de forma inalámbrica al ordenador. En un modo de realización, la transmisión de la concentración de glucosa es por wifi, RFID o Bluetooth.

Por la presencia de un sensor de glucosa en el SUSVB, ahora es posible controlar la concentración de glucosa en línea.

45 En un modo de realización, el sensor de glucosa tiene un intervalo de trabajo de hasta 8 g/l de glucosa o hasta 3 g/l de glucosa.

En un modo de realización, el sensor de glucosa es un sensor electroquímico y/o basado en enzimas. En un modo de realización, el sensor de glucosa es un electrodo serigrafiado recubierto con una enzima inmovilizada. En un 50 modo de realización, el material base del sensor de glucosa es polímero conforme a USP de clase VI.

USP de clase VI indica la clase VI de biocompatibilidad de la Farmacopea de EE. UU. (USP) oficial. En la misma se regulan los requisitos para que un material plástico sea biocompatible. La clase VI es la clase con los requisitos más rigurosos comparables a un registro de comercialización de compuesto farmacéutico. Esto también se regula 55 en la norma industrial alemana DIN-ISO-10993.

La detección de glucosa con un sensor electroquímico y/o a base de enzimas se basa en la oxidación de la glucosa por la glucosa-oxidasa. La glucosa-oxidasa es una enzima que cataliza la oxidación independiente de oxígeno del residuo C1 de glucosa. El sensor detecta el peróxido de hidrógeno producido de este modo. 60

En un modo de realización, el sensor de glucosa es esterilizable por irradiación gamma.

En un modo de realización, todo el sensor de glucosa tiene una longitud total de 40-500 mm. En un modo de 65 realización preferente, el sensor de glucosa tiene una longitud total de 75 a 350 mm. En un modo de realización, el electrodo o el área cubierta de enzima del sensor de glucosa tiene una anchura de 5-20 mm.

En un modo de realización preferente, el SUSVB (véanse también las figuras de 1 a 7) tiene uno o más de

- 5 - un volumen de trabajo de desde 20 ml a 350 ml, de desde 25 ml a 300 ml, de desde 50 ml a 280 ml, de desde 55 ml a 270 ml o de desde 95 ml a 255 ml;
 - 10 - un agitador que incluye un árbol de accionamiento de agitador equipado con dos impulsores Rushton (de aproximadamente 20 mm de diámetro, con aproximadamente 30 mm de separación) para cultivo microbiano, o bien dos impulsores de palas en ángulo (*pitched*) para cultivo de células de mamíferos (de aproximadamente 25 mm de diámetro, con aproximadamente 30 mm de separación);
 - 15 - dos o cuatro deflectores equidistantes (de aproximadamente 6,25 mm de anchura) colocados en la pared lateral (vertical) del reactor y que se extienden en dirección al centro del recipiente, es decir, que son perpendiculares a la pared interna del recipiente de cultivo;
 - 20 - un motor (de 150 rpm a 3.000 rpm; tal como, por ejemplo, un servomotor eléctrico sin escobillas) acoplado directamente al árbol de accionamiento de agitador; en un modo de realización preferente, un motor de c.c. eléctrico (por ejemplo, serie RE-max 17, Maxon, Suiza);
 - 25 - una placa de espacio superior de reactor con tuberías con filtros estériles para adiciones subsuperficiales de gas y líquido y una salida adicional para gas de ventilación;
 - 30 - un parche de fluorescencia de sensor de oxígeno disuelto (por ejemplo, de la empresa PreSens) integrado en la base del reactor y controlado por cascada de agitación y/o aireación; en un modo de realización preferente con una sonda dO₂ de respuesta rápida (<2 s); el intervalo de medición es de entre 10 y 15 segundos, en un modo de realización preferente de aproximadamente 12 segundos;
 - 35 - un electrodo de gel para la determinación de pH usando una calibración de tres puntos llevada a cabo antes de la esterilización en autoclave y una calibración de un punto tras la adición de medios;
 - 40 - una camisa de control de temperatura llena de líquido; o un bloque metálico de control de temperatura (en un modo de realización preferente hecho de aluminio); el SUSVB se puede situar en el mismo;
 - 45 - una estación de control que contiene el lector de fluorescencia para el sensor de oxígeno disuelto y la sonda de temperatura, sensores individuales para análisis en el gas de ventilación de oxígeno (por ejemplo, un detector electroquímico) y dióxido de carbono (por ejemplo, un detector de infrarrojos); el SUSVB se puede situar en la misma;
 - 50 - una sección endentada de la base de la pared de recipiente para medir la temperatura;
 - 55 - una placa (abrazadera) de temperatura controlada (6 °C) adaptada al diseño de la placa de espacio superior para el control de humedad de gas de ventilación;
 - 60 - hasta cuatro alimentaciones líquidas (por ejemplo, para reactivos de control de pH (ácido y base), nutriente) con bombas individuales (por ejemplo, bombas de jeringa) que permiten adiciones de bolo único (por ejemplo, con un volumen de desde 10 µl a 10 ml), alimentaciones continuas (por ejemplo, con diferentes perfiles, tales como lineal o exponencial; con caudales de desde 20 nl/h a 20 ml/h); en un modo de realización preferente de aproximadamente 150 µl/h;
 - un tubo de rociado (para el suministro de gas (aire)); el tubo puede tener una configuración de conducto abierto con lo que la salida de gas está directamente debajo del impulsor inferior;
 - una entrada de gas de espacio libre superior para gasificar el espacio libre superior del medio de cultivo;
 - un colector de gas de entrada multiconfigurable (por ejemplo, para mezclar aire, aire puro, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono) que comprende válvulas de pulsación neumáticas para cada flujo de gas (para controlar la composición/mezcla); ciclo de 1 s con un tiempo de pulso mínimo de 20 ms (para controlar la duración y el intervalo de la pulsación de gas); un sensor de flujo másico corriente abajo de las válvulas de pulsación que permite un intervalo de flujo de desde 0,0013 ml/min a 550 ml/min.
- En la siguiente tabla se representan geometrías de diferentes tamaños de reactor (reproducida de Bareither, R., et al., Biotechnol. Bioeng. 110 (2013) 3126-3138; tabla II).

característica de cultivo celular	volumen de cultivo celular de 250 ml	volumen de cultivo celular de 3 l	volumen de cultivo celular de 500 l
volumen de trabajo [L]	0,10-0,25	1,5-2,5	200-500
H/D_t	1,3	1,2	1,21
tipo de impulsor	pala en ángulo	pala en ángulo/marino	marino
número de impulsores	2	2	2
D_1/D_T	0,43	0,38	0,36
C/D_T	0,36	0,23	0,2
similitud geométrica	0,97	1,00	0,9
V_{sg} (ms ⁻¹)	0,0031	0,003	0,004
agitación (rpm)	200-800 (360)	50-400 (200)	50-350 (70)
velocidad periférica (ms ⁻¹)	0,27-1,02 (0,52)	0,12-1,02 (0,69)	0,97-6,78 (1,16)
P_g/V_L (kW/m ³)	0,01-0,445 (0,035)	0,002-0,5 (0,035)	0,14-0,45 (0,036)
kLa (h ⁻¹)	2,5-8,5 (10)	4-15 (12)	(8,74)

característica de cultivo celular	volumen de cultivo celular de 5.000 l	volumen de cultivo celular de 18.000 l
volumen de trabajo [L]	2.000-5.000	8000-18000
H/D_t	1,65	1,66
tipo de impulsor	A320	A320
número de impulsores	3	3
D_1/D_T	0,5	0,49
C/D_T	0,27	0,29
similitud geométrica	0,923	0,942
V_{sg} (ms ⁻¹)	0,0009	0,0013
agitación (rpm)	10-100 (40)	10-70 (31)
velocidad periférica (ms ⁻¹)	0,41-4,13 (1,53)	0,64-4,47 (1,6)
P_g/V_L (kW/m ³)	0,001-0,445 (0,03)	0,01-0,397 (0,034)
kLa (h ⁻¹)	5-9 (9,4)	4,13 (15)

- 5 Un SUSVB adecuado deberá tener al menos proporciones H/D_t y D_T/D_i iguales, separación de impulsores, así como deflectores destinados a usarse para el fermentador a gran escala. La potencia de entrada debe estar en el intervalo de 0,01 kW/m³ a 0,4 kW/m³ y el valor de kLa debe estar en el intervalo de 1 1/h a 15 1/h. El oxígeno disuelto debe ser controlable hasta un 20 % de saturación de aire o más, mientras que el contenido de dióxido de carbono (CO₂) disuelto debe estar en el intervalo de 35 mmHg a 80 mmHg. La temperatura se debe controlar en el intervalo de desde 32 °C a 38 °C y el valor de pH en el intervalo de desde pH 6,8 a pH 7,2. La alimentación debe estar en el intervalo de 20 pg/célula/día a 90 pg/célula/día y se debe proporcionar automatización para el control de alimentación y diferentes estrategias de alimentación (rampa lineal, exponencial, constante, adiciones de bolo). El volumen de trabajo para posibilitar el procesamiento y muestreo paralelos debe estar en el intervalo de 20 ml a 300 ml, preferentemente en el intervalo de 60 ml a 255 ml para el desarrollo y análisis de calidad de producto. El SUSVB debe permitir la adición de nutriente desencadenada por sensores o la alimentación por medio de pH stat o dO stat.

- En general, para el cultivo discontinuo de una línea celular CHO, por ejemplo, una línea celular CHO K1, que expresa un anticuerpo monoclonal, se puede usar cualquier medio, tal como medio CD-CHO comercial o cualquier otro medio sin suero. La inoculación se realiza usando condiciones estándar, tales como, por ejemplo, una densidad de células de inoculación de 2×10^5 células viables/ml. Los SUSVB se pueden inocular con un cultivo de semillas en matraz agitador (por ejemplo, desde una estufa de incubación humidificada, 36,5 °C, CO₂ al 5 %; ampliado cada de 3 a 4 días dentro de la fase de proliferación y por encima de 1×10^6 células viables/ml). El pH se debe controlar a aproximadamente un pH de 6,9 a 7,1 (solución de bicarbonato de sodio 1 molar como base y CO₂ como ácido), la temperatura se debe controlar para que sea de aproximadamente 36,5 °C, el dO₂ se debe controlar para que esté en aproximadamente un 30 % de saturación de aire, la agitación se debe controlar con una potencia de entrada específica y se debe establecer una tasa mínima de rociado de aire para la extracción de CO₂, tal como 0,0125 vvm. Se puede añadir una solución de alimentación de múltiples nutrientes en base a la lectura del sensor o en base a un esquema de alimentación fijo, por ejemplo, los días 4, 6, 8 y 11. La solución de alimentación no debe exceder un volumen predefinido, tal como, por ejemplo, un 5 % del volumen de trabajo. Se debe evitar la limitación de glucosa, por ejemplo, por adición de una solución concentrada de glucosa, por ejemplo, 40 mmol/l. Se puede añadir antiespumante si se requiere. Para el análisis, las muestras se retiran en puntos temporales fijos, por ejemplo, diariamente, para determinar la viabilidad celular, la glucosa, el lactato, la osmolaridad y el pH, mientras que los gases disueltos (dO₂, dCO₂) se determinan fuera de línea, por ejemplo, con un analizador de gasometría.

En general, los SUSVB de acuerdo con la presente invención se pueden usar

- para determinar las condiciones de fermentación;

- 5 - para determinar los parámetros de bioproceso.

En general, en un modo de realización preferente, dichos biorreactores de pequeño volumen de un solo uso (SUSVB) están hechos al menos parcialmente de materiales poliméricos no metálicos ni de vidrio. Como se divulga en el documento US 9.938.493 (incorporado en el presente documento en su totalidad por referencia), los recipientes de cultivo celular conocidos se construyen a partir de múltiples capas, en los que la capa interna, es decir, la capa que entra en contacto con los cultivos celulares, está hecha de un material polimérico. Normalmente al menos esta capa consiste en polietileno (PE) o acetato de etilvinilo (EVA).

Como se usan en el presente documento, los términos "recipiente de cultivo celular de un solo uso" y "biorreactor de pequeño volumen de un solo uso (SUSVB)", que se pueden usar de manera intercambiable, indican un recipiente de cultivo celular con un volumen de trabajo de 300 ml o menos, hecho de un material polimérico de una única capa o de múltiples capas para cultivar células de mamíferos o bacterianas para la producción de materiales biológicos. El recipiente de cultivo celular o biorreactor de pequeño volumen para su uso de acuerdo con la invención puede tener cualquier conformación. El término "de un solo uso" como se usa en el presente documento indica que el recipiente de cultivo celular o biorreactor de pequeño volumen se usa solo una vez para el cultivo de células. Esto no comunica el hecho de que el recipiente de cultivo celular o el biorreactor de pequeño volumen se esterilice más de una vez antes del uso. Por tanto, antes de llenar el recipiente de cultivo celular o el biorreactor de pequeño volumen con medio de cultivo o células, se trata con radiación que destruye microorganismos, tal como radiación beta o gamma. Esto se debe hacer para destruir todos los microorganismos presentes en el interior del dispositivo, que pueden perturbar y afectar la proliferación de las células cultivadas.

En un modo de realización, la aparición de una fase de latencia prolongada en el cultivo de una célula de mamífero en un recipiente de cultivo celular de un solo uso o SUSVB de acuerdo con la invención usando un medio sin suero se evita por el tratamiento del recipiente o SUSVB con gas inerte antes de la aplicación de radiación esterilizante.

En un modo de realización, el recipiente de cultivo celular de un solo uso o SUSVB está hecho al menos parcialmente de material polimérico. En un modo de realización, la radiación esterilizante es irradiación beta o radiación gamma.

Resultados experimentales

En lo que sigue se describen los resultados experimentales obtenidos con un SUSVB ejemplar de acuerdo con la invención. Estos se presentan como simple ejemplificación y no se deben interpretar como limitación. El verdadero alcance de la invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

El SUSVB de acuerdo con la presente invención que comprende un sensor de glucosa *in situ* se ha comparado con un SUSVB estándar sin un sensor de glucosa adicional, es decir, con un único sensor *in situ*. Los experimentos respectivos se resumen en la siguiente tabla.

serie	clon	Condición	sensor de glucosa <i>in situ</i>
RE01	P199	estándar	ninguno
RE02	P199	1 g/l de glucosa	sensor de glucosa baja
RE04	P199	5 g/l de glucosa	sensor de glucosa alta
RE05	P438	estándar	ninguno
RE06	P438	1 g/l de glucosa	sensor de glucosa baja
RE07	P438	3 g/l de glucosa	sensor de glucosa baja
RE08	P438	5 g/l de glucosa	sensor de glucosa alta
RE09	P465	estándar	ninguno
RE10	P465	1 g/l de glucosa	sensor de glucosa baja
RE12	P465	5 g/l de glucosa	sensor de glucosa alta

RE01/RE05/RE09 fueron cada uno un cultivo de 10 días con análisis de glucosa fuera de línea usando un biorreactor de pequeño volumen, es decir, con un solo sensor *in situ* esterilizado una vez con radiación beta. Estos son experimentos comparativos.

RE02/RE04/RE06/RE07/RE08/RE10/RE12 fueron cada uno un cultivo de 16 días usando un SUSVB de acuerdo con la presente invención, es decir, con dos sensores *in situ* esterilizados dos veces con radiación beta y gamma.

En el SUSVB de acuerdo con la invención se usaron dos sensores de glucosa *in situ* diferentes: un sensor de glucosa alta y uno de glucosa baja. La diferencia de ambos tipos de sensores es un tipo diferente de capa de membrana sobre el sensor. Esta diferencia da como resultado tiempos de difusión diferentes de la glucosa a la

enzima en el sensor.

RE02/06/07/10 tenían cada uno un sensor de glucosa baja con un intervalo de medición de 0-3 g/l. RE04/08/12 tenían cada uno un sensor de glucosa alta con un intervalo de medición de 0-8 g/l.

La alimentación 1 (contiene glucosa) se detuvo el día 9 en los recipientes RE02/04/06/07/08/10/12 para reducir el nivel de glucosa al intervalo de medición de los sensores de glucosa para iniciar el control de glucosa por medio del sensor.

En la figura 8 se muestra una curva de glucosa ejemplar obtenida para RE02. La curva verde es la concentración de glucosa como se determina con el sensor *in situ*. Cada etapa pronunciada de la curva verde (martes 30 de abril; lunes 6 de mayo; jueves 9 de mayo) es una etapa de recalibración del sensor. Se puede observar que el sensor de glucosa muestra una deriva baja. No fue necesaria ninguna recalibración durante 10 días. La línea roja es el volumen/cantidad acumulados de solución de glucosa alimentada. Las líneas rosas representan los tiempos de acción/caudales de la bomba de alimentación de solución de glucosa. En los puntos de tiempo rodeados se administró una alimentación en bolo sin glucosa. El día 9 se detuvo la alimentación de la alimentación 1 que también contenía glucosa. Los puntos negros representan los valores de glucosa de control obtenidos por muestreo y análisis fuera de línea Cedex BioHT.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un SUSVB para el cultivo de células animales. En un modo de realización, el SUSVB comprende

- a) un recipiente de cultivo de pequeño volumen de un solo uso de acuerdo con la invención que es adecuado para recibir un medio de cultivo y células animales que se van a cultivar en el mismo,
- b) un sistema agitador,
- c) un sensor de glucosa,
- d) una entrada de gas en el fondo del recipiente de cultivo, y
- e) al menos una entrada para añadir soluciones correctoras y/o de alimentación.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para producir un polipéptido, especialmente un anticuerpo, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido en un SUSVB de acuerdo con la invención,
- b) recuperar el polipéptido del medio de cultivo o las células, y
- c) opcionalmente purificar el polipéptido y producir de este modo el polipéptido.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para cultivar células animales o bacterianas, caracterizado por que las células animales o bacterianas se cultivan en un SUSVB como se informa en el presente documento, opcionalmente de este modo se produce un producto.

Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso del SUSVB para la producción de polipéptidos o anticuerpos o virus.

En un modo de realización, la proporción del diámetro del impulsor d con respecto al diámetro del SUSVB D cuando el sistema agitador se coloca en el recipiente de cultivo está en el intervalo entre 0,2 y 0,8, en otro modo de realización en el intervalo entre 0,3 y 0,6, en otro modo de realización está en el intervalo entre 0,31 y 0,39, o también en un modo de realización aproximadamente 0,34. En otro modo de realización, el paso de las palas agitadoras del impulsor de transporte axial está entre 10° y 80°, en otro modo de realización entre 24° y 60°, o en otro modo de realización entre 40° y 50° con respecto al eje de árbol. En un modo de realización, todos los impulsores tienen una proporción del diámetro del elemento de transporte d con respecto al diámetro del recipiente de cultivo D de desde 0,32 a 0,35.

En un modo de realización, la purificación es un procedimiento cromatográfico de múltiples fases. En otro modo de realización, la purificación comprende una cromatografía de afinidad, una cromatografía de intercambio catiónico y una cromatografía de intercambio aniónico.

En un modo de realización, el cultivo es un cultivo semicontinuo.

En un modo de realización, el polipéptido es un anticuerpo o un derivado de anticuerpo.

- En un modo de realización, el medio de cultivo es un medio acuoso que es adecuado para el cultivo de células procariotas y eucariotas. En otro modo de realización, el medio de cultivo es un líquido newtoniano. En un modo de realización, el sistema agitador funciona con una potencia de entrada de desde 0,01 W/kg a 1 W/kg. En otro modo de realización, el sistema agitador funciona con una potencia de entrada de desde 0,04 W/kg a 0,5 W/kg. Todavía en otro modo de realización, el flujo inducido por el sistema agitador en el medio de cultivo es un flujo turbulento. En otro modo de realización, el medio de cultivo tiene una viscosidad de 3 mPa*s o menos. En otro modo de realización, la viscosidad es de 2 mPa*s o menos.
- En un modo de realización, el SUSVB es un reactor de depósito agitado gasificado sumergido.
- En otro modo de realización, la célula animal es una célula de mamífero. Aún en otro modo de realización, la célula es una célula CHO, una célula BHK, una célula NS0, una célula COS, una célula PER.C6, una célula Sp2/0, una célula HEK 293 o una célula de hibridoma.
- Para lograr un alto valor de producto y una buena calidad de producto, el modo de funcionamiento del SUSVB de acuerdo con la invención tiene un papel importante además de, por ejemplo, el desarrollo de líneas celulares, la composición de medios y el dimensionamiento del SUSVB.
- Se puede distinguir entre los modos de funcionamiento de lote procesos por lote, procesos discontinuos o de alimentación, procesos continuos con o sin retención celular (por ejemplo, perfusión o quimiostato), así como procesos semicontinuos tales como, por ejemplo, diálisis interna o externa.
- El SUSVB tiene una parte superior, una parte media y una parte inferior, en el que el eje longitudinal del SUSVB se extiende desde el medio o centro de la parte superior hasta el medio o centro de la parte inferior.
- El SUSVB tiene una sección transversal sustancialmente circular cuando se ve perpendicular al eje longitudinal. El diámetro puede ser el mismo en la sección superior y la inferior o la sección inferior puede tener un diámetro más pequeño que la sección superior.
- La parte superior del SUSVB puede comprender además un medio de salida de descarga de gas y/o uno o más medios de entrada.
- La parte inferior del SUSVB puede comprender además uno o más medios de entrada de medios líquidos y/o medios de entrada de gas.
- Al menos la parte inferior o la media del SUSVB puede comprender además una camisa de intercambio de calor montada en la pared exterior del recipiente de cultivo.
- Los elementos de transporte del sistema agitador se hacen rotar por un árbol, que está acoplado a un mecanismo adecuado para inducir la rotación del mismo. El árbol se extiende a lo largo del eje longitudinal del SUSVB y, por tanto, el árbol tiene un eje de rotación orientado verticalmente. El árbol no se extiende hasta el fondo del SUSVB sino hasta un punto muy por encima del fondo del SUSVB y también muy por encima de un rociador de gas opcional en el fondo del SUSVB. El árbol se acopla de forma funcional a un árbol de accionamiento por un mecanismo de acoplamiento adecuado. Además de un medio para acoplar el árbol al árbol de accionamiento, el árbol puede además comprender otros medios para acoplar individualmente los impulsores al árbol. Los impulsores del sistema agitador normalmente se acoplan al árbol en una posición que está/estará por debajo de la superficie del medio de cultivo en el SUSVB una vez que el sistema agitador se sumerja en el medio de cultivo. La superficie se determina cuando el medio de cultivo está estático, es decir, no circula.
- El SUSVB de acuerdo con la invención es un SUSVB con deflectores. En otro modo de realización, el SUSVB de acuerdo con la invención comprende dos o cuatro deflectores. Un "deflector" indica una placa colocada en el interior de un recipiente de cultivo en la misma dirección que el eje de árbol y que se extiende radialmente en el recipiente de cultivo hacia el agitador. El deflector tiene, en general, una conformación rectangular. En un modo de realización, que no está de acuerdo con la invención, el deflector se coloca a una distancia b_d con respecto a la pared interna del SUSVB. En otro modo de realización, los deflectores están separados equidistantes entre sí alrededor de la circunferencia del interior del SUSVB.
- Los componentes del SUSVB se dimensionan de manera que puedan ejercer su función prevista, es decir, el SUSVB puede aceptar el medio de cultivo y el sistema agitador puede mezclar el medio y dispersar el compuesto añadido. Por tanto, el sistema agitador tiene un diámetro que permite una rotación sin obstáculos dentro del SUSVB. Con el SUSVB como se informa en el presente documento se puede llevar a cabo un cultivo de alta densidad celular como, por ejemplo, cultivo por perfusión.
- En un modo de realización, el cultivo se lleva a cabo a una velocidad de rotación del sistema agitador a la que se puede lograr una potencia de entrada constante independiente del número de Reynolds al medio de cultivo, es

decir, durante el cultivo se proporciona un flujo turbulento de medio de cultivo en el recipiente de cultivo. Con un SUSVB de acuerdo con la invención es posible cultivar células de mamífero sensibles al cizallamiento con una velocidad de rotación baja del sistema agitador.

La forma del recipiente de cultivo del SUSVB no está limitada. En un modo de realización, el recipiente de cultivo es un recipiente cilíndrico. En otro modo de realización, el recipiente de cultivo es un recipiente de tipo reactor de depósito agitado. El recipiente de cultivo puede tener cualquier dimensión. En un modo de realización, el recipiente de cultivo tiene un volumen de trabajo de desde 20 ml a 350 ml, en un modo de realización preferente de 55 ml a 265 ml.

En general, en el cultivo celular se usan recipientes de cultivo gasificados sumergidos. En estos casos se usa principalmente un sistema agitador de transporte axial de una fase, dos fases o tres fases. En el caso de que se use un sistema agitador de transporte axial de una fase o dos fases, se genera un perfil de flujo que es esencialmente paralelo al árbol rotatorio del agitador empleado.

En un modo de realización, el agitador comprende de 1 a 5 elementos de transporte axial, o en otro modo de realización de 1 a 3 elementos de transporte axial, o también en un modo de realización 1 o 2 elementos de transporte axial o incluso solo un único elemento de transporte axial. En un modo de realización, un elemento de transporte axial se sitúa en los cuatro quintos superiores del árbol de agitador, determinados desde el cabezal del agitador, y está a una distancia máxima de $h_{4/5}$ con respecto al cabezal del agitador. También en un modo de realización, un elemento de transporte axial se localiza a una distancia máxima de 0,8 h y/o un elemento de transporte axial se localiza a una distancia máxima de 0,2 h. En otro modo de realización, los elementos de transporte axial forman conjuntamente un único elemento. En un modo de realización, el diámetro de todos los elementos de transporte axial es idéntico. En otro modo de realización, los elementos de transporte axial se seleccionan independientemente entre sí de un agitador de hélice, un agitador de palas en ángulo o un agitador de palas inclinadas.

En otro modo de realización, todos los elementos de transporte rotan con el mismo número de rotaciones por unidad de tiempo alrededor del eje de árbol del agitador cuando el agitador funciona en un SUSVB. En un modo de realización, los elementos de transporte están unidos permanentemente entre sí y el agitador consiste en una sola pieza, es decir, todos los elementos se accionan por el mismo árbol rotatorio y tienen el mismo número de rotaciones por unidad de tiempo alrededor del eje de árbol del agitador.

La proporción d/D del diámetro de agitador (d) con respecto al diámetro de recipiente de cultivo (D) es en un modo de realización de desde 0,2 a 0,8, en otro modo de realización de desde 0,3 a 0,6 y en otro modo de realización de desde 0,33 a 0,5. En otro modo de realización, la proporción h/d de altura de pala (h) con respecto al diámetro de agitador (d) es de desde 0,5 a 5, en otro modo de realización de desde 1 a 4, y en otro modo de realización de desde 1 a 3. Aún en otro modo de realización, la proporción b/d de la anchura de pala de impulsor (b) con respecto al diámetro de agitador (d) es de desde 0,05 a 0,3, en otro modo de realización de desde 0,1 a 0,25.

El término "de desde... a" indica un intervalo que incluye los valores delimitadores enumerados.

En un modo de realización, el diámetro de agitador (d) se selecciona de 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 10 mm, 12 mm, 14 mm, 16 mm, 18 mm y 20 mm.

En un modo de realización, la anchura de pala de impulsor (b) se selecciona de 0,42 mm, 0,60 mm, 0,89 mm, 1,08 mm, 1,33 mm.

En un modo de realización, el elemento de transporte radial es un impulsor de ancla.

El término "aproximadamente" indica que el valor dado es el punto central de un intervalo que abarca más/menos un 10 % alrededor del valor. Si este valor es un valor porcentual, "aproximadamente" también indica más/menos un 10 %, pero no puede exceder el valor de un 100 %.

En un modo de realización, el elemento de transporte axial es un impulsor de palas inclinadas.

La proporción h_{SB}/b de la altura del elemento de transporte axial y/o la anchura de las palas del elemento de transporte radial es de desde 0,5 a 4, en otro modo de realización de desde 0,8 a 3, y en otro modo de realización de desde 1 a 2. En otro modo de realización, el paso de las palas agitadoras del impulsor de palas inclinadas es de desde 10° a 80° , en otro modo de realización de desde 24° a 60° , y también en un modo de realización de desde 40° a 50° con respecto al eje de árbol del agitador.

En un modo de realización, el elemento de transporte radial tiene de desde 1 a 8 palas, en otro modo de realización de desde 1 a 4 palas y en otro modo de realización 4 palas. El elemento de transporte axial tiene en un modo de realización de desde 1 a 10 palas, en otro modo de realización de desde 2 a 6 palas y en otro modo de realización 4 palas. En otro modo de realización, los elementos de transporte radial y transporte axial tienen el mismo número

de palas.

En un modo de realización, el agitador tiene una altura de desde 20 mm a 500 mm.

- 5 En un modo de realización, el agitador y el SUSVB forman una unidad funcional, es decir, el agitador está dentro del recipiente de cultivo del SUSVB y puede rotar dentro del recipiente de cultivo sin ninguna limitación espacial.

El SUSVB de acuerdo con la invención es un SUSVB de tipo reactor de depósito agitado.

- 10 El recipiente de cultivo es un recipiente de tipo reactor agitado gasificado sumergido o aireado.

El recipiente de cultivo comprende 2 (114, 126) o 4 deflectores (114, 126, 125, 128). En otro modo de realización, los deflectores están separados equidistantes entre sí alrededor de la circunferencia de la superficie interior del recipiente de cultivo. La proporción d/D del diámetro de agitador (d) con respecto al diámetro de recipiente de cultivo (D) es en un modo de realización de desde 0,2 a 0,8, en otro modo de realización de desde 0,3 a 0,6 y en otro modo de realización de desde 0,33 a 0,5. En otro modo de realización, la proporción H/D de la altura de llenado del recipiente de cultivo (H) con respecto al diámetro de recipiente de cultivo (D) es de desde 1,0 a 2,5, en otro modo de realización de desde 1,1 a 2,0, y en otro modo de realización de desde 1,4 a 1,8. En un modo de realización, el recipiente de cultivo tiene un volumen de trabajo de desde 20 ml a 350 ml.

20 En un modo de realización, la proporción de la diferencia de altura (Δh) de dos elementos de transporte axial con respecto al diámetro de recipiente de cultivo (D) es de al menos 0,75.

25 Se proporcionan los siguientes ejemplos, secuencias y figuras para contribuir al entendimiento de la presente invención, exponiéndose su verdadero alcance en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

Abreviaturas:

- 30 Las abreviaturas usadas en esta solicitud tienen los siguientes significados (véase también la figura 12):

b: anchura de las palas del elemento de transporte radial

d: diámetro externo total de agitador

35 d_w : diámetro del árbol

h: altura de las palas agitadoras del elemento de transporte radial

40 h_m : altura del manguito de sujeción

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

h_u : altura del reductor

45 Δh : diferencia de altura de dos elementos de transporte axial

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

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

z: número de palas agitadoras por agitador

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

55 $h_{4/5}$: 4/5 de altura desde encima de h

K: cabezal de agitador, es decir, el punto más alto del agitador cuando no está unido a un árbol rotatorio

60 D: diámetro interno de recipiente de cultivo

H: altura de llenado del recipiente de cultivo.

Descripción de las figuras

65 **Figura 1:** vista lateral de un biorreactor de pequeño volumen de un solo uso (SUSVB) ejemplar de acuerdo con la

presente invención que contiene un sensor de glucosa (111).

Figura 2: vista lateral de un SUSVB ejemplar de acuerdo con la invención con anotaciones de dimensiones y volumen.

Figura 3: vista superior de un SUSVB ejemplar de acuerdo con la invención que muestra el sensor de glucosa (111) instalado en el área del puerto de suministro (133).

Figura 4: vista aérea de un SUSVB ejemplar de acuerdo con la presente invención que contiene un sensor de glucosa (111).

Figura 5: vista ampliada de la parte del SUSVB de acuerdo con la invención que comprende el sensor de glucosa (111).

Figura 6: vista lateral de la parte inferior de un SUSVB ejemplar de acuerdo con la invención que comprende un sensor de glucosa (111) incluido en el medio de cultivo (129).

Figura 7: vista esquemática de un sensor de glucosa (111) ejemplar.

Figura 8: curva temporal de la concentración de glucosa determinada en línea (línea verde), concentraciones de glucosa determinadas fuera de línea (círculos sólidos de negro); volumen de solución de glucosa añadido (línea roja) y acción de la bomba de glucosa (línea morada) del cultivo RE02.

Figura 9: curva temporal de la concentración de glucosa determinada en línea (línea verde), concentraciones de glucosa determinadas fuera de línea (círculos sólidos de negro); volumen de solución de glucosa añadido (línea roja) y acción de la bomba de glucosa (línea morada) del cultivo RE06.

Figura 10: curva temporal de la concentración de glucosa determinada en línea (línea verde), concentraciones de glucosa determinadas fuera de línea (círculos sólidos de negro); volumen de solución de glucosa añadido (línea roja) y acción de la bomba de glucosa (línea morada) del cultivo RE10.

Figura 11: curva temporal de la concentración de anticuerpo de las fermentaciones RE01-RE02 y RE04-RE12.

Figura 12: diagrama esquemático de diversos modos de realización del agitador combinado de acuerdo con la invención; b: anchura de la pala agitadora; d: diámetro de agitador; d_w : diámetro del árbol rotatorio; h: altura de la pala agitadora del agitador de transporte radial; h_m : altura del manguito de sujeción; h_{SB} : altura del agitador de transporte axial; h_u : altura del reductor; l: longitud de la pala agitadora del agitador de transporte axial; α : paso de pala del agitador de transporte axial; z: número de palas agitadoras por agitador; d_i : distancia interna entre las palas agitadoras del agitador transporte radial; $h_{4/5}$: 4/5 de altura desde encima de h; K: cabezal de agitador.

Ejemplo 1

Condiciones de cultivo para RE01-RE12

Los cultivos se realizaron con una densidad celular inicial de aproximadamente $1,5 \cdot 10^7$ células/ml en un volumen total de 170 ml. El medio de cultivo era un medio químicamente definido sin suero. La temperatura de cultivo se estableció en 35 °C, la tasa de gasificación se estableció en 5-5,5 ml/min, la tasa de agitación se estableció en 450-500 rpm y el pH se estableció en pH 7. El control del pH se realizó añadiendo una solución de carbonato de sodio 1 M o CO₂ además de la tasa de gasificación. Se añadió antiespumante al inicio y durante el cultivo cuando fue necesario. La alimentación 1 que contenía glucosa se añadió continuamente con una tasa predefinida hasta que se detuvo. La alimentación 2 que no contenía glucosa se añadió como alimentación en bolo los días 1, 3 y 6.

En cultivos con un sensor de glucosa *in situ* de acuerdo con la invención, la alimentación de glucosa dependiente del sensor se inició (alimentación 3) después del final de la alimentación 1 una vez que la concentración de glucosa *in situ* determinada descendió por debajo de un valor de umbral. El valor de umbral se redujo durante el proceso.

Las figuras de 8 a 10 muestran curvas de cultivo ejemplar y la figura 12 representa el perfil de concentración de producto.

REIVINDICACIONES

1. Un biorreactor de pequeño volumen que comprende
5 un recipiente de cultivo (105) que
 - tiene un volumen de trabajo de desde 20 ml a 350 ml,
 - comprende un árbol de agitador (108) con al menos un impulsor (112) fijado al mismo,
 - 10 - comprende un conducto de alimentación (107) que comprende i) un tubo de rociado conectado a un rociador (127) en su extremo, y ii) al menos una tubería de alimentación (118) con una abertura en su extremo,
 - comprende dos o más deflectores (114; 126) que se extienden desde la pared del recipiente de cultivo (105) perpendiculares en dirección al centro del recipiente de cultivo (105), y
 - 15 - una placa de espacio superior de reactor (104),en el que la placa de espacio superior de reactor (104) comprende
 - un adaptador (122) para conectar el eje de accionamiento de un motor al árbol de agitador (108),
 - una entrada de gas rociadora (116) conectada al tubo de rociado en el conducto de alimentación (107), opcionalmente una entrada de gas conectada al espacio libre superior (132),
 - 25 - una salida de gas conectada al espacio libre superior del recipiente de cultivo (117),
 - al menos una entrada para líquidos de una tubería de alimentación (118) que es parte del conducto de alimentación (107),
 - 30 - un puerto de sensor *in situ* (130) con un electrodo de pH (101) montado en el mismo, y
 - un área de puerto de suministro (133) que comprende la entrada de gas rociadora y la entrada de la al menos una tubería de alimentación (118),
 - 35 en el que tanto el recipiente de cultivo (105) como la placa de espacio superior de reactor (104) están hechos sustancialmente de material no metálico,
 - con lo que el biorreactor de pequeño volumen comprende un sensor de glucosa *in situ*.
 - 40
2. El biorreactor de pequeño volumen de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el biorreactor de pequeño volumen es un biorreactor de pequeño volumen de un solo uso.
3. El biorreactor de pequeño volumen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el sensor de glucosa es un electrodo serigrafiado recubierto con una enzima inmovilizada.
4. El biorreactor de pequeño volumen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el material de base de sensor de glucosa es polímero conforme a USP de clase VI.
5. El biorreactor de pequeño volumen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sensor de glucosa determina la concentración de glucosa cada 20 segundos y/o determina el cambio de la concentración de glucosa.
6. El biorreactor de pequeño volumen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el valor de concentración de glucosa determinado se transmite de forma inalámbrica o por cable desde el sensor de glucosa a un ordenador.
7. El biorreactor de pequeño volumen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la placa de espacio superior de reactor (104) comprende además un puerto de muestreo (102).
8. El biorreactor de pequeño volumen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el sensor de glucosa *in situ* pasa por la placa de espacio superior (104) dentro o en el área de puerto de suministro (133).
9. Un procedimiento para cultivar una célula de mamífero usando un biorreactor de pequeño volumen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

Figura 1

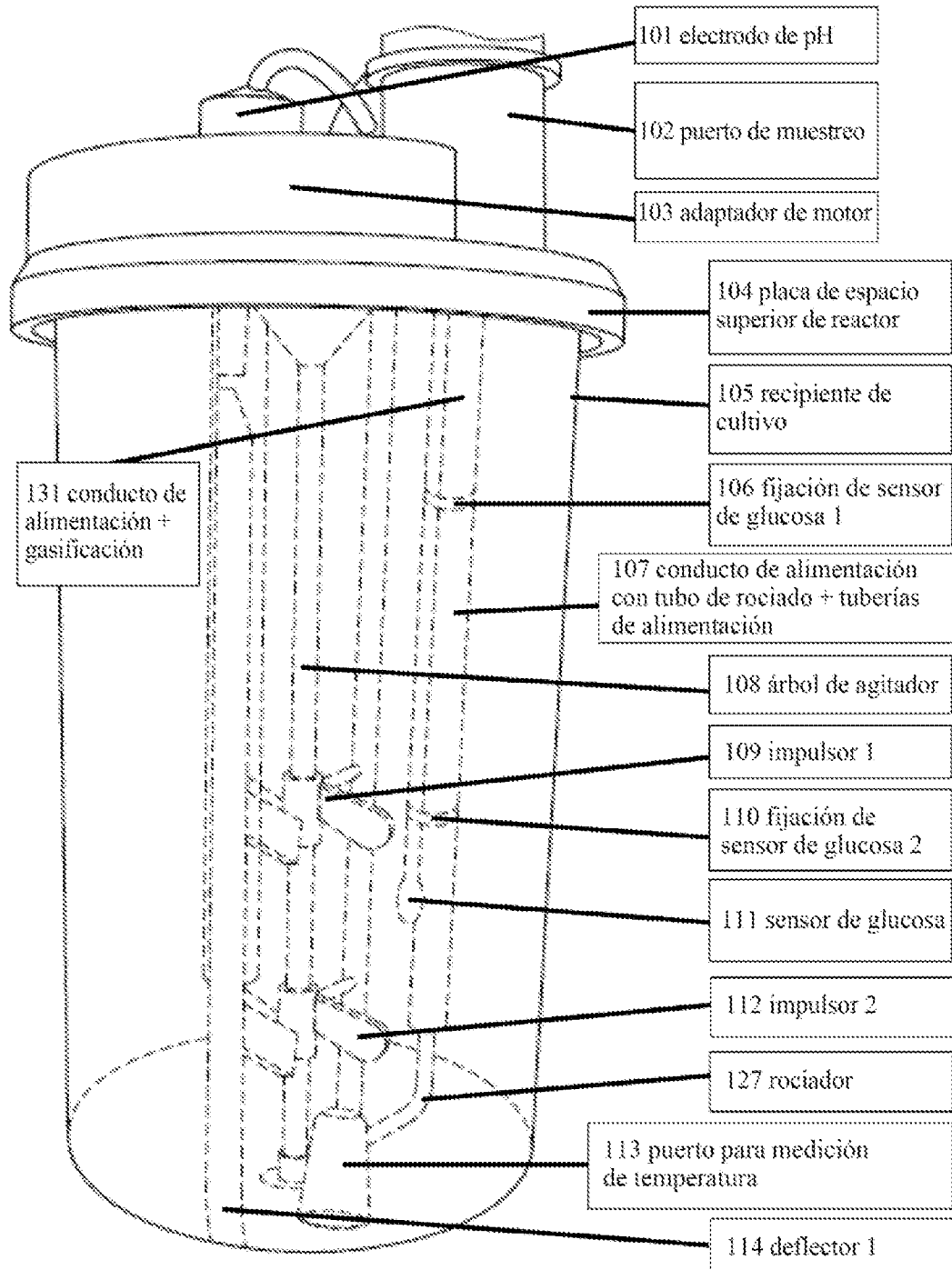


Figura 2

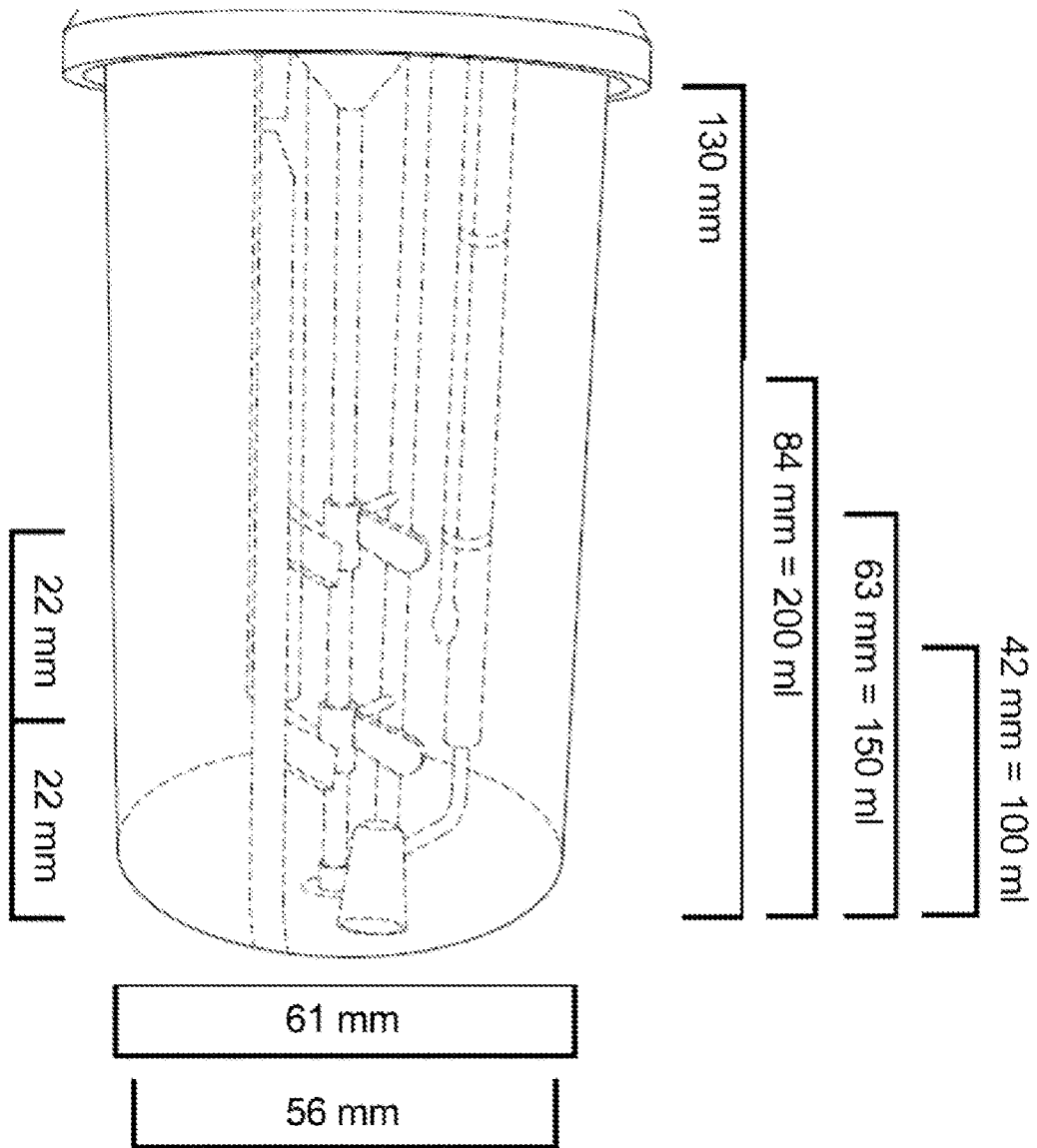


Figura 3

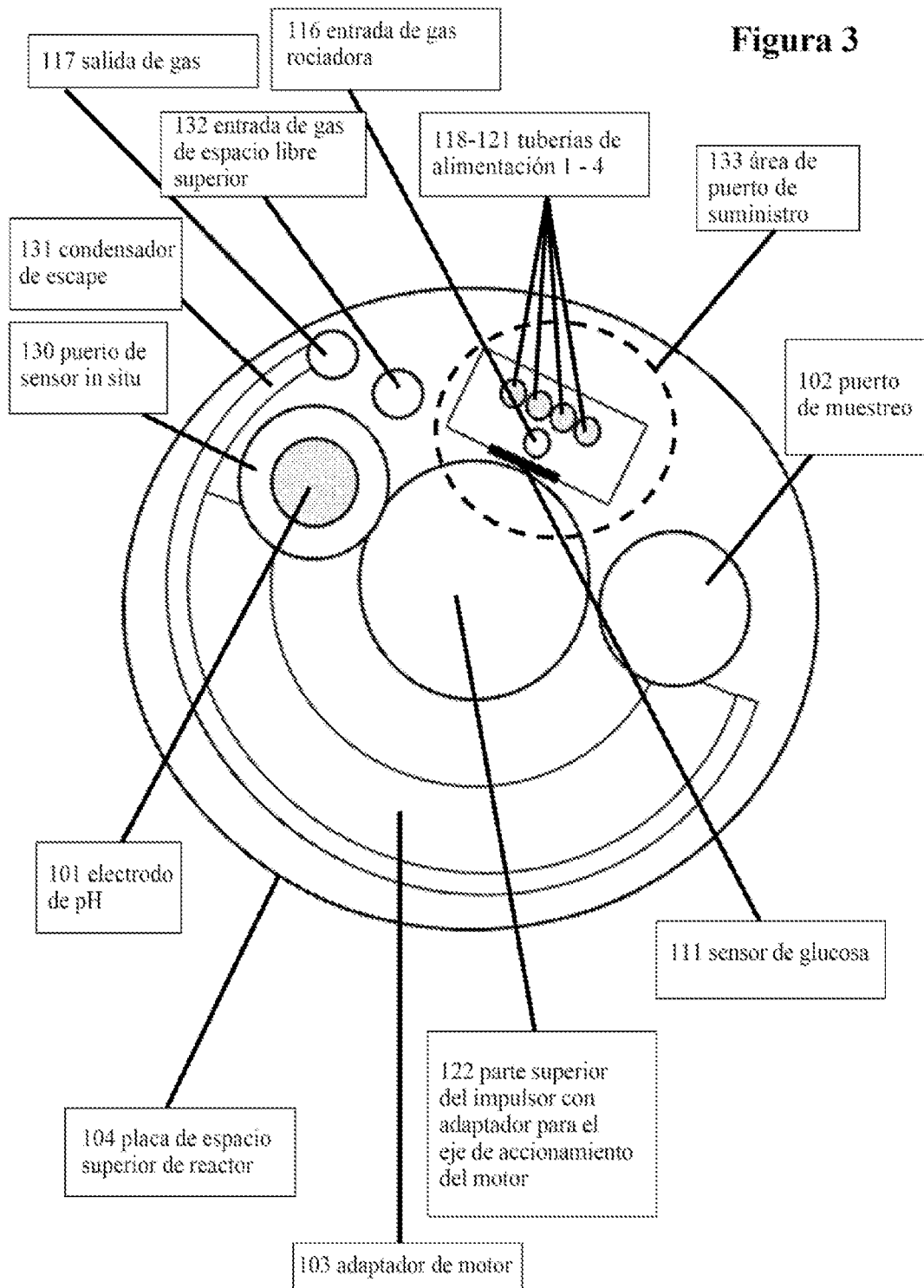


Figura 4

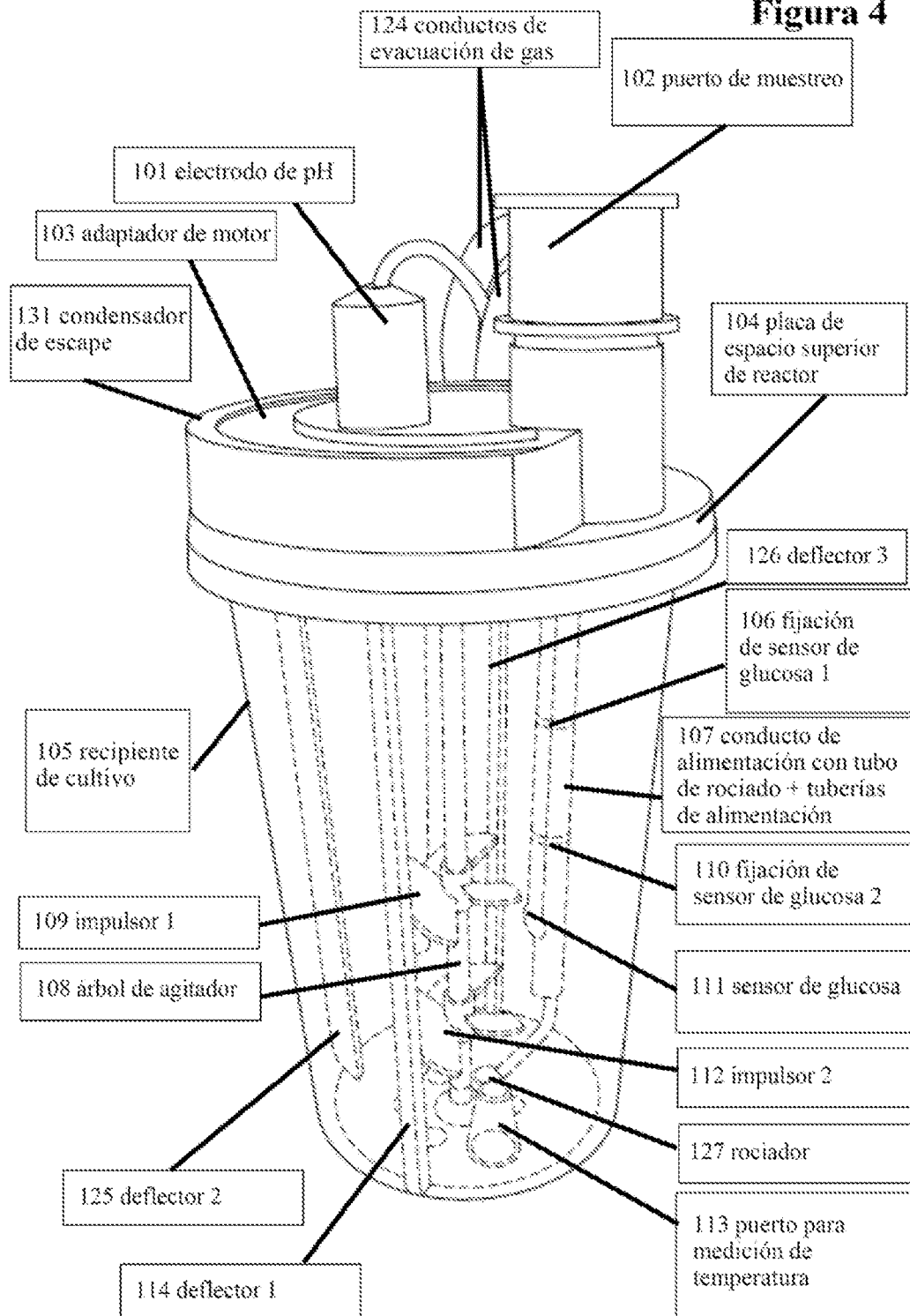


Figura 5

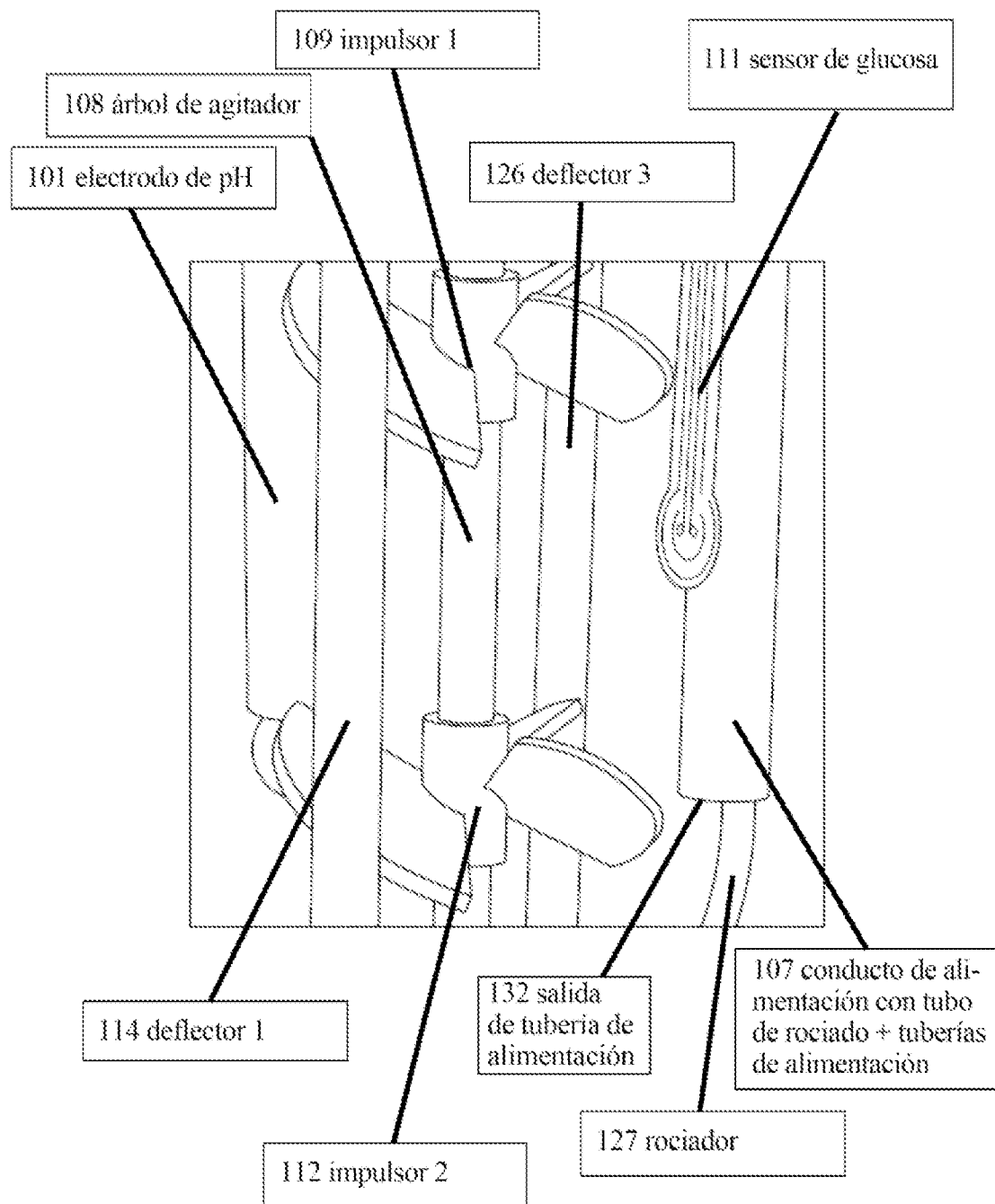


Figura 6

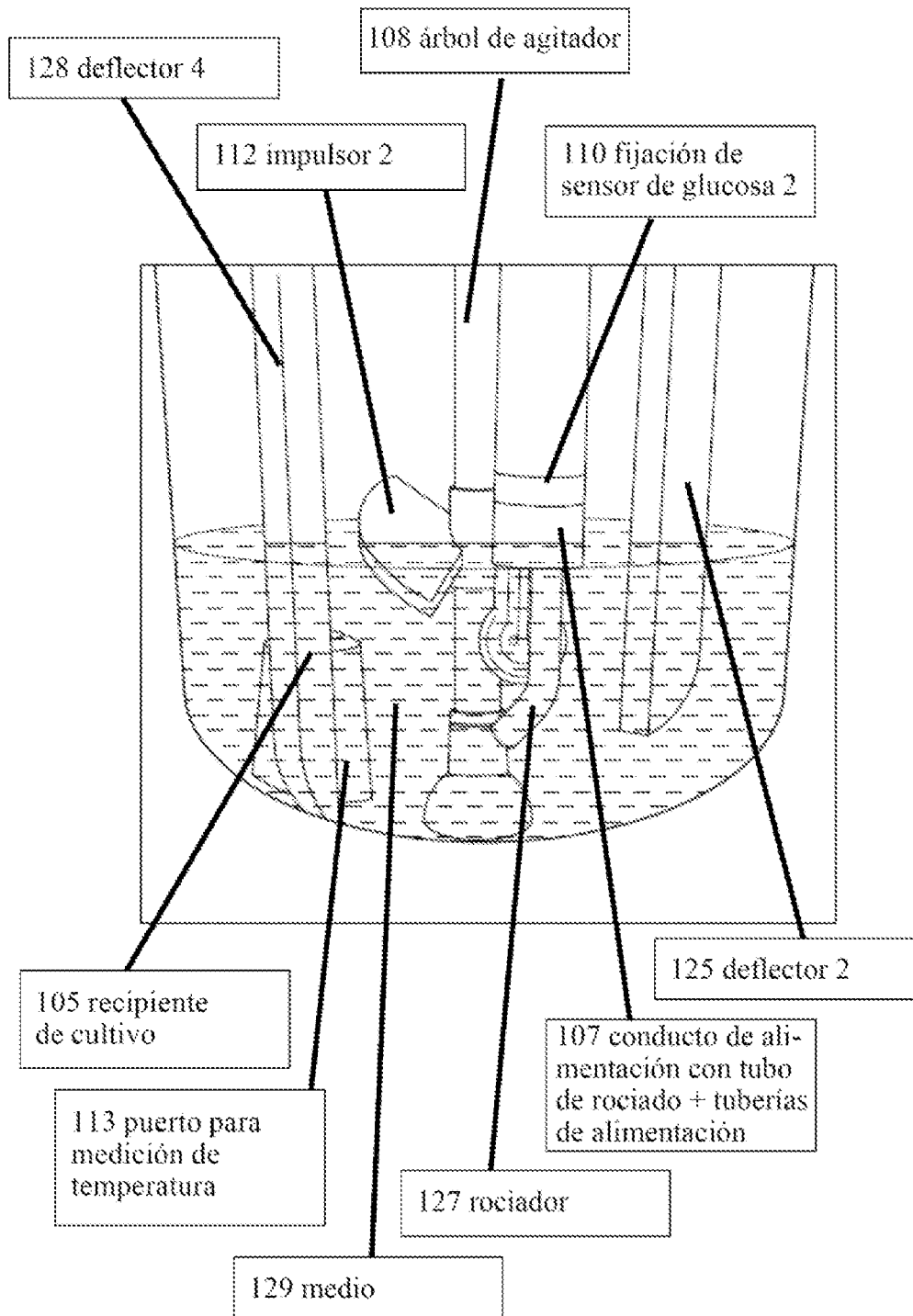


Figura 7

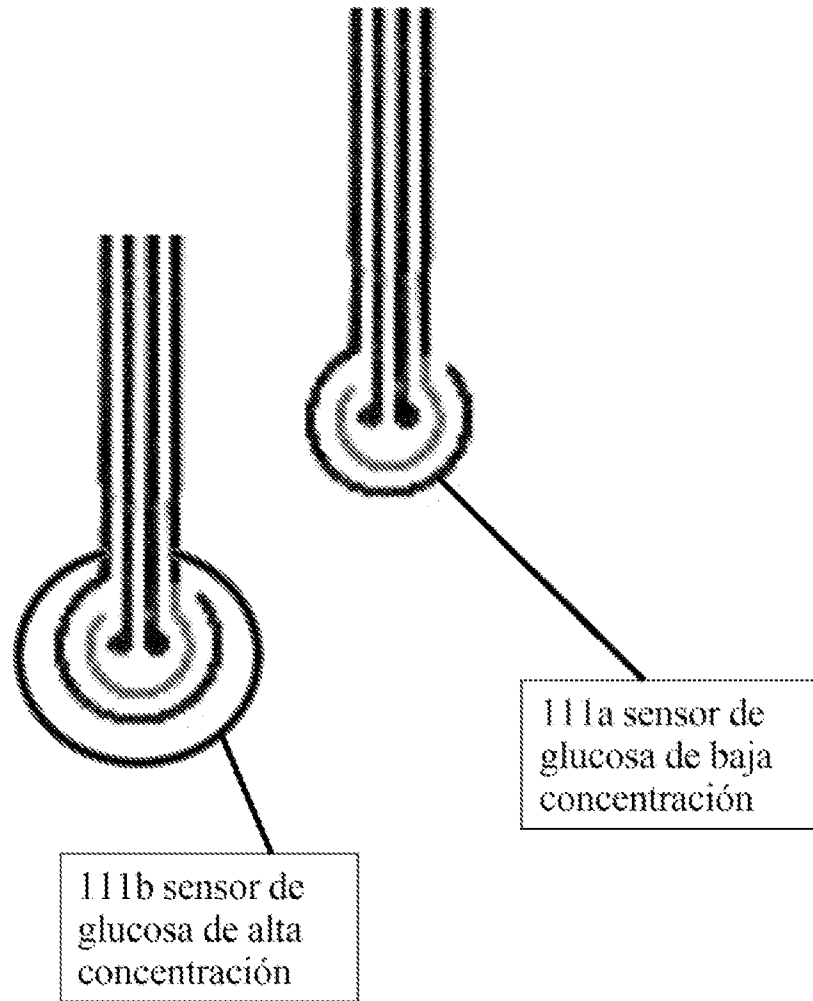


Figura 8

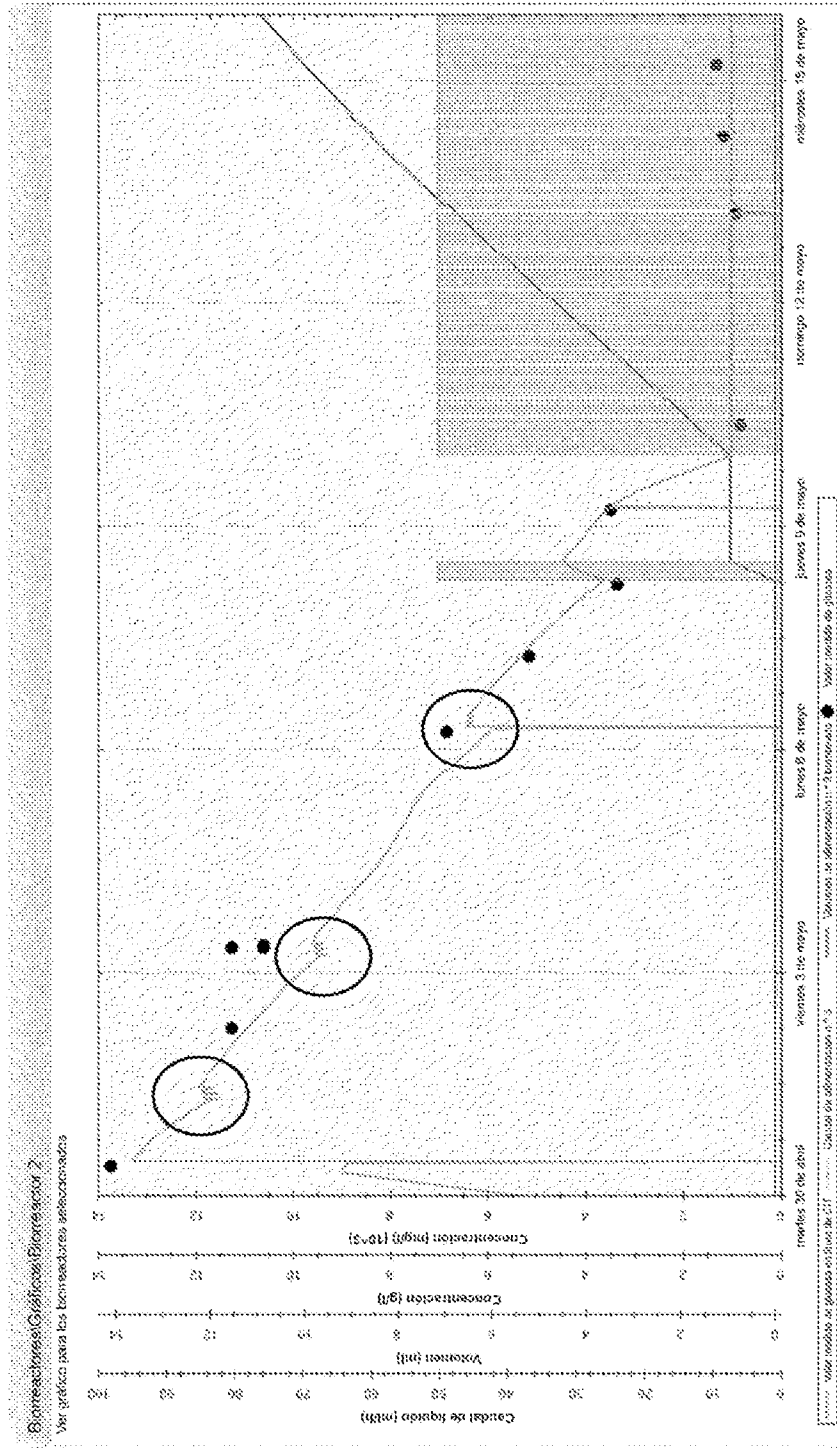


Figura 9

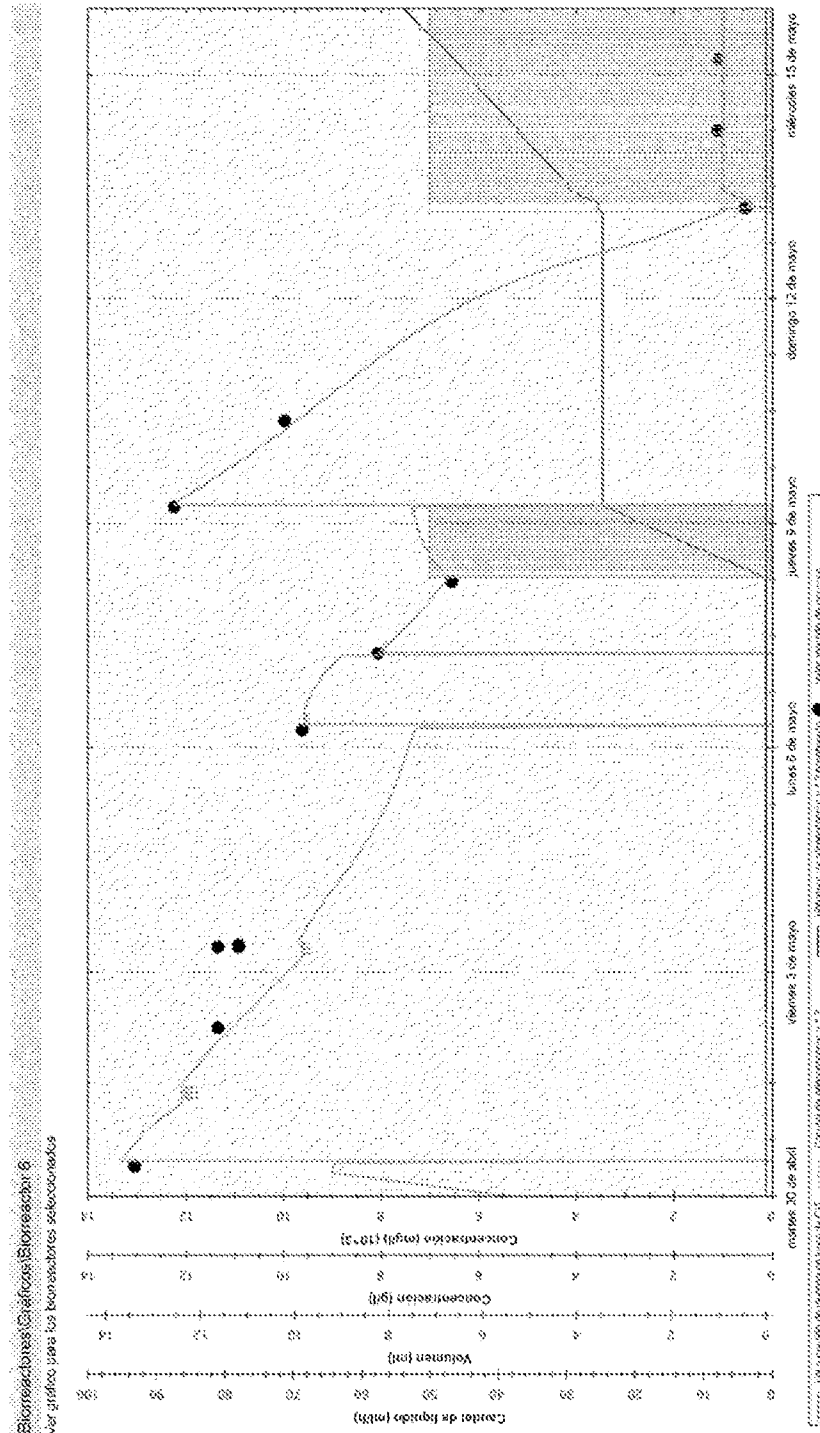
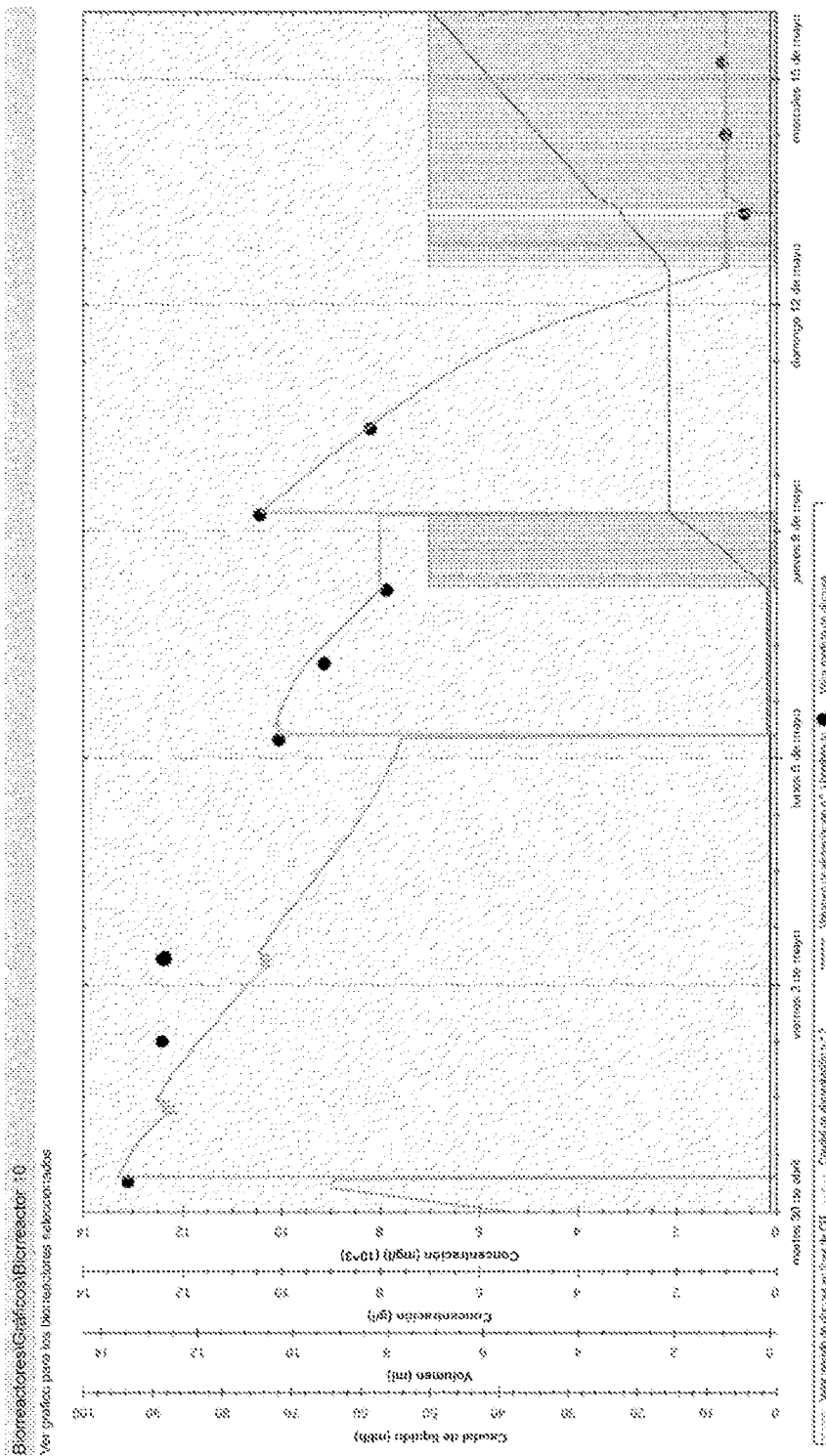


Figura 10



producto [mg/l]

defener alimentación 1

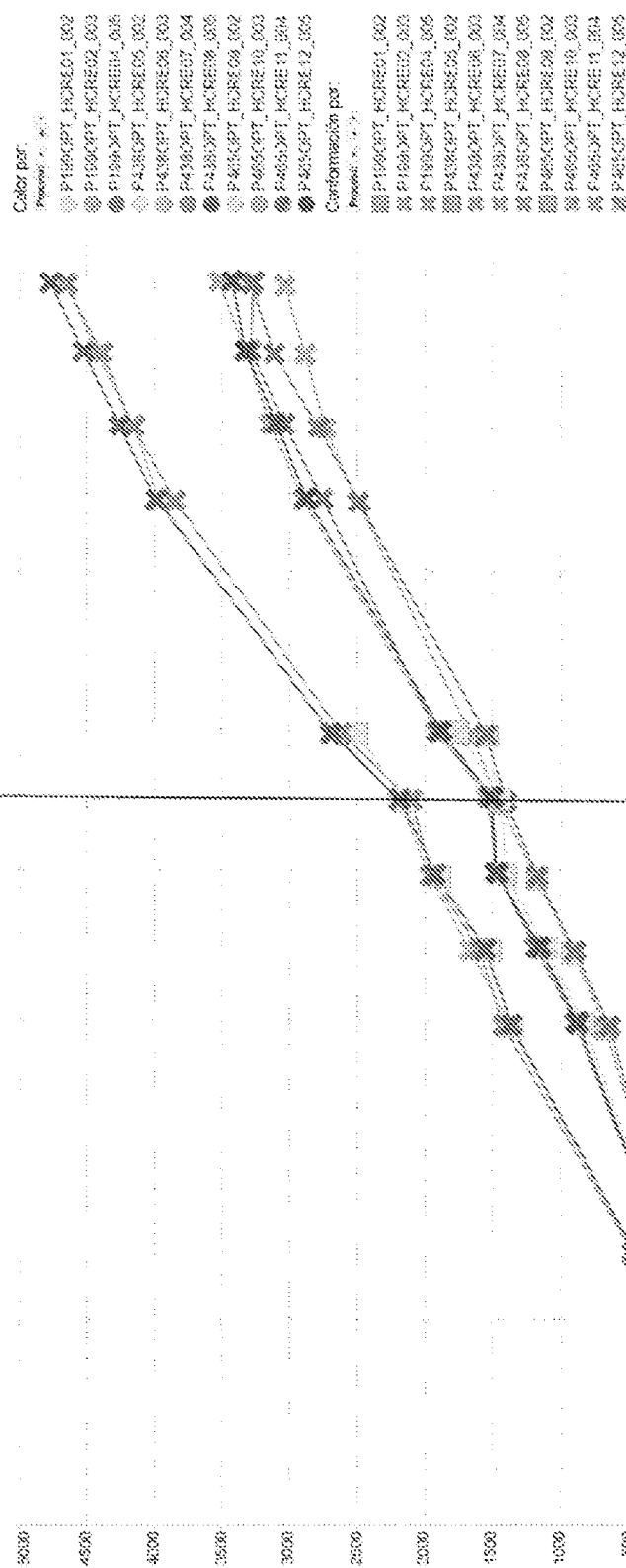


Figura 11

Figura 12

