

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 938**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2007 PCT/US2007/012042**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2007 WO07139742**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2007 E 07777182 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2029722**

54 Título: **Método y sistema para la producción de células**

30 Prioridad:

22.05.2006 US 802376 P

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

21.05.2020

73 Titular/es:

**BIOVEST INTERNATIONAL, INC. (100.0%)
300 S. Hyde Park Ave., Suite 210
Tampa, FL 33606, US**

72 Inventor/es:

**WOJCIECHOWSKI, ROBERT, J.;
PAGE, DARRELL, PAUL;
GRAMER, MICHAEL, JOHN;
BONGERS, KARL, PATRICK;
WANIGER, SCOTT, THOMAS;
NORRIS, BEVERLY;
HIRSCHEL, MARK, D.;
WONG, THIEM CHAN DUONG;
ADAMS, GRANT y
CREP, MARTIN, PEDER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 761 938 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

Método y sistema para la producción de células

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 La invención presente se refiere a un método y sistema que crea un ambiente de cultivo contenido autónomo, y más particularmente a un sistema de cultivo celular que incorpora un módulo de material de cultivo desechable y un dispositivo de base de instrumentación compacto reutilizable que puede expandir las células, incluidas las células primarias y las líneas celulares, así como las células específicas del paciente o líneas celulares de manera automatizada y libres de contaminantes.

10 **2. Descripción de la técnica relacionada**

El crecimiento anticipado de la medicina personalizada requiere nuevos paradigmas para la fabricación de terapias adaptadas a las necesidades de pacientes individuales. Se espera que el mayor desafío se presente en el campo de las terapias basadas en células, especialmente cuando dichas terapias son de naturaleza autóloga. En dichos casos, cada célula o producto basado en células debe ser fabricado desde cero para cada paciente. Los métodos manuales para el cultivo de células de mamíferos, por su naturaleza, son propensos a errores técnicos o inconsistencias que conducen a diferencias entre cultivos supuestamente idénticos. Esto se hace especialmente evidente conforme más y más células autólogas se expandidas para terapias personalizadas. Las células o proteínas específicas del paciente están sujetas a variación, especialmente cuando son modificadas más allá de los niveles que pueden ser manejados de manera eficiente con métodos manuales.

Además de requerir mucho trabajo, los estrictos requisitos para la segregación de los materiales de cada paciente de los de cualquier otro paciente exigen que las instalaciones de fabricación sean grandes y complejas, con una multitud de suites de aislamiento, cada una con su propio equipo (incubadoras, campanas de cultivo de tejido, centrifugadoras) que solamente pueden ser usadas para un paciente a la vez. Debido a que la terapia de cada paciente es un producto nuevo y único, la fabricación específica para el paciente exige además mucho trabajo, lo que requiere no solamente personal de fabricación directo sino también una mano de obra desproporcionadamente mayor para las funciones de garantía de calidad y de control de calidad.

Además, los enfoques y herramientas convencionales para la fabricación de células o productos basados en células implican en general numerosas operaciones manuales que están sujetas a variaciones incluso cuando son realizadas por técnicos cualificados. Cuando se usan a la escala necesaria para fabricar cientos o miles de células diferentes, líneas celulares y terapias basadas en células específicas del paciente, la variabilidad, el error o la velocidad de contaminación pueden tornarse inaceptables para los procesos comerciales.

Se producen pequeñas cantidades de producto secretado de diferentes maneras. Los matraces en T, botellas giratorias, botellas de agitación o bolsas de células son métodos manuales que utilizan incubadoras o salas cálidas para proporcionar entornos para el crecimiento y la producción de células. Estos métodos requieren mucha mano de obra, están sujetos a errores y resultan difíciles para la producción a gran escala.

Otro método, la producción de ascitis, utiliza un animal huésped (generalmente un ratón) en el que al peritoneo se le inyectan las células que expresan el producto y son cultivadas y mantenidas de forma parasitaria. Los animales son sacrificados y se recoge el líquido peritoneal con el producto. Este método requiere mucho trabajo también, es difícil realizar una producción a gran escala y es objetable debido a la utilización de animales. Otro método es inocular y hacer que crezcan las células en un pequeño depósito de agitación o biorreactor o cámara del tipo bolsa. El depósito satisface las necesidades ambientales y metabólicas y permite que se acumulen las secreciones celulares. Este método es costoso en cuanto al soporte de instalaciones para crear una gran cantidad de células únicas y produce un producto con una baja concentración.

Otro método es usar un biorreactor (fibra hueca, matriz cerámica, lecho fluidificador, etc.) en lugar del depósito de agitación. Esto puede reducir los costos de las instalaciones y aumentar la concentración del producto. Biovest International de Coon Rapids, MN, tiene o ha tenido instrumentos que usan estas tecnologías: fibra hueca, matriz cerámica, lecho fluidificado y depósitos de agitación.

Se conocen dispositivos de cultivo celular o material de cultivo para cultivar células *in vitro*. Según se describe en la patente de los Estados Unidos N.º 4.804.628, un dispositivo de cultivo de fibra hueca incluye una pluralidad de membranas de fibra hueca. El medio que contiene oxígeno, nutrientes y otros estímulos químicos es transportado a través de los canales de las membranas o capilares de fibra hueca y es difundido a través de sus paredes hacia un espacio extracapilar (EC) entre las membranas y la cubierta del cartucho que contiene las fibras huecas. Las células que deben ser mantenidas se acumulan en el espacio extracapilar. Los desechos metabólicos son retirados del biorreactor. Los productos de la célula o células pueden ser cosechados del dispositivo. El documento WO 03087292 A describe un sistema de cultivo celular que comprende un dispositivo que incorpora hardware para dar soporte al

crecimiento del cultivo celular y varios módulos conectables de manera retirable a dicho dispositivo. El dispositivo puede tener dispuesta una bomba peristáltica.

5 Los depósitos EC conocidos han sido típicamente rígidos. Son un recipiente a presión y, por tanto, requieren un compartimento sellado con puertos para tuberías que aumentan los costos. Un gas, típicamente aire, es introducido a través de una barrera estéril, en general un filtro de membrana, para controlar la presión del recipiente. El control del nivel de fluido ha sido limitado a puntos de disparo ultrasónicos, conductores u ópticos, o mediante una celda de carga que mide el peso del fluido. Los depósitos son caros y difíciles de fabricar. La precisión de la medición del nivel de líquido en la EC es limitada: la monitorización ultrasónica, conductiva u óptica de los niveles de líquido se ensucia con frecuencia por los residuos celulares del depósito. Alternativamente, las celdas de carga no son un diseño robusto para una detección fiable del nivel del fluido.

10 Otro problema de los sistemas de la técnica anterior es la incapacidad para controlar el lactato y detectar el pH del sistema. Un método de la técnica anterior toma muestras del medio de cultivo y las analiza usando un analizador fuera de línea. El operador ajusta la velocidad del medio de perfusión dependiendo de los valores obtenidos para mantener la concentración de lactato al nivel deseado. El operador debe intentar predecir los niveles futuros de lactato cuando ajusta las velocidades de alimentación del medio. Esto requiere mucha mano de obra, presenta una posible falta de esterilidad y el nivel de precisión del control de lactato depende de la habilidad del operador.

15 Otro método es conectar un muestreador/analizador automático para extraer periódicamente muestras de los medios de cultivo, analizarlas y proporcionar comentarios a un controlador de alimentación de medios. Este método requiere un equipo adicional y aumenta el riesgo de debilitar la esterilidad.

20 Otro método más es utilizar un detector de lactato invasivo para leer directamente el nivel de lactato y proporcionar realimentación para un controlador de alimentación de medios. Los detectores de lactato en línea deben ser esterilizables, biocompatibles, típicamente tienen baja fiabilidad y necesitan mantenimiento periódico.

25 Estas metodologías se basan en un muestreo y análisis fuera de línea costoso y laborioso, o mediante equipos adicionales para interactuar con el instrumento o requieren la adición de una sonda de lactato y componentes electrónicos al cultivo.

El material de cultivo desechable generalmente no puede ser esterilizado en autoclave, por lo que un detector de pH ha sido esterilizado históricamente por separado y a continuación se añade al material de cultivo. Sin embargo, al añadir la sonda se corre el riesgo de comprometer la esterilidad del material de cultivo. La adición de la sonda es realizada en un entorno estéril (campana de flujo laminar) y aumenta la mano de obra necesaria.

30 Las metodologías anteriores que utilizan el muestreo fuera de línea están sujetas a problemas de contaminación y dependen de la habilidad del operador para predecir los niveles futuros de lactato y la influencia de la velocidad de dilución de los medios. El equipo de muestreo necesita una interfaz con el circuito fluido de cultivo, una interfaz para la señal de realimentación y la calibración periódica de las sondas utilizadas para el muestreo. La sonda de lactato requiere una interfaz con el circuito de fluido, un método para la esterilización o una barrera estéril, una electrónica de interfaz para convertir la señal de la sonda en una realimentación útil y un método para calibrar en el circuito de fluido.

35 La preparación del sistema para comenzar el cultivo celular requiere además mucho trabajo. El material de cultivo debe ser combinado y esterilizado o las sondas deben ser preparadas, esterilizadas e insertadas asépticamente en la porción previamente esterilizada del material de cultivo. El conjunto del material de cultivo es cargado a continuación en el instrumento. Se necesita una serie de operaciones manuales para verificar la integridad del conjunto, introducir fluido en el camino del flujo del material de cultivo, retirar los residuos tóxicos (por ejemplo, surfactantes) del material de cultivo, iniciar el material de cultivo en un modo de inoculación previa, introducir factores en el camino del flujo preparándolo para las células, inoculando las células en el biorreactor y comenzando la ejecución (crecimiento de la masa celular y cosecha final del producto).

45 Generalmente se usan dos métodos para la esterilización. En un método se dispone un electrodo en un soporte, se esteriliza con vapor el conjunto (sonda) y a continuación se inserta asépticamente la sonda en el material de cultivo previamente esterilizado. El segundo método consiste en situar una sonda no estéril en un soporte y a continuación usar vapor para esterilizar el electrodo en su sitio, llamado vapor in situ. Ambos métodos requieren mucho trabajo, son propensos al fallo y los procedimientos deben ser validados.

50 Existen otros métodos que son menos comunes. Los esterilizantes fríos pueden ser usados para esterilizar el soporte y el electrodo antes de la inserción aséptica. Una membrana permeable puede ser usada para aislar la sonda no estéril del fluido estéril que está siendo detectado. Hay dispuesto un soporte con la membrana en el camino del fluido, ya sea antes de la esterilización o después si el soporte y la membrana son esterilizados por separado, y a continuación el detector es situado contra la membrana o cerca de ella y se asume que el fluido a ambos lados de la membrana está equilibrado.

55 Electrodo de vidrio no han sido incluidos en el material de cultivo en el pasado porque no se sabía si las sondas podían sobrevivir a la esterilización con EtO y ser almacenadas en seco. Los electrodos de vidrio rellenos se almacenan normalmente hidratados en un tampón líquido.

5 Cada célula o línea celular única debe ser cultivada, los productos celulares deben ser cosechados y purificados por separado. Para hacer una gran cantidad de celdas o de líneas celulares únicas, se necesita una cantidad considerable de instrumentos. Si se contempla la aplicación de las células o productos con fines terapéuticos, se requiere una estricta segregación de cada proceso de producción celular. En consecuencia, la compactidad del diseño y la cantidad de recursos auxiliares de apoyo necesarios se convierten en un problema importante de las instalaciones. Además, los sistemas actualmente disponibles son de carácter general y requieren un tiempo considerable por parte de operadores capacitados para configurar, cargar, descargar, inocular, ejecutar, cosechar y descargar. Cada paso requiere usualmente documentación manual.

10 Además, el seguimiento de la producción exige la generación de un registro por lotes para cada operación de cultivo celular. Históricamente, esto se ha hecho con un sistema basado en el papel y consiste en que el operador introduce la información. Esto requiere mucho trabajo y está sujeto a errores.

Las técnicas de purificación actuales implican también la limpieza y la reutilización de componentes. Esto requiere que se escriban los procedimientos normalizados de trabajo (*Standard Operational Procedures*, SOP) y que se valide el proceso de limpieza y reutilización. Ésta es una actividad que requiere mucho tiempo.

15 En consecuencia, existe la necesidad de un sistema y un método mediante el que las células y/o productos celulares pueden ser cultivados de manera totalmente automática, rápida y estéril.

Compendio de la invención

20 Un aspecto de la invención presente es proporcionar un sistema modular e integrado para la producción y expansión de células o de líneas celulares tal como se describe en la reivindicación 1. El sistema consiste en un alojamiento de módulo de control reutilizable con todos los componentes mecánicos y electrónicos y módulos de crecimiento celular desechables que están fijados al módulo de control. Este sistema minimiza la necesidad de técnicos cualificados y, lo que es más importante, evita la posibilidad de contaminación cruzada en una instalación de usos múltiples. Como sistema cerrado, la seguridad proporcionada por la segregación completa facilita la aplicabilidad directa a terapias o diagnósticos que requieren un cultivo celular autólogo. Este dispositivo de cultivo celular automatizado y autónomo permite el cultivo simultáneo de numerosos cultivos celulares dentro de una instalación compacta, sin necesidad de conjuntos de cultivos celulares individuales y segregados. El sistema de la invención presente proporciona un sistema de contención sellado compacto que permite la fabricación rentable de células, líneas celulares, células específicas del paciente y productos celulares a escala industrial.

30 Otro aspecto de la invención presente es proporcionar un método y sistema que incorpore material de cultivo desechable, que elimine la necesidad de la limpieza y reutilización.

35 El sistema de la invención presente incorpora características que reducen en gran medida el tiempo necesario del operador para dar soporte a las operaciones (por ejemplo, un casete de bomba integrado, material de cultivo previamente esterilizado con detectores de pH, material de cultivo de carga rápida) y procedimientos y aparatos automatizados diseñados que permiten secuenciar al sistema por medio de operaciones (por ejemplo, pinzas de fluido automatizadas, software de control).

El sistema puede integrar el proceso de producción y purificación del producto del cultivo celular. El diseño del material de cultivo e instrumento simplifica y reduce la mano de obra necesaria para producir el producto. Esto reduce las fuentes de error del proceso.

40 La invención presente proporciona un sistema y método de cultivo celular automatizado que crea un entorno de cultivo autocontenido. El aparato incorpora cultivo de perfusión con material de cultivo desechable previamente esterilizado y sellado, como fibra hueca u otros biorreactores, control de proceso programable, válvula automática para fluidos, control de realimentación de pH, control de realimentación de ácido láctico, control de temperatura, control de suministro de nutrientes, retiro de desechos, mecanismo de intercambio de gases, depósitos, tuberías, bombas y recipientes de cosecha. Por consiguiente, el presente aparato de cultivo celular (denominado AutovaxID Cell Culture Module™) puede expandir las células de una manera altamente controlada y libre de contaminantes. Las células a las que se aplica este enfoque incluyen líneas celulares transformadas o no transformadas, células primarias que incluyen células somáticas tales como linfocitos u otras células inmunes, condrocitos, miocitos o mioblastos, células epiteliales y células específicas del paciente, primarias o de otro tipo. Se incluyen además células o líneas celulares que han sido genéticamente modificadas, tales como las células madre adultas y embrionarias. Específicamente, el aparato de cultivo celular automatizado permite la producción y cosecha de células o proteínas secretadas por células de una manera que minimiza la necesidad de intervención del operador y minimiza la necesidad de salas limpias segregadas para el crecimiento y la manipulación de las células. Además, el aparato proporciona un entorno de cultivo que es completamente autónomo y desechable. Esto suprime la necesidad de salas limpias individuales que generalmente son requeridas en una instalación regulada de usos múltiples. El control de la dinámica de fluidos dentro del biorreactor permite ajustar las condiciones de crecimiento, por ejemplo, cambios en las concentraciones de factores de crecimiento, para facilitar la aplicación de protocolos de cultivo únicos o la expansión de células o líneas celulares únicas. Como resultado, hay menos variación y se requiere menos mano de obra para la producción consistente y

reproducibles de células para aplicaciones de expansión de células autólogas y su uso en aplicaciones de medicina personalizada.

5 Según éstos y otros aspectos de la invención presente, se facilita un sistema de cultivo celular para la producción de células y productos derivados de células que incluye un dispositivo de base de instrumentación reutilizable que incorpora hardware para dar soporte al crecimiento del cultivo celular. Un módulo de material de cultivo desechable que incluye una cámara de crecimiento celular puede estar fijado de manera retirable al dispositivo de base de la instrumentación.

10 Según éstos y otros aspectos de la invención presente, se proporciona además un método para la producción de células y productos celulares en un entorno altamente controlado y libre de contaminantes que comprende los pasos de proporcionar un módulo desechable de material de cultivo que incluye una cámara de crecimiento celular, y un dispositivo de base de instrumentación reutilizable que incorpora hardware para dar soporte al crecimiento del cultivo celular. El dispositivo de base incluye un control por microprocesador y una bomba para hacer que circulen los medios a través de la cámara de crecimiento celular. El módulo de material de cultivo está fijado de manera retirable al dispositivo de base de la instrumentación. Las células son introducidas en la cámara de crecimiento celular. Una fuente de medios está fijada de manera fluida al módulo de software del material de cultivo. Los parámetros de operación están programados en el control por microprocesador. La bomba es operada para hacer que circulen los medios a través de la cámara de crecimiento celular para hacer que crezcan células o productos celulares dentro de ella. Las células crecidas o los productos celulares son cosechados a partir de la cámara de crecimiento celular. A continuación se desecha el módulo del material de cultivo.

20 Éstas y otras características, aspectos y ventajas de la invención presente se harán más evidentes a partir de la descripción siguiente detallada de la realización preferida hecha respecto a los dibujos que se acompañan, en los que:

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 es una vista en perspectiva del sistema para producir células y/o productos derivados de las células según la invención presente.

25 La Figura 2 es otra vista en perspectiva del sistema de la invención presente.

La Figura 3 es una vista en perspectiva del dispositivo de instrumentación de la invención presente.

La Figura 4 es una vista lateral por detrás y parcial del dispositivo con las cubiertas retiradas de la Figura 3.

La Figura 5 es una vista por detrás del dispositivo con las cubiertas retiradas de la Figura 3.

La Figura 6 es una vista ampliada del sistema de calentamiento del dispositivo de la Figura 3.

30 La Figura 7 es una vista en perspectiva de la bomba de salida variable del sistema de la invención presente.

La Figura 8 es una vista en despiece ordenado de la bomba de la Figura 7.

La Figura 9 es una vista en perspectiva del casete de bomba del sistema de la invención presente.

La Figura 10 ilustra el método de instalación del módulo de material de cultivo celular y el dispositivo de la invención presente.

35 La Figura 11 es una vista en perspectiva de la mezcla de gases y el control del ciclo del fluido del módulo.

La Figura 12 es una vista por delante del control de ciclo de fluido de la Figura 11.

La Figura 13 es una vista en perspectiva de un actuador de válvula de selección giratoria.

Las Figuras 14A y 14B son vistas en despiece del rotor de la válvula de la Figura 13 y el cuerpo utilizado en él.

La Figura 14C es una vista por detrás del cuerpo de la válvula.

40 Las Figuras 15A - 15C son vistas en perspectiva de una abrazadera deslizante tubular.

La Figura 16 es una vista en perspectiva del factor y de las bolsas de cosecha.

La Figura 17 es una vista en perspectiva del módulo de medio de cultivo desechable.

La Figura 18 es una vista interior del módulo de la Figura 17.

La Figura 19 es una vista interior en perspectiva de la parte trasera del módulo de la Figura 17.

45 La Figura 20 es una vista en perspectiva de una unidad cíclica extracapilar.

La Figura 21A es un diagrama de flujo de la unidad cíclica de la Figura 20.

La Figura 21B es una vista en despiece ordenado de la unidad cíclica.

La Figura 22 es un diagrama de flujo de un sistema de control de lactato.

La Figura 23 es un diagrama de flujo del sistema de la invención presente.

5 La Figura 24 es otra vista en perspectiva de un módulo.

La Figura 25 es una vista en sección transversal de un biorreactor de fibra hueca flexible.

Las Figuras 26 - 31 son vistas de la pantalla táctil asociada al control automático del sistema de la invención presente.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

10 Haciendo referencia a la Figura 1, la invención presente facilita un sistema 10 completamente integrado para producir células y productos derivados de las células en un entorno cerrado y autosuficiente. Más específicamente, el sistema permite la expansión celular y la cosecha de células y sus productos con una mínima necesidad de interacción técnica. Según se describe a continuación en la memoria presente, el dispositivo incorpora tecnología de cultivo celular, por ejemplo, fibra hueca o una tecnología de perfusión de biorreactor similar, con todos los componentes de los tubos distintos de los de la alimentación de medios, el tubo de cosecha y los tubos roscados a través del casete de bomba, contenidos en una incubadora desechable de un único uso 12. Después de la inoculación del biorreactor con células, el sistema sigue procesos preprogramados para administrar medios, mantener el pH, mantener los niveles de lactato, controlar la temperatura y cosechar células o proteínas secretadas por células. Los parámetros de crecimiento del cultivo celular estándar o únicos pueden ser programados antes de la inoculación del biorreactor, de tal manera que varios tipos de células pueden ser expandidos y de tal manera que las células o los productos celulares pueden ser cosechados de una manera eficiente y reproducible con una mínima posibilidad de error humano.

15 El sistema se basa en la tecnología de la cámara de crecimiento celular. Por ejemplo, los biorreactores que tienen una pluralidad de fibras huecas semipermeables u otro tipo de membrana semipermeable o de sustrato encapsulados en un alojamiento para crear un espacio dentro de la fibra o a un lado de la membrana (denominado espacio intracapilar o IC) separados del exterior de las fibras o en el otro lado de la membrana (denominado espacio extracapilar o EC).
25 La distribución del fluido entre el espacio IC y EC ocurre a través de los poros de fibra que pueden variar en tamaño desde 10MW (Kd) hasta 0,2µm. Las células son situadas en un lado de la fibra o de la membrana, generalmente en el espacio EC, en un medio de cultivo celular completo, que suele ser el mismo medio utilizado para expandir las células antes de la inoculación del biorreactor (que contiene suero, es libre de suero o es un medio libre de proteína). Las células son situadas generalmente en el espacio de la EC cuando la proteína secretada es el producto deseado.
30 En algunos casos, cuando las células son el producto deseado, puede resultar beneficioso situar células en el espacio IC.

El medio es perfundido a través de un biorreactor 20 circulando a través del espacio IC a una velocidad rápida. El medio puede ser un líquido que contiene una mezcla bien definida de sales, aminoácidos y vitaminas que con frecuencia contiene uno o más factores de crecimiento de proteínas. Esto sirve para entregar nutrientes al espacio celular y, por el contrario, elimina o previene una acumulación tóxica de desechos metabólicos. Durante esta circulación, el medio es pasado a través de un cartucho oxigenador o intercambiador de gas 24 que sirve para proporcionar un control de pH y oxígeno para las células y, a la inversa, retirar el dióxido de carbono del cultivo. Cuando el biorreactor 20 contiene un número menor de células, justo después de la inoculación, el oxigenador o cartucho de intercambio de gases es usado para proporcionar CO₂ y, posteriormente, controlar el pH del ambiente de cultivo.
40 Conforme aumenta el número de células, el oxigenador es usado para retirar el CO₂, lo que sirve para mejorar la neutralización del ácido y controlar el pH del cultivo. Se incluyen además otras configuraciones de biorreactor, además de fibras huecas, que están diseñadas y optimizadas para el crecimiento y la producción de células y la producción de productos derivados de células.

45 El sistema 10 proporciona eficiencias significativas y reducción de costos por medio de su componente desechable y una operación cerrada. Como tal, las líneas celulares están contenidas en un sistema cerrado y son cultivadas continuamente sin necesidad de salas limpias segregadas y especializadas. Este aparato totalmente integrado elimina la necesidad de validaciones de limpieza y esterilización, así como la necesidad de tuberías duras asociadas a las instalaciones convencionales de cultivo celular.

Haciendo referencia de nuevo a la Figura 1, el sistema comprende dos partes individuales: un dispositivo de base de instrumentación 14 que es reutilizable y un módulo de material de cultivo cerrado 12 que es usado para una sola producción y es desechable. Se pueden usar numerosos módulos 12 en un solo dispositivo 14. El instrumento proporciona el hardware para dar soporte al crecimiento y a la producción de cultivos celulares en un paquete compacto. Según se muestra en la Figura 2, y según se describe con más detalle en esta memoria, un actuador 16 de bomba peristáltica de múltiples canales y fácil carga situado en el dispositivo de base 14 y un casete de bomba 70 mueven medios basales recientes al material de cultivo, retiran los medios gastados, agregan factores de crecimiento u otros suplementos y retiran la cosecha del producto. Una zona de almacenamiento frío integrada 18 mantiene el

factor y la cosecha a baja temperatura (aproximadamente 4°C). Un mecanismo de calentamiento integrado 22 (Figura 6) mantiene el ambiente celular para promover el crecimiento y la producción. El cartucho de intercambio de gases 24 (Figura 5), junto con un detector de pH de material de cultivo 26, controla el pH del medio de cultivo celular. Se utilizan dos unidades automatizadas de valoración de tubos 90 (Figura 3) para controlar la configuración del camino del flujo del material de cultivo para lograr las funciones de conmutación de fluido necesarias para iniciar y realizar una ejecución exitosa. Las válvulas 90 y los detectores 32 (Figuras 3, 5, 13) del instrumento controlan el ciclo del fluido en el módulo de material de cultivo 12. Hay dispuesta una bomba de accionamiento 34 (Figuras 3, 5) para la circulación del fluido. Un lector de código de barras adjunto, no mostrado, facilita el rastreo del operador y del lote. Un puerto de comunicación vincula el instrumento a un sistema de gestión de información de datos (tal como un MIS). Una pantalla de panel plano 36 (Figura 1) con pantalla táctil está disponible para la interacción del usuario.

El módulo del material de cultivo de un solo uso 12 es facilitado previamente esterilizado. Está diseñado para cargar rápidamente el instrumento ("carga rápida"), según se describe más adelante en esta memoria. La carga del cuerpo del material de cultivo establece conexiones con el instrumento. El casete de la bomba 70 (Figura 2), que está físicamente fijado al tubo, permite al usuario cargar rápidamente los segmentos de la bomba. Este diseño y disposición minimiza los errores de la carga. El recinto del material de cultivo 12 proporciona una zona que es calentada para mantener la temperatura del fluido celular. Una unidad cíclica de fluido 40 (Figuras 1, 18) mantiene los volúmenes de fluido y del ciclo y está incluida en el material de cultivo. Hay dispuestos detectores para la velocidad de circulación del fluido, pH y un sumidero térmico para el detector de temperatura del instrumento. El gas mezclado del instrumento es dirigido al cartucho de intercambio de gases 24 que proporciona oxígeno y añade o retira dióxido de carbono al fluido circulado para dar soporte al metabolismo celular. Una bomba acoplada magnéticamente 34 (Figuras 11 - 12) hace que circule el fluido a través del biorreactor 20 y del cartucho de intercambio de gases 24. El biorreactor 20 que proporciona el espacio celular y el intercambio de componentes de medios está también en el material de cultivo. Hay dispuestos recipientes desechables para la recogida de la cosecha. Antes del comienzo del cultivo, el operador conecta una fuente de medios, una bolsa de factor y un recipiente de medios usados al material de cultivo antes de la ejecución. Al final de la ejecución, los recipientes de la cosecha son retirados o drenados, los medios y el recipiente de medios gastados son desconectados, el casete de la bomba es descargado, la bolsa de la cosecha es desconectada, el cuerpo del material de cultivo es descargado y el material de cultivo usado es llevado a un recipiente de riesgo biológico para ser desechado.

La expansión celular y el seguimiento posterior del proceso requiere la generación de un registro por lotes para cada cultivo. Históricamente, esto se ha hecho con un sistema basado en papel y consiste en que la entrada de la información es realizada por el operador. Esto requiere mucho trabajo y está sujeto a errores. El dispositivo totalmente integrado incorpora un lector de código de barras y un software de recopilación de datos que, cuando es usado con el sistema de gestión de información (MIS), permite la generación automática del registro de lotes.

El sistema de la invención presente tiene aplicación en un entorno de cultivo celular regulado. Se anticipa que las terapias autólogas de células enteras o las terapias de proteínas (vacunas) específicas del paciente requieren, por su naturaleza, el cultivo simultáneo de numerosas líneas celulares en una sola instalación. Además de la segregación creada por medio de este enfoque de cultivo cerrado, el aparato está diseñado para admitir un protocolo del sistema de gestión de información estándar (tal como un LIMS o MIS). Esta capacidad contribuye a la creación de registros de lotes completos y a la verificación de las condiciones de cultivo para garantizar la estandarización, el seguimiento y la seguridad de cada producto. Esta capacidad facilita el concepto multiproducto que resulta fundamental para las instalaciones involucradas con productos autólogos o específicos del paciente.

Haciendo referencia a la Figura 1, el módulo de material de cultivo celular desechable 12 puede ser fijado de manera retirable al dispositivo 14. El módulo requiere múltiples interfaces mecánicas y eléctricos para la instrumentación de control del dispositivo 14. El módulo 12 tiene características de interfaz integradas en el módulo que se conjugan con las características de la interfaz del instrumento en el dispositivo para permitir una instalación de movimiento único (Figura 10). Como los módulos 12 deben ser desechados después de su uso, debe tenerse en cuenta que se pueden usar numerosos módulos junto con un único dispositivo de base 14.

Según se muestra en la Figura 3, las características de la interfaz del dispositivo 14 incluyen la bomba de circulación 34, las válvulas del actuador 90 y el detector del ciclo 32. Además, una sonda de temperatura 44 y un detector de flujo 46 hacen de interfaz con los componentes del módulo 12. El dispositivo 14 incluye además una conexión eléctrica 48 para la sonda de pH 26 dispuesta dentro del módulo 12.

Los puertos de gas 52 se comunican con el intercambiador de gas 24. Un puerto 52 se comunica con la entrada al intercambiador 24 y el otro puerto 52 se comunica con la salida del intercambiador. Los puertos de gas 54 controlan la presión del dispositivo cíclico 40. Un puerto 54 se comunica con la cámara IC y el otro puerto 54 se comunica con el espacio EC. Según se ve desde la parte delantera, el puerto izquierdo 52 es la salida del intercambiador y el puerto derecho 52 es la entrada del intercambiador. El puerto superior 54 es el puerto de presurización del depósito IC, y el puerto inferior 54 es el puerto de presurización del depósito EC.

Según se ha descrito anteriormente, el módulo 12 es calentado para mantener la temperatura del fluido celular. El mecanismo de calentamiento 22 (Figura 6) mantiene el ambiente celular para promover el crecimiento y la producción. El cultivo celular, los módulos desechables 12 que requieren temperaturas elevadas, son calentados encapsulando

completamente el módulo y fijando el módulo al instrumento de control 14, de manera que los puertos de aire están alineados y el aire caliente es forzado al módulo desde el instrumento por un sitio y se deja que escape por otro. El dispositivo de instrumento 14 tiene una salida de aire calentado 58 y una entrada de retorno de aire calentado 56.

5 Cuando el módulo desechable 12 está instalado en el dispositivo de instrumento de control 14, la entrada de aire 88 (Figura 19) del módulo desechable está alineada con la salida de aire 58 del instrumento de control. El mecanismo de calentamiento 22 fuerza el aire caliente a través de la salida 58 y dentro de la entrada de aire caliente 88 y dentro del módulo desechable 12. El aire calentado eleva la temperatura de los componentes dentro del módulo. El aire de escape sale a través de la salida de aire 86 y pasa a la entrada de aire 56 del dispositivo de instrumento 14 donde es hecho circular por medio de recirculación.

10 Durante la instalación, el módulo 12 es alineado con las conexiones del dispositivo 14 y el módulo es situado en la posición de operación según se muestra en la Figura 10. Todas las características de la interfaz de acoplamiento son funcionales. Haciendo referencia a la Figura 19, cuando están instaladas, ciertas características del módulo 12, formadas en un panel trasero 148 del módulo, hacen de interfaz con el dispositivo 14. La salida de aire del módulo 86 está alineada con la entrada de aire del dispositivo 56 y la entrada de aire del módulo 88 está alineada con la salida del aire del dispositivo 58 para hacer que circule el aire calentado a través del módulo 12 según se describe en esta memoria. Los conectores de gas 152 y 154 acoplan los puertos de gas del dispositivo 52 y 54, respectivamente, para permitir que el gas entre y salga del módulo 12. Los cuerpos de válvula 156 reciben las válvulas del actuador 90. El cubo 158 recibe la interfaz de la sonda de pH 26 y está alineado con el conector eléctrico 48. El módulo 12 está conectado al actuador de la bomba de circulación 34 por medio de la conexión de la bomba del módulo 164. La unidad cíclica 40 se comunica también con el detector de ciclo 32 cuando el módulo está instalado. El detector de flujo 46 del dispositivo 12 está acoplado a la conexión del detector de flujo 166. El detector de temperatura 44 del dispositivo 14 está acoplado a un receptáculo no invasivo del módulo 12 que está en contacto con los medios de IC para proporcionar una realimentación de control al mecanismo de control para regular la salida térmica del calentador 22. Las conexiones de acoplamiento anteriores facilitan la instalación de un movimiento del módulo 12 en el dispositivo.

25 Haciendo referencia a las Figuras 7 - 9, la invención presente incorpora una bomba 16 de posición múltiple, carga de casete y peristáltica (Figura 2) con control de salida discreto y variable para cada canal. Una pluralidad de canales 60 (Figura 3) están situados en el dispositivo 14. Aunque se muestran cuatro canales, debe entenderse que la bomba 16 puede tener más o menos canales.

30 Según se muestra en la Figura 8, la bomba tiene un control individual, variable, de la salida de cada canal. Los rotores de la bomba 62A - 62D tienen un eje axial fijo común 64 con un servomotor individual. Los rotores de oclusión 66A a 66D están montados en los rotores de bomba 62A - 62D, que a su vez están montados en el eje único 64 con apoyos interiores que permiten un control funcional independiente mediante un servomotor de reacción 68A - D respectivo. El eje único minimiza las acumulaciones de tolerancia típicamente causadas por la desalineación de los rotores individuales y el acoplamiento de los ejes con un casete multicanal. Hay detectores de realimentación incluidos para verificar el giro de los rotores de la bomba.

35 Las aplicaciones típicas de bombas peristálticas multicanal operan usando un eje de accionamiento giratorio que es común a todos los rotores. Esto causa que todos los rotores giren a las mismas revoluciones por minuto (RPM), produciendo la misma salida de fluido. Se pueden usar tubos de diferentes diámetros interiores para dar una relación de salida delta fija de un rotor a otro. Para obtener una salida variable de los segmentos de la bomba peristáltica, se usan cabezales de bomba y actuadores individuales. Esto requiere casetes de tubos individuales que deben ser cargados individualmente y no que permiten una pequeña distancia de centro a centro entre los cabezales de la bomba.

40 Según se muestra, la Figura 9 presenta un casete multicanal 70 que tiene dispuesto un tubo peristáltico precargado 72 para reducir los errores de carga y el tiempo de instalación. El mecanismo incluye una característica de inserción de casete accionada por levas 74 que hace de interfaz con la leva 67 sobre la bomba 16. Según se muestra en la Figura 8, se hace girar un mando 65 para mover la característica de levas 74 a su posición para ayudar a la oclusión inicial del tubo durante la carga.

45 La configuración del casete está estructurada para contener múltiples segmentos de tubos peristálticos. Una característica de aprisionamiento 76 en la parte superior e inferior evita que el tubo sea arrastrado durante la operación. El diseño permite que todos los segmentos de los tubos se carguen en el mecanismo de accionamiento de la bomba al mismo tiempo. Se incluye además una característica de enganche 74 para proporcionar una superficie de apoyo para que el enganche accionado por la leva 67 reaccione a su acción.

50 Volviendo a las Figuras 1 y 2, el casete 70 está precargado con un tubo peristáltico (Figura 24) y está situado en la ranura 80 del módulo 12. Después de situar el módulo 12 en el dispositivo 14, el casete 70 es retirado e insertado en la interfaz o placa 82. Cada sección del casete 71 (Figura 9) que da soporte al tubo es insertada en un canal respectivo 60 (Figura 3) de la interfaz 82. Esta configuración reduce los errores de carga del segmento del tubo con casetes precargados de múltiples posiciones, y reduce el tiempo de instalación.

55

Haciendo referencia a las Figuras 11 y 12, las válvulas y detectores 32 del instrumento controlan el ciclo del fluido en el módulo del material de cultivo 12. Dos detectores ópticos detectan la posición baja o alta de la bandera 140 del detector de posición de ciclo (Figura 20). Esta información es usada por un algoritmo predictivo para controlar las presiones aplicadas a la cámara IC y a la bolsa de presión EC para efectuar el ciclo.

5 Las válvulas de selección giratorias esterilizables, desechables, accionadas por el actuador 90 se muestran en detalle en las Figuras 13 - 14C. La válvula 90 comprende un alojamiento de válvula 93 y una leva de válvula 94. El tubo de elastómero (no mostrado) puede estar insertado a través de las aberturas 98 en el cuerpo de válvula 92 y es ocluido por una leva giratoria 94 que comprime el tubo contra el cuerpo de la válvula. Esto se consigue mediante el uso de un servomotor 96, incremental, controlado (actuador y bucle de realimentación de posición) para mover la leva cilíndrica que reacciona contra el cuerpo de válvula inmóvil 92 que mantiene el tubo en un estado restringido. El diseño de la leva permite que una zona alta de la leva 104 ocluya el tubo y que una zona baja de la leva 106 no se cierre, dando como resultado una condición cerrada y abierta, respectivamente. Las características de posicionamiento giratorio de la leva pueden ser añadidas también para mover la leva 94 a posiciones predeterminadas. Las configuraciones pueden estar estructuradas para que reciban múltiples segmentos de tubería en un dispositivo. El diseño de dos piezas permite que la porción de contacto de fluido de la válvula sea moldeada en el panel trasero 148 (Figura 19) como un cubo 156 y que sea esterilizada (con EtO, químicamente o con radiación) con el resto del circuito de fluido y de esta manera se elimina la necesidad de ser añadida por separado.

El diseño de esta abrazadera está destinado a ser usado en una aplicación de cultivo celular automatizada donde un módulo desechable de material de cultivo hace de interfaz de un instrumento electromecánico. La unidad combinada debe ser automatizada, lo que requiere que varias líneas de tubos desechables estén ocluidas/abiertas para proporcionar un control automatizado del proceso. La válvula de selección es usada para abrir y cerrar automáticamente los tubos para dirigir el flujo del fluido o gas durante el control del proceso. Minimizar la configuración del operador es también un requisito. El material de cultivo desechable debe ser insertado en el instrumento en una posición operativa sin que se requieran procedimientos especiales por parte del operador para cargar el tubo en las abrazaderas. Las tecnologías existentes no cumplían estos requisitos, porque las abrazaderas manuales no estaban automatizadas y las válvulas de solenoide requerían un procedimiento especial de carga por parte del operador.

En el sistema de cultivo celular de la invención presente, el camino del fluido debe estar libre de organismos no deseados (esterilizado). Las válvulas selectoras disponibles comercialmente no son esterilizables mediante gas. Las superficies de sellado de la posición seleccionada pueden no estar expuestas al esterilizante de gas y estas superficies pueden ser "no estériles" cuando la válvula es reposicionada. La válvula 90 proporciona un accionamiento automatizado de la leva, compacidad, múltiples líneas, mantiene la posición de la válvula incluso en un caso de pérdida de energía del actuador, el cuerpo de la válvula desechable es menos costoso que una válvula de conmutación equivalente y puede estar incorporado al panel trasero del módulo 12. El posicionamiento de la leva ocluida/abierta de desviación de dos líneas de tubos puede asegurar un cambio de fluidos antes de la interrupción. No se requiere energía para mantener ninguna posición de operación, y los segmentos de los tubos utilizados en el cuerpo de la válvula pueden estar esterilizados.

Debe tenerse en cuenta que puede ser usado un mecanismo de restricción accionado por solenoide en lugar de la válvula del actuador. Esta aplicación puede utilizar un émbolo de pistón accionado por una bobina eléctrica para proporcionar un movimiento lineal para restringir el tubo. Se puede usar también una abrazadera de restricción manual. La posición de fijación es activada manualmente mediante una superficie de apoyo mecánica que comprime el tubo y a continuación es mantenida mediante una función de retención. Este tipo de abrazadera requiere una desactivación manual. Se puede usar también una membrana sobre la serie de puertos. La membrana es accionada contra el puerto para sellarlo. Múltiples puertos están configurados para su uso como mecanismo de selección.

Las Figuras 15A - 15C describen una abrazadera deslizante de tubo accionada por actuador 110 con múltiples posiciones y se pueden usar múltiples tubos como alternativa a las válvulas 90. El tubo de elastómero es ocluido deslizando la tubería en una ranura estrecha 112 que comprime la pared del tubo contra sí misma. Esto se realiza mediante el uso de un servomotor (actuador y bucle de realimentación de posición) para mover una placa 110 con la ranura 112 en ella y reaccionar contra otra placa o cuerpo deslizante 114 que mantiene el tubo en un estado inmóvil. La placa móvil está diseñada con ranuras de ancho variable para permitir que la posición/posiciones estén inactivas. Esto permite abrir normalmente las posiciones 116 o 118 y cerrar normalmente la posición 117. Las configuraciones pueden ser estructuradas para recibir múltiples segmentos de tubos en una abrazadera.

En operación, la corredera 110 está situada en el cuerpo de la corredera 114. El tubo es insertado a través de los puertos 108 del tubo y de la corredera 110 en la posición 116 donde ambos tubos no están ocluidos. Un servo remoto (no mostrado) es aplicado a la ranura 102 de la unidad del servidor y mueve la corredera a la posición 117 donde un tubo está ocluido y un tubo no está ocluido. El servo remoto mueve entonces la corredera a la posición 118 donde el tubo ocluido del paso anterior no estaba ocluido, y el tubo del tubo no ocluido del paso anterior está ahora ocluido. Al mover la corredera de la posición 117 a la posición 118, ambos tubos están ocluidos para asegurar que un tubo esté ocluido antes de que se abra el otro tubo. Deberá entenderse que el número de tubos y la configuración de la corredera pueden ser modificados para cumplir con las aplicaciones particulares.

La abrazadera está diseñada para ser usada en una aplicación de cultivo celular automatizada donde un módulo desechable de material de cultivo interactúa con un instrumento electromecánico. La unidad combinada debe estar automatizada, lo que requiere que varias líneas de tubos desechables estén ocluidas/abiertas para proporcionar un control automatizado del proceso. Durante el control del proceso, las abrazaderas se abren/cierran para simular la función de una costosa válvula de conmutación "desechable". Minimizar la configuración del operador es también un requisito. El material de cultivo desechable debe ser insertado en el instrumento en una posición operativa sin que se requieran procedimientos especiales por parte del operador para cargar el tubo en las abrazaderas. Esto proporciona un accionamiento automatizado de la abrazadera deslizante, compacidad, múltiples líneas, mantiene la posición de la abrazadera incluso en caso de pérdida de energía del actuador y es menos costoso que una válvula de conmutación equivalente. La posición ocluida/abierta desviada de dos líneas de tubos puede asegurar un cambio de fluidos antes de la interrupción. No se requiere energía para mantener ninguna posición operativa.

Según se ha descrito anteriormente, la zona fría de almacenamiento integrada 18 mantiene los factores de crecimiento y las células o productos celulares cosechados a baja temperatura (aproximadamente a 4°C). Haciendo referencia a las Figuras 2 y 16, un bastidor 120 está dispuesto de manera retirable dentro de la zona fría de almacenamiento 18. El bastidor 120 está diseñado para soportar una pluralidad de bolsas 122, 124. Las bolsas son usadas para contener las cantidades más pequeñas del producto o los factores de crecimiento. Deberá entenderse que se pueden disponer otras soluciones para las bolsas. Por ejemplo, el factor de crecimiento de alto peso molecular puede estar situado en la bolsa 122. Este factor está conectado por medio del tubo 128 al biorreactor o cámara de crecimiento celular 20 y el flujo está controlado por la bomba 16. Las células cosechadas o los productos celulares pueden ser almacenados en la bolsa 124. Un filtro celular 126 está dispuesto para proporcionar una filtración adicional. Hay dispuesta una línea de derivación (*bypass*) del filtro si no se desea el filtrado de la cosecha, como en el caso de la recogida de células. Una vez que se ha completado el proceso, las células pueden ser retiradas de la cámara de cultivo celular por medio del tubo y ser almacenadas en la bolsa 124 hasta ser usadas.

Según se muestra en las Figuras 17 - 19, el módulo de material de cultivo desechable 12 incluye la unidad cíclica de fluido 40 para mantener los volúmenes de fluido y el ciclo en la cámara de crecimiento celular. Haciendo referencia a las Figuras 18 - 21, la invención presente utiliza ciclos extracapilares (EC) en la cámara de crecimiento de cultivo celular 20 (Figura 17) que utiliza un depósito 130 EC no rígido y un segundo depósito 132 mecánico o flexible para causar una presión EC elevada. Los depósitos 130, 132 están separados por una placa de detector 134. Los depósitos 130, 132 tienen restringida la cantidad máxima de expansión mediante un alojamiento mecánico rígido 136. El ciclo EC se consigue utilizando un depósito no rígido para retener el volumen variable de fluido asociado a un circuito EC. El depósito flexible 130 está conectado de manera fluida al biorreactor o dispositivo de fibra hueca 20. El segundo depósito flexible 132 está presurizado para aplicar fuerza contra el depósito flexible 130 para proporcionar una presión EC elevada para causar una condición ultrafiltradora y forzar el fluido hacia un circuito intracapilar (IC) 138. Un indicador mecánico de posición de realimentación 140 está físicamente conectado a la placa del detector 134 y se mueve con la expansión y contracción física del primer depósito flexible. La posición del indicador 140 es detectada por los detectores de posición 32 y es usada para controlar la fuerza que aplica el segundo depósito flexible 132. Debe tenerse en cuenta que se puede usar un aparato de fuerza mecánica alternativo en lugar de un segundo depósito flexible para causar cambios de presión.

Durante la operación, la presión aumenta en el circuito IC 138 al presurizar un depósito IC 137. Esta presión causa una condición ultrafiltradora que fuerza al fluido transmembranal a través de la matriz semipermeable del biorreactor 20. El fluido es forzado a continuación a través del tubo de conexión, a través de una válvula de control de flujo 133 y dentro del depósito EC 130. La presión en el depósito de presión 132 controlada exteriormente puede ser ventilada. El depósito 130 de expansión EC impulsa la placa del detector 134 hacia el depósito de presión 132 y lo comprime. La placa del detector 134 mueve la bandera de posición exterior 140 y esto es detectado cuando el depósito EC 130 se ha llenado lo suficiente para expandirse al nivel superior EC. El detector de posición exterior 32 detecta esta posición y la presión en el depósito IC 137 disminuye, y la presión en el depósito de presión 132 aumenta. Esto causa una condición ultrafiltradora e impulsa el fluido fuera del depósito EC a través de una válvula de control 135, transmembranal a través de la matriz del biorreactor 20 y dentro del circuito IC 138. La placa del detector 134 mueve la bandera de posición exterior 140 y el detector 32 detecta cuando el depósito EC 130 se ha contraído al nivel bajo EC.

La unidad cíclica EC ofrece una dinámica del fluido para causar el flujo del fluido en el espacio EC, minimizando así los gradientes de nutrientes y desechos metabólicos que pueden ser perjudiciales para las células. Esto proporciona un control del nivel del fluido sin el uso de ultrasonidos o células de carga que no está afectado por los desechos celulares. Los depósitos flexibles son considerablemente menos costosos y son adecuados para aplicaciones desechables. El depósito EC sellado con el ciclo limita además la contaminación y aísla las células.

Se describe un método para el cultivo de perfusión usando la detección de CO₂ y el pH. El método predice el sistema abierto, el cultivo de perfusión, los niveles de lactato en el medio circulatorio mediante la monitorización del pH y el nivel de CO₂ sin gases. Esto se consigue calculando el nivel inicial de bicarbonato de los medios y a continuación utilizando el pH del líquido y el nivel de gas del CO₂ para calcular la concentración en curso de lactato. Esto es usado para controlar la velocidad de dilución de los medios del cultivo celular. El valor del lactato calculado resultante es usado para establecer la velocidad de perfusión de la dilución de los medios para mantener un nivel de lactato predeterminado. Por tanto, no se requiere un sistema de detección invasivo o de muestreo múltiple fuera de línea.

Existe una relación física entre el tampón de bicarbonato, dCO_2 y pH.

Ecuación (1):

$$pH = pK + \log ([HCO_3^-]/dCO_2)$$

donde:

5 pH = el pH de la solución

pK = la constante de ionización ácida del bicarbonato

HCO_3^- = la concentración en curso de bicarbonato (mM)

dCO_2 = la concentración del CO_2 disuelto

10 La producción de ácido láctico por las células parece ser la fuerza impulsora dominante de los cambios de pH en los medios de cultivo celular. Basándose en esta observación, cada mol de ácido láctico producido causa el consumo de un mol de bicarbonato según se describe en la ecuación siguiente:

Ecuación (2)

$$[HCO_3^-] = [HCO_3^-]_0 - [Lactato]$$

donde:

15 $[HCO_3^-]_0$ = la concentración inicial de bicarbonato en el medio (mM)

Lactato = la concentración de lactato (mM)

La ecuación (3) proporciona una relación simple: la Ley de Henry, que el equilibrio dCO_2 es proporcional a la concentración de CO_2 en la fase gaseosa.

Ecuación (3):

20 $dCO_2 = a(\%CO_2)$

donde:

a = conversión de solubilidad del CO_2 (mM/%)

$\%CO_2$ = concentración de CO_2 en la fase gaseosa que está en equilibrio con la dCO_2 (%).

La ecuación (4) es derivada sustituyendo la ecuación 2 en la ecuación 1 de la siguiente manera:

25 Ecuación (4)

$$pH = pK + \log \{([HCO_3^-]_0 - [Lactato]) / [dCO_2]\}$$

La ecuación 5 se obtiene combinando las ecuaciones 3 y 4:

Ecuación (5)

$$pH = pK + \log \{([HCO_3^-]_0 - [Lactato]) / [a(\%CO_2)]\}$$

30 La ecuación operativa, ecuación (6) es derivada resolviendo para el lactato en la ecuación (5):

Ecuación (6):

$$Lactato = [HCO_3^-]_0 - (a) * (\%CO_2) * 10^{(pH-pK)}$$

Se encontró que los valores de pK y (a) eran 6,38 y 0,39, respectivamente.

35 Al tomar una lectura del lactato y del pH, se calcula el valor de (a). La concentración inicial de bicarbonato es calculada como la constante de calibración. La ventaja es que no es necesario conocer la concentración de bicarbonato cuando se usa el método de calibración presente.

40 La aplicación se muestra en la Figura 22. En un bucle de perfusión del biorreactor, el medio de crecimiento es bombeado desde un depósito de IC 137 a través de la bomba 34, 164, hecho circular al cartucho de intercambio de gases (GEX) 24, detector de pH 26, biorreactor 20, y a continuación vuelve al depósito 137.137. Los gases mezclados son pasados a través del cartucho de membrana de intercambio de gases que oxigena los medios y regula el CO_2 . Según la Ley de Henry, los niveles de CO_2 en la fase gaseosa o en el lado al aire del GEX 24 están en equilibrio con

la fase líquida de los medios. El extremo de descarga del GEX es monitorizado mediante un detector de CO₂ 142 que reside en el dispositivo 14 y el lactato es calculado según la ecuación (6). Cuando el nivel de lactato de los medios es conocido, el instrumento usa un control automático de dilución de medios para mantener el punto de ajuste predeterminado.

- 5 La utilización de la invención reduce los materiales y la mano de obra asociados a las pruebas recurrentes fuera de línea. La utilización de la invención permite el ajuste continuo de la velocidad de dilución que de otra manera sería ineficiente y costosa si se usaran incrementos de pasos como en tecnologías anteriores.

La utilización de la invención presente aumenta la previsibilidad de los cultivos metabólicos de células. Permite que un sistema de cultivo celular de perfusión tenga un mayor nivel de automatización.

- 10 Se describe ahora un enfoque para la detección del pH en un sistema de cultivo celular. Haciendo referencia de nuevo a las Figuras 2, 18 y 19, la sonda de pH 26 y un soporte están integrados en el cultivo celular desechable 12, por tanto, no se requiere que el usuario añada la sonda al material de cultivo. La sonda 26 está destinada a ser un dispositivo de un solo uso que es desechada con el material de cultivo. La sonda es desechada con los utensilios de cultivo usados, no se gasta tiempo recuperando la sonda para su limpieza, revalidación y reutilización.

- 15 Durante la operación, la sonda 26, por ejemplo, un electrodo lleno de gel sólido está montada sobre un soporte 28 (Figura 23) a través del que fluyen los medios a ser detectados. El electrodo del soporte está conectado de manera fluida al circuito de material de cultivo, montado en el módulo de material de cultivo, se comprueba la integridad del circuito de fluido y se esteriliza con el material de cultivo completo (óxido de etileno, EtO). Después de la esterilización, se realizan controles de calidad del proceso de EtO para proporcionar una alta fiabilidad a la esterilización. Cuando un operador desea cultivar células, el material de cultivo es retirado de la bolsa, es cargado en el instrumento y se introduce fluido en el material de cultivo. Se da un período de tiempo para rehidratar el electrodo. El material de cultivo es llevado a condiciones operativas, el electrodo es calibrado y es usado a continuación para controlar el pH del material de cultivo. Cuando se completa el cultivo celular, el operador desecha el material de cultivo y la sonda. Aunque la sonda ha sido descrita como un electrodo de gel sólido, se podrían usar otros tipos de sonda (por ejemplo, un ISFET, matriz de fenol inmovilizado, relleno de líquido, fluorescencia, etc.).

- Haciendo referencia al diagrama de flujo de la Figura 23, la bomba 16 mueve los medios basales recientes al material de cultivo en la línea de medios 210. La línea de medios 210 está conectada a un recipiente de medios recientes facilitado por el usuario para proporcionar los nutrientes de crecimiento al cultivo celular que son bombeados al depósito de desecho. La línea de flujo de salida 214 está conectada a un recipiente facilitado por el usuario para recoger los desechos o los medios gastados que son bombeados fuera del depósito de desecho. La línea de factores 212 está conectada a un recipiente facilitado por el usuario de factores de crecimiento que son bombeados al depósito de desecho. Se puede añadir el inoculado a 220 y la muestra de IC a 216. La cosecha del producto es retirada en 126. Las células son cosechadas en 218. La línea de cosecha 218 es un recipiente prefijado que es parte del recipiente de desecho que es utilizado para recoger el producto bombeado fuera del depósito de desecho. La bomba 16 tiene múltiples líneas 210, 214, 212 y 126. Debido a que la bomba de la invención presente tiene un eje axial fijo común y rotores individuales accionados por servo, el control del flujo de cada uno puede ser independiente, permitiendo que un canal o flujo sea aumentado mientras que otro sea disminuido.

- Según se muestra en la Figura 25, un biorreactor 170 que tiene un cuerpo exterior flexible 172 permite el movimiento físico del sustrato de crecimiento celular (fibras huecas, membrana u otra matriz adecuada) cuando es aplicado un momento de torsión o flexión resultante a los extremos del biorreactor. El cuerpo exterior flexible 172 permite que la caja del biorreactor sea doblada causando el movimiento de la fibra. Este movimiento de la fibra mejora la liberación de las células que se han fijado al lado de la matriz del biorreactor. Las células pueden entonces ser cosechadas por descarga después de o durante la manipulación. Este método puede proporcionar una mayor eficiencia de la cosecha celular con grandes viabilidades celulares sin el uso de aditivos de liberación química o enzimática.

- 45 Se puede construir un biorreactor usando un alojamiento exterior que incorpora una sección central flexible. Esta sección central consiste en un tubo flexible no permeable que permite que cada extremo del biorreactor sea manipulado, lo que causa el movimiento de la matriz de crecimiento. El propósito de este movimiento es liberar la fijación o aglomeración de productos celulares en el lado extracapilar (EC) de las fibras. Los productos celulares pueden entonces ser descargados del lado EC por medio del puerto de acceso a cada extremo del biorreactor.

- 50 La cosecha de células de un biorreactor que contiene una matriz tal como un biorreactor de fibra hueca ha sido difícil de conseguir. Por lo general, las células son pegajosas y se adhieren a las fibras o a otras células y forman grumos. La descarga rápida de los medios a través de la EC para forzar hidráulicamente a las células a liberarse y a pasar al chorro de la cosecha es el método más básico para cosechar células a partir del espacio EC. Típicamente, la cantidad de células cosechadas es baja porque los medios de descarga tienden a impulsarlas a través del espacio EC y a descargar células solo del limitado recorrido del fluido.

Otro método es sacudir físicamente o golpear la cubierta exterior para liberar las células o los grupos de células. Esta práctica puede causar daños físicos al biorreactor o a sus componentes asociados. Otro método incluye el uso de productos químicos para interrumpir la adhesión de las células a las fibras o para romper los grumos de células. Añadir

productos químicos a un proceso controlado puede causar efectos adversos a la viabilidad celular y puede introducir un agente no deseado en el tratamiento de aguas abajo.

Haciendo referencia a las Figuras 26 - 31, varias vistas de la pantalla táctil ilustran los diferentes pasos interactivos durante el proceso de control del sistema de la invención presente. La Figura 26 muestra una pantalla de descripción general del sistema que resalta las condiciones en curso. La Figura 27 ilustra una pantalla de secuencia de ejecución que dirige al operador a través del proceso de cultivo. La Figura 28 ilustra datos de registro que el operador puede revisar y que están disponibles para construir el registro por lotes. La Figura 29 muestra un método para introducir datos alfanuméricos. Las Figuras 30 y 31 muestran pantallas de operador interactivas para ayudar al operador en las operaciones (adición de factor y calibración de la sonda de pH). Las pantallas de asistencia en línea ayudan al operador a operar correctamente.

Algunos ejemplos para los que se puede usar el sistema de la invención presente son:

- La producción de anticuerpos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma.

- La expansión de las células sanguíneas autólogas derivadas del paciente, incluidas las células inmunes para la aplicación terapéutica.

- La expansión de las células somáticas derivadas del paciente para la reinfusión posterior a los pacientes con fines terapéuticos. Un ejemplo específico ya disponible para la aplicación terapéutica a los pacientes es la cosecha y expansión de células de cartílago específicas (condrocitos) del paciente, seguido de la reinfusión de estas células. De nuevo en una región que contiene cartílago articular dañado.

- La expansión de células multipotentes genéricas o derivadas del paciente, incluidas células madre embrionarias, células madre adultas, células madre hematopoyéticas o células progenitoras, células múltiples o pluripotentes derivadas de la sangre del cordón umbilical con fines terapéuticos.

- La expansión de las células somáticas o de la línea germinal como en las aplicaciones 2, 3 y 4 en las que las células han sido genéticamente modificadas para expresar componentes celulares novedosos o para conferirles otras propiedades beneficiosas tales como receptores novedosos, características de crecimiento alteradas o características genéticas, seguidas de la introducción de las células en un paciente para beneficio terapéutico. Un ejemplo es la expansión de fibroblastos específicos del paciente genéticamente modificados para expresar factores de crecimiento, factores de coagulación u otros agentes biológicamente activos para corregir las deficiencias heredadas o adquiridas de dichos factores.

En la actualidad, el sistema de la invención presente integra completamente el concepto de material de cultivo desechable en el control del proceso automatizado para mantener y expandir líneas celulares especializadas (autólogas u otras) durante un período de tiempo necesario. Para lograr esto, el sistema de la invención presente ha sido diseñado para el flujo de fluido espacial EC que mejora el crecimiento celular en el cultivo de perfusión de alta densidad, sin embargo permanece completamente cerrado y desechable. El material de cultivo integrado previamente ensamblado, que se compone de todos los tubos, biorreactores, oxigenador, sonda de pH, está encerrado en una sola unidad que se ajusta fácilmente al aparato. Además de este diseño de carga rápida a prueba de errores, toda la unidad de material de cultivo incluida en la cubierta se convierte en la incubadora de cultivo celular con control de temperatura regulado por medio del control de proceso automatizado del instrumento. Las bombas y las válvulas de control de fluidos facilitan la disponibilidad y la instalación a prueba de errores, eliminando la posibilidad de errores técnicos. Finalmente, durante el curso de cualquier cultivo, el sistema cerrado tiene un acceso restringido excepto para el personal capacitado y autorizado. Las manipulaciones o muestreos, fuera de los parámetros del programa, requieren una contraseña y acceso al código de barras antes de que puedan ser implementadas.

Cada línea celular única debe ser cultivada, las secreciones celulares deben ser cosechadas y purificadas por separado. Para gestionar una gran cantidad de líneas celulares únicas como, por ejemplo, puede ser necesario para la producción de una gran cantidad de productos terapéuticos de células autólogas o de una gran cantidad de anticuerpos monoclonales únicos, se necesita una cantidad considerable de instrumentos. La compactación del diseño y la cantidad de recursos auxiliares de soporte necesarios se convierten en un problema importante de las instalaciones. Los sistemas con un depósito de agitación pequeño requieren un medio de generación y distribución de vapor (para la esterilización del vapor en el sitio) o autoclaves para esterilizar los recipientes y dar soporte a los tubos. Dar soporte a un gran número de unidades se convierte en un problema logístico para la instalación. El sistema de la invención presente no tiene dicho requisito. El cultivo celular a mayor escala se realiza históricamente en pasos segregados que con frecuencia requieren tipos de equipos separados. El manejo manual, el almacenamiento y el seguimiento son necesarios para todos estos pasos conforme el cultivo se va expandiendo y el producto es cosechado. El método de la invención presente integra estos pasos en un proceso secuencial continuo, totalmente integrado. Esto elimina el riesgo del manejo y facilita la recopilación de datos necesarios para una documentación exhaustiva de todo el proceso.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de cultivo celular para la producción de células y productos derivados de células comprendiendo:

un dispositivo de base de instrumentación reutilizable (14) que incorpora hardware para dar soporte al crecimiento del cultivo celular;

5 al menos un módulo desechable de material de cultivo celular (12) que se puede fijar de manera retirable a dicho dispositivo de base de instrumentación (14), incluyendo dicho módulo (12) una cámara de crecimiento celular (20) que tiene una matriz adecuada para el crecimiento celular;

10 en donde dicho dispositivo de base de instrumentación (14) incluye una bomba peristáltica multicanal (16) para mover fluidos dentro y fuera de dicho al menos un módulo de material de cultivo (12), en donde dicha bomba peristáltica multicanal (16) tiene un control de salida discreto y variable para cada canal, y en donde dicho al menos un módulo de material de cultivo (12) comprende además un casete de bomba (70), en donde dicho casete de bomba (70) está estructurado para mantener múltiples segmentos de tubo peristáltico (72), y en donde dicho casete de bomba (70) es insertable en una interfaz (82) en dicho dispositivo de base de instrumentación (14) y permite que dichos segmentos de tubo sean cargados en dicha bomba peristáltica multicanal en dicho dispositivo de base de instrumentación (14) al mismo tiempo.

20 2. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 1 comprendiendo además una línea de medios (210), para proporcionar un medio de cultivo celular a dicha cámara de crecimiento celular (20); una línea de cosecha, para transportar células o productos derivados de células desde dicha cámara de crecimiento celular (20) y fuera de dicho módulo de material de cultivo celular (12); y una línea de flujo de salida (214), para transportar residuos o medios gastados desde dicha cámara de crecimiento celular (20).

25 3. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el hardware de dicho dispositivo de instrumentación (14) incluye una bomba (16) que bombea medio de cultivo celular a dicha cámara de crecimiento celular (20) a través de dicha línea de medios (210), células o productos derivados de células de dicha cámara de crecimiento celular (20) a través de dicha línea de cosecha, y residuos o medios gastados de dicha cámara de crecimiento celular (20) a través de dicha línea de flujo de salida (214).

30 4. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 3, en donde dicho al menos un módulo de material de cultivo celular desechable (12) tiene una pluralidad de interfaces mecánicas y eléctricos, de manera que cuando dicho módulo de material de cultivo (12) está dispuesto en dicho dispositivo de base de instrumentación (14) dicha pluralidad de interfaces mecánicas y eléctricos de dicho módulo de material de cultivo (12) está acoplada con dicho hardware de dicho dispositivo de instrumentación (14).

35 5. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 4, en donde el hardware de dicho dispositivo de instrumentación (14) incluye una bomba (16) que bombea un medio de cultivo celular a dicha cámara de crecimiento celular (20) a través de dicha línea de medios (210), células o productos de células derivados de dicha cámara de crecimiento celular (20) a través de dicha línea de cosecha, y medios de desecho o gastados de dicha cámara de crecimiento celular (20) a través de dicha línea de salida (214); y en donde dicha pluralidad de interfaces mecánicas y eléctricos incluye una conexión de bomba (164) dispuesta en dicho módulo de material de cultivo (12), de manera que cuando dicho módulo de material de cultivo (12) está dispuesto en dicho dispositivo de instrumentación (14), dicha bomba (16) y la conexión de la bomba (164) están alineados y conectados.

40 6. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 3, en donde dicha bomba (16) es una bomba peristáltica multicanal que tiene un control variable de la salida de cada canal.

7. El cultivo celular de la reivindicación 6, en donde dicha bomba (16) tiene rotores de bomba (62A - 62D) en un eje axial fijo común (64), en donde cada uno de dichos rotores de bomba (62A - 62D) es accionado por una unidad de servo separada para habilitar el control variable individual de cada canal.

45 8. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho dispositivo de instrumentación incluye una zona fría de almacenamiento (18) que tiene un recipiente de cosecha para recoger células o productos derivados de células de la línea de cosecha.

9. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 3, en donde dicho al menos un módulo de material de cultivo incluye detectores para detectar la velocidad de circulación del fluido (46), la temperatura (44) y el pH (26) del medio de cultivo celular.

50 10. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 6, en donde dicho al menos un módulo desechable de material de cultivo celular (12) comprende además un casete de bomba multicanal (70) con tubo peristáltico precargado (72), en donde dicho casete (70) hace de interfaz con dicha bomba peristáltica multicanal.

11. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 10, en donde dicho casete de bomba multicanal (70) tiene una pluralidad de secciones (71), en donde cada una de dichas secciones de casete (71) recibe una longitud del tubo y se comunica con un canal respectivo (60) de dicho dispositivo de instrumentación (14).
- 5 12. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 11, en donde dicho dispositivo de instrumentación (14) incluye una pluralidad de dichos canales (60), con rotores de bomba correspondientes (62A - 62D) y rotores de oclusión (66A - 66D), en donde cada uno de dichos casetes las secciones (71) incluye una característica de aprisionamiento (76) para mantener y evitar que el segmento de tubo sea arrastrado durante la operación, y en donde cada una de dichas secciones de casete (71) es recibida en uno de dicha pluralidad de canales (60) cuando dicho casete de bomba multicanal (70) es insertado en una interfaz (82) en dicho dispositivo de instrumentación (14).
- 10 13. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, comprendiendo además una línea de factor (212), para proporcionar factores de crecimiento u otros suplementos a dicha cámara de crecimiento celular (20).
- 15 14. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 13, en donde dicho dispositivo de instrumentación (14) incluye una bomba (16) que bombea un medio de cultivo celular a dicha cámara de crecimiento celular (20) a través de dicha línea de medios (210), células o productos derivados de células de dicha cámara de crecimiento celular (20) a través de dicha línea de cosecha, residuos o medios gastados de dicha cámara de crecimiento celular (20) a través de dicha línea de salida (214), y factores de crecimiento u otros suplementos a dicha cámara de crecimiento celular (20) a través de dicha línea de factor (212).
- 20 15. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 14, en donde dicho dispositivo de instrumentación (14) incluye una zona fría de almacenamiento (18) que tiene un recipiente para recoger células o productos derivados de células de la línea de cosecha y un recipiente para proporcionar factores de crecimiento u otros suplementos a dicha cámara de crecimiento celular (20) a través de dicha línea de factor (212).
- 25 16. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho dispositivo de instrumentación (14) incluye una pluralidad de válvulas de selección giratorias (90) para llevar a cabo funciones de conmutación de fluido y controlar el flujo a través de dicha línea de cosecha, de dicha cámara de crecimiento celular (20) y de una línea de factor (212).
- 30 17. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 16, en donde cada una de dichas válvulas de selección giratoria (90) incluye un alojamiento de válvula (93) y un cuerpo de válvula (92) con aberturas (98) para recibir tubos a través de ellas, en donde dichos tubos son ocluidos por una leva giratoria (94) que comprime los tubos contra dicho cuerpo de válvula (92), y en donde dicha leva giratoria (94) tiene una zona alta (104) para ocluir los tubos y una zona baja (106) que no ocluye los tubos, lo que da como resultado una condición cerrada y abierta, respectivamente.
- 35 18. El sistema de cultivo celular de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho al menos un módulo desechable de material de cultivo (12) comprende además una unidad cíclica de fluido (40) para mantener los volúmenes de fluido y el ciclo en dicha cámara de crecimiento celular (20), comprendiendo dicha unidad cíclica de fluido (40) un primer depósito flexible extracapilar (EC) (130) conectado de manera fluida a dicha cámara de crecimiento celular (20), un segundo depósito flexible (132) para causar una presión EC elevada, una placa de detector (134) dispuesta entre dicho primer depósito EC (130) y dicho segundo depósito flexible (132), un indicador de posición de realimentación mecánico (140) conectado a dicha placa de detector (134) que se mueve con la expansión y contracción física de dicho primer depósito flexible (130), y un detector de posición (32) en comunicación con dicho indicador de posición (140), en donde cuando dicho segundo depósito flexible (132) está presurizado aplica fuerza contra dicho primer depósito flexible (130) para proporcionar una presión EC elevada que mueve el fluido hacia un circuito intracapilar (IC) (138), en donde expandir dicho segundo depósito flexible (132) impulsa a dicha placa del detector (134) hacia el primer depósito flexible (130), comprimiendo dicho primer depósito flexible (130), en donde dicha placa del detector (134) mueve dicho indicador de posición (140), que es detectado cuando dicho primer depósito flexible (130) se ha vaciado lo suficiente para comprimirse hasta el nivel inferior EC, con lo que dicho detector de posición (32) detecta esta posición y la presión en dicho segundo depósito flexible (132) disminuye y la presión en el circuito IC aumenta y el primer depósito de fluido (130) comienza a llenarse.
- 40 45 19. Un método para la producción de células y productos derivados de células en un entorno altamente controlado y libre de contaminantes comprendiendo los pasos de:
- 50 proporcionar al menos un módulo desechable de material de cultivo (12), incluyendo dicho módulo una cámara de crecimiento celular (20);
- 55 proporcionar un dispositivo de base de instrumentación reutilizable (14) que incorpora hardware para dar soporte al crecimiento del cultivo celular, incluyendo dicho dispositivo de base un control por microprocesador, una bomba peristáltica multicanal (16) para mover fluidos dentro y fuera de dicho al menos un módulo de material de cultivo (12), en donde dicha bomba peristáltica multicanal (16) tiene un control de salida discreto y variable para cada canal, y en donde dicho al menos un módulo de material de cultivo (12) comprende además un casete de bomba (70), en donde dicho casete de bomba (70) está estructurado para mantener múltiples segmentos de tubo peristáltico (72), y en donde dicho casete de bomba (70) es insertable en una interfaz (82) en dicho dispositivo de base de instrumentación (14) y

permite que dichos segmentos de tubo sean cargados en dicha bomba peristáltica multicanal en dicho dispositivo de base de instrumentación (14) al mismo tiempo;

fijar de manera retirable dicho al menos un módulo de software del material de cultivo (12) a dicho dispositivo de base de instrumentación (14);

5 introducir células en la cámara de crecimiento celular (20);

fijar de forma fluida una fuente de medio de cultivo celular a dicho al menos un módulo de material de cultivo (20);

programar parámetros operativos en el control por microprocesador;

10 operar la bomba (34) para hacer que circule el medio de cultivo celular a través de la cámara de crecimiento celular (20) para que crezcan las células y los productos derivados dentro de ella, y para bombear células crecidas o productos derivados de células de dicha cámara de crecimiento celular (20) a través de una línea de cosecha a dicho recipiente de cosecha;

cosechar las células crecidas o los productos derivados de células de dicho recipiente de cosecha; y

disponer de dicho al menos un módulo de software del material de cultivo.

15 20. El método de la reivindicación 19, en donde dicho dispositivo de base de instrumentación incluye una zona fría de almacenamiento (18) y que comprende además el paso de almacenar el recipiente de cosecha en la zona fría de almacenamiento (18).

21. El método de la reivindicación 19, en donde dicho al menos un módulo de material de cultivo incluye una pluralidad de detectores y que comprende además el paso de detectar la velocidad de circulación del fluido, la temperatura y el pH del medio de cultivo celular.

20 22. El método de la reivindicación 19, que comprende además el paso de fijar otro módulo desechable de material de cultivo después del paso de desechar dicho al menos un módulo de material de cultivo.

23. El sistema de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 18, en donde el producto derivado de la célula es un anticuerpo monoclonal de una línea celular de hibridoma.

25 24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19 - 22, en donde el producto derivado de la célula es un anticuerpo monoclonal de una línea celular de hibridoma.

25. El sistema de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 18, en donde dicha cámara de crecimiento celular (20) es un biorreactor de fibra hueca.

26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19 - 23, en donde dicha cámara de crecimiento celular (20) es un biorreactor de fibra hueca.

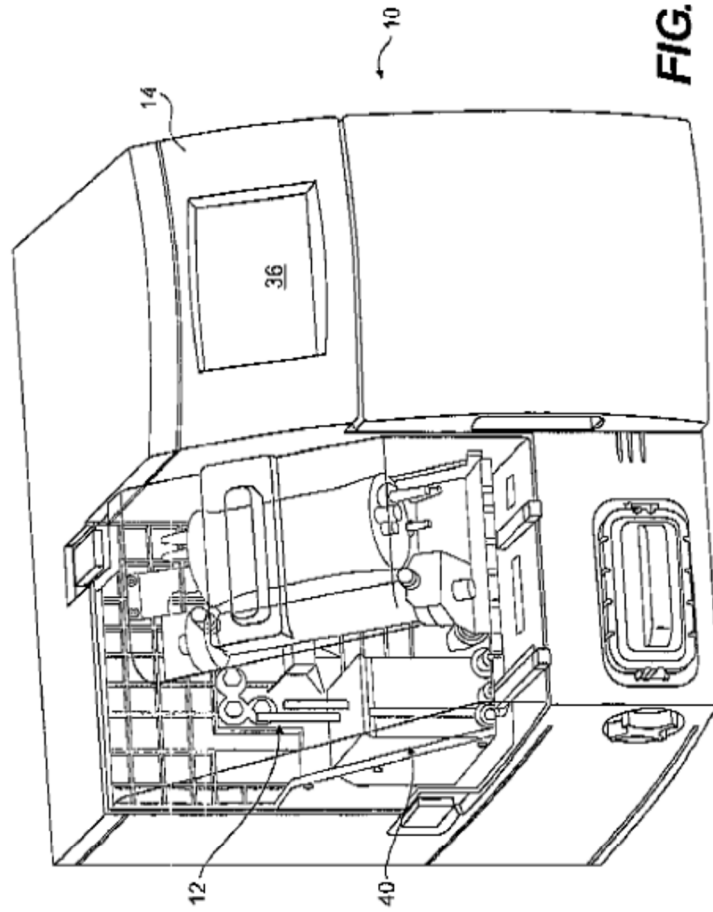
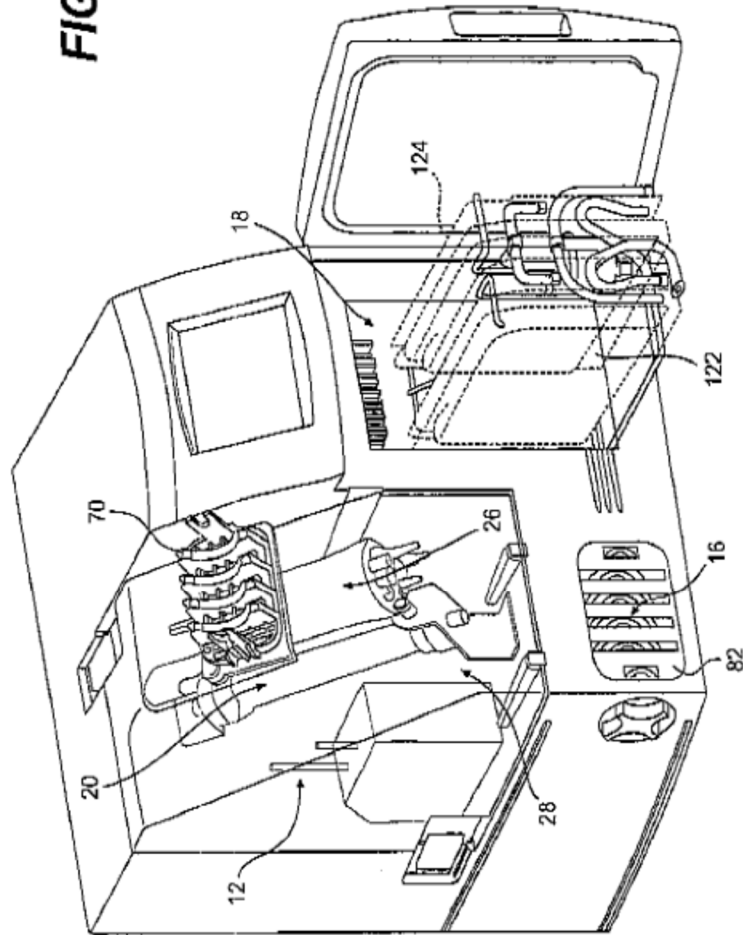


FIG. 2



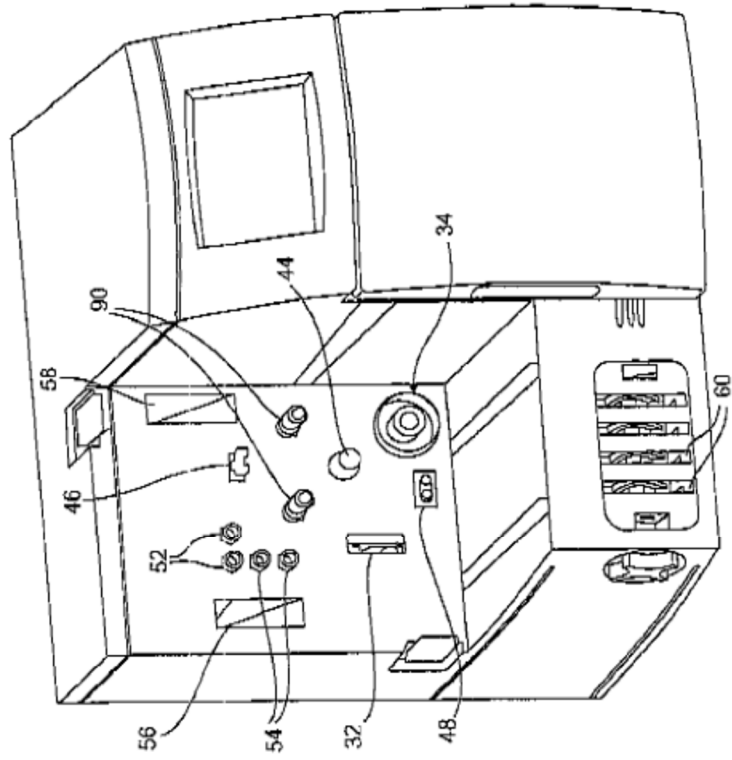


FIG. 3

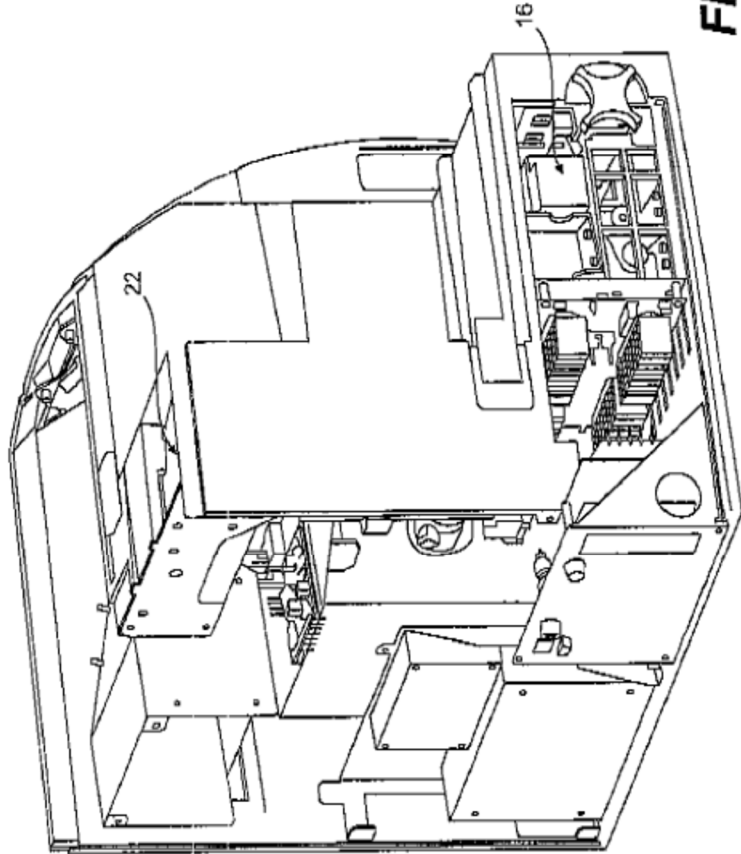


FIG. 4

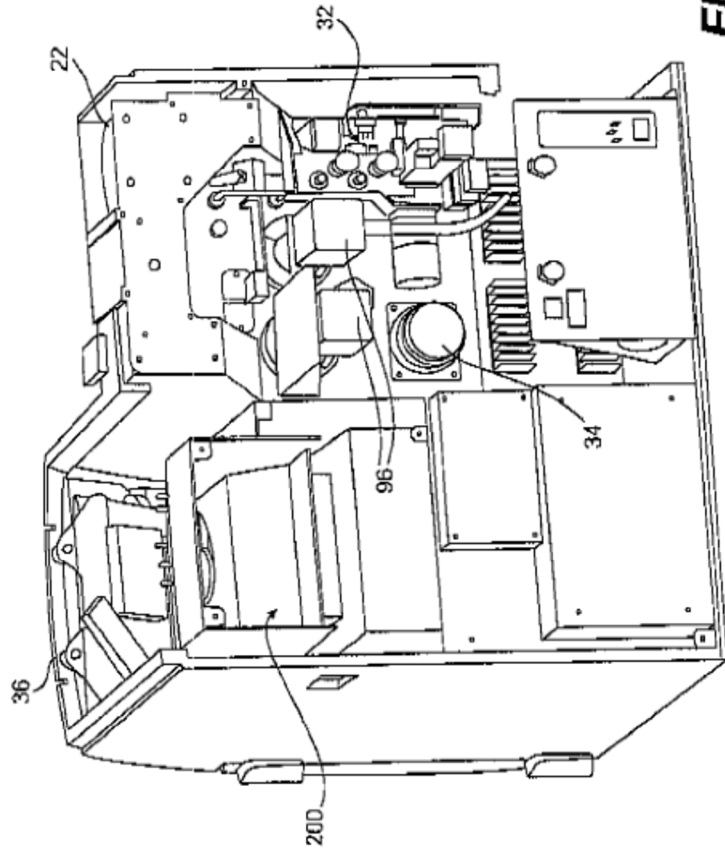


FIG. 5

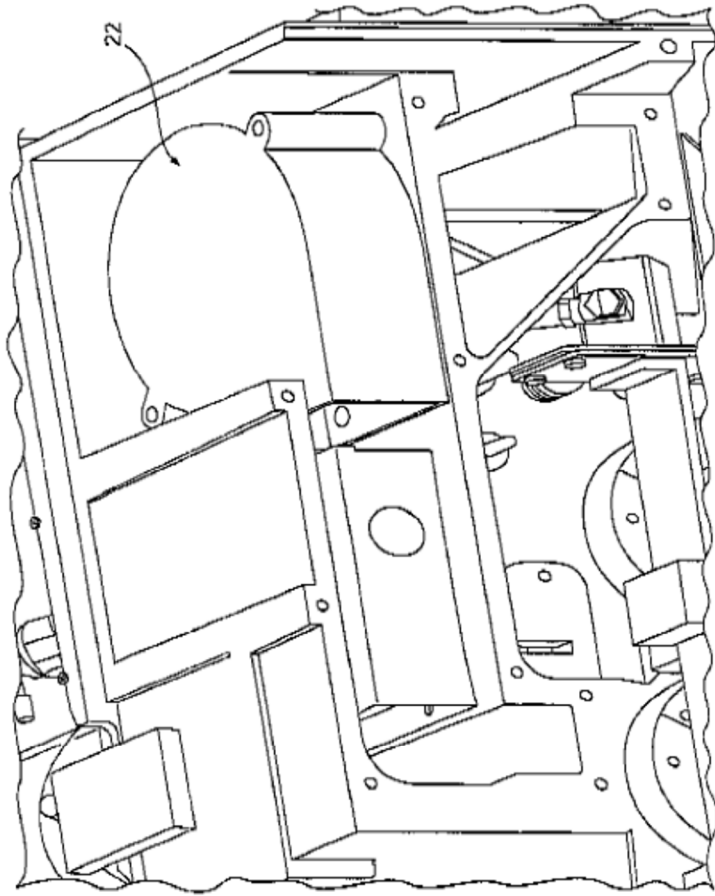


FIG. 6

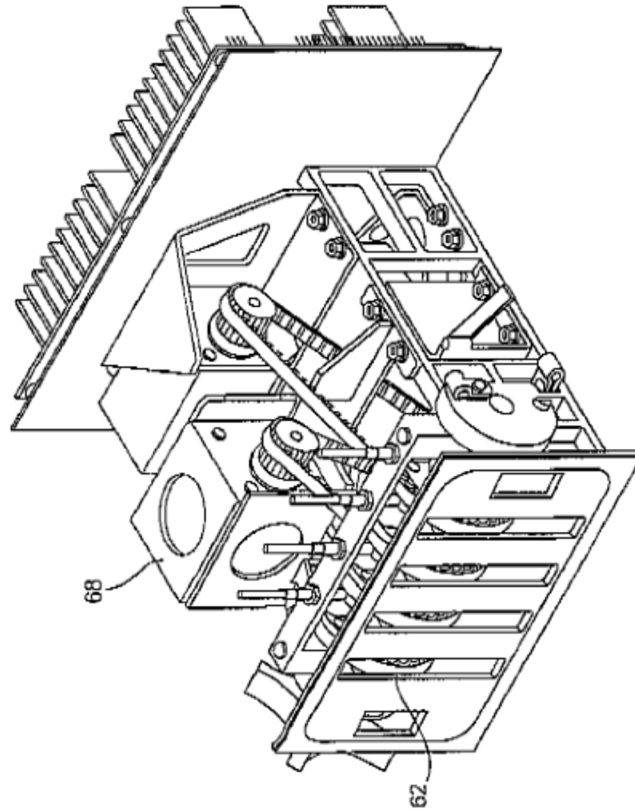


FIG. 7

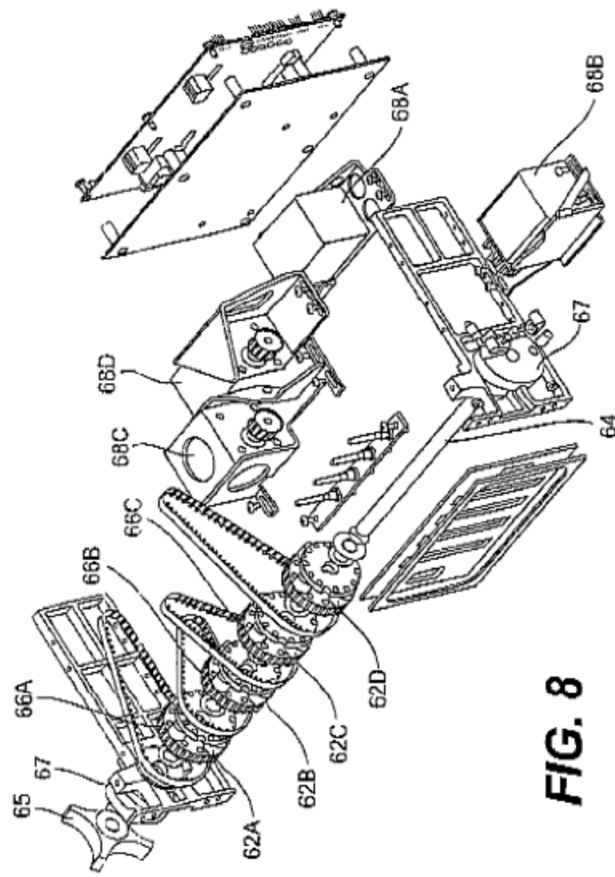


FIG. 8

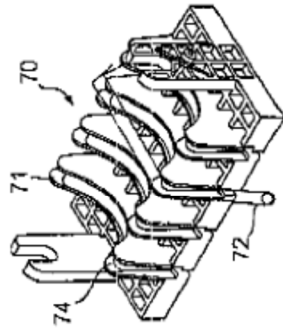


FIG. 9

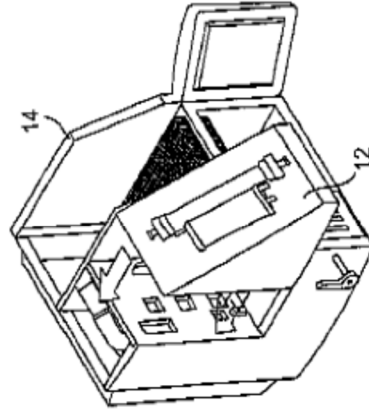


FIG. 10

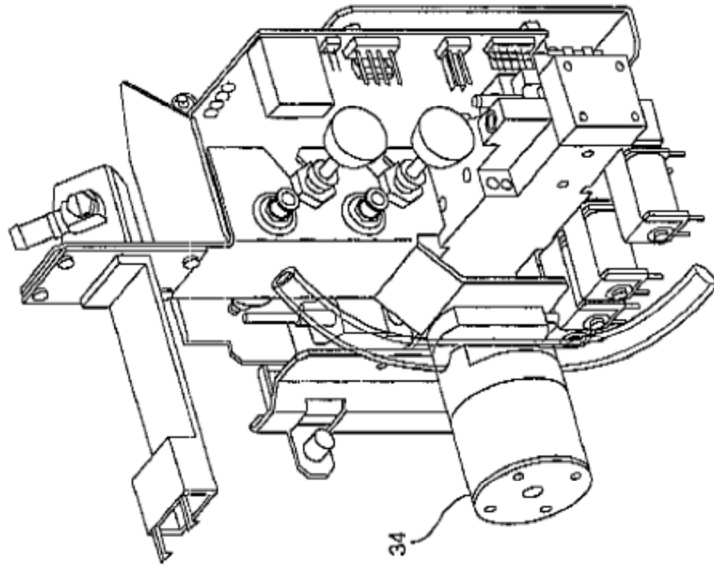


FIG. 11

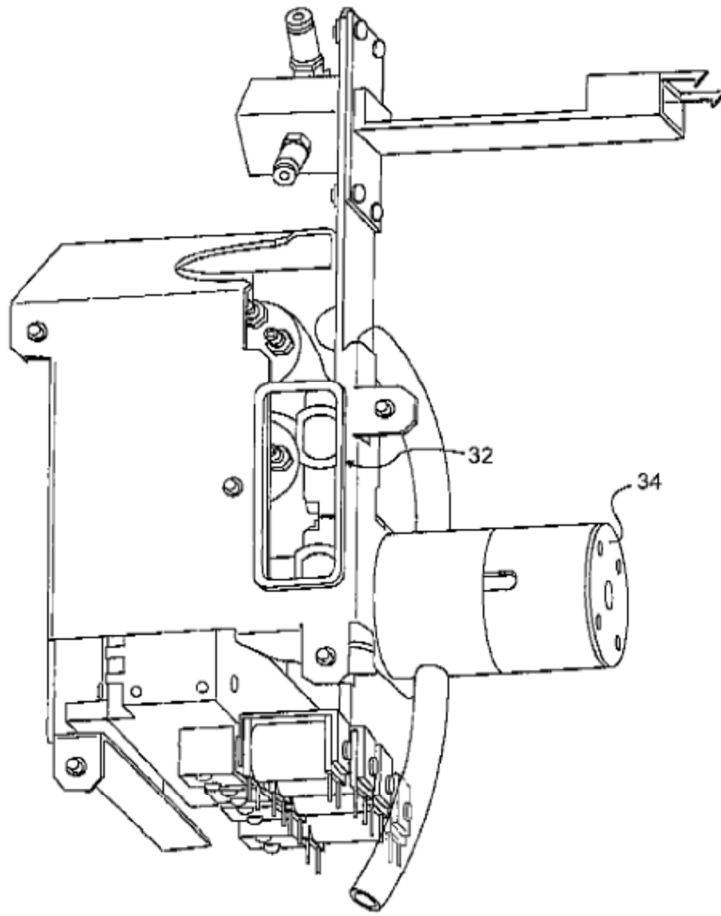


FIG. 12

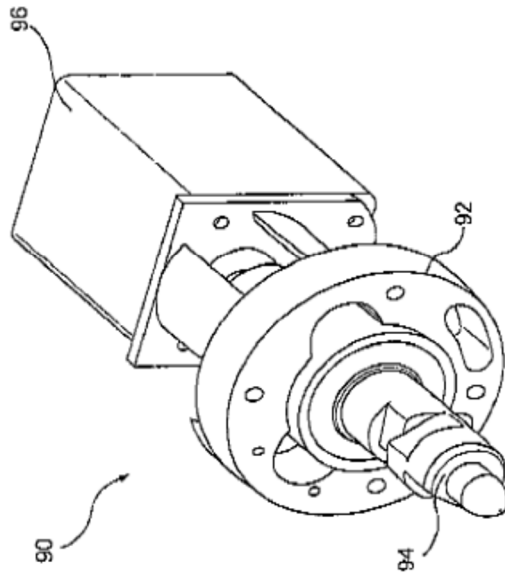


FIG. 13

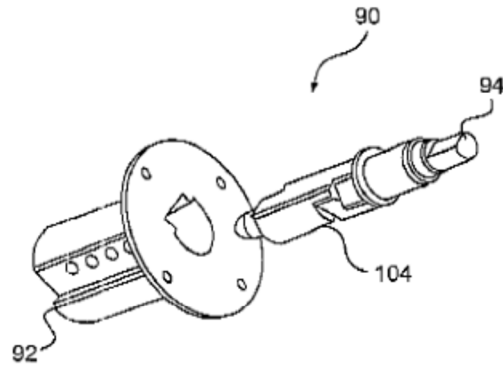


FIG. 14A

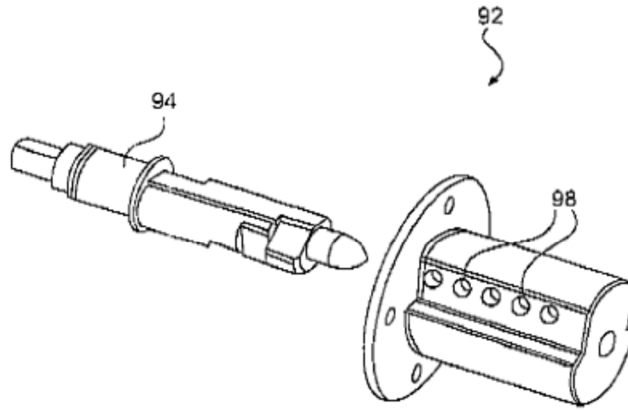


FIG. 14B

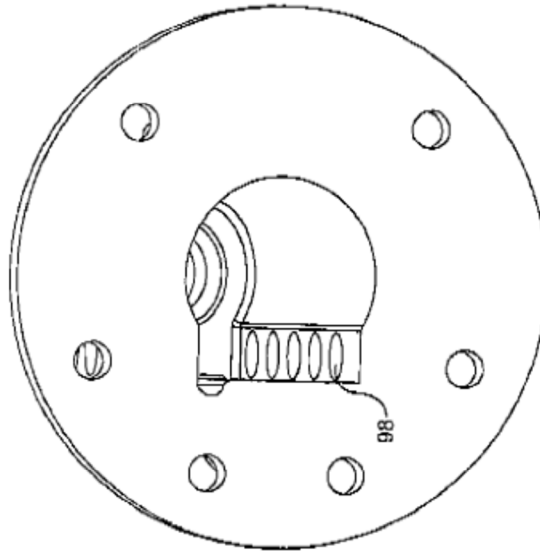


FIG. 14C

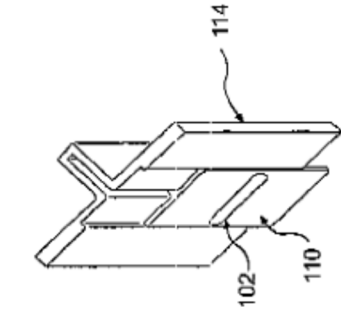


FIG. 15B

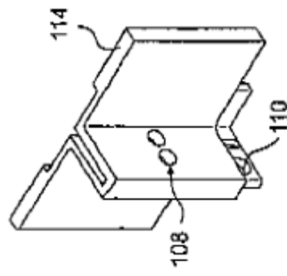


FIG. 15C

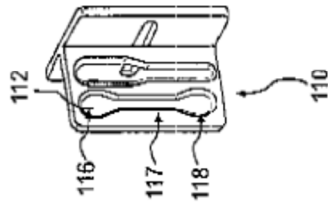


FIG. 15A

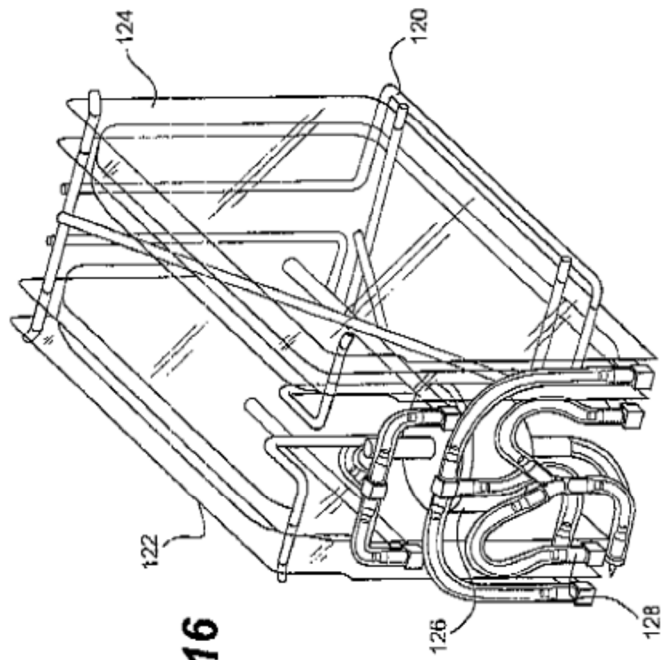


FIG. 16

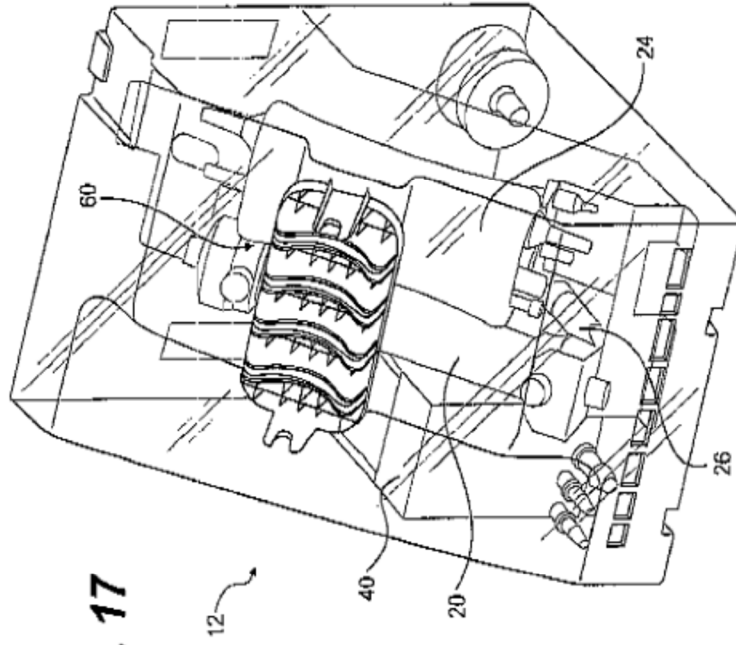


FIG. 17

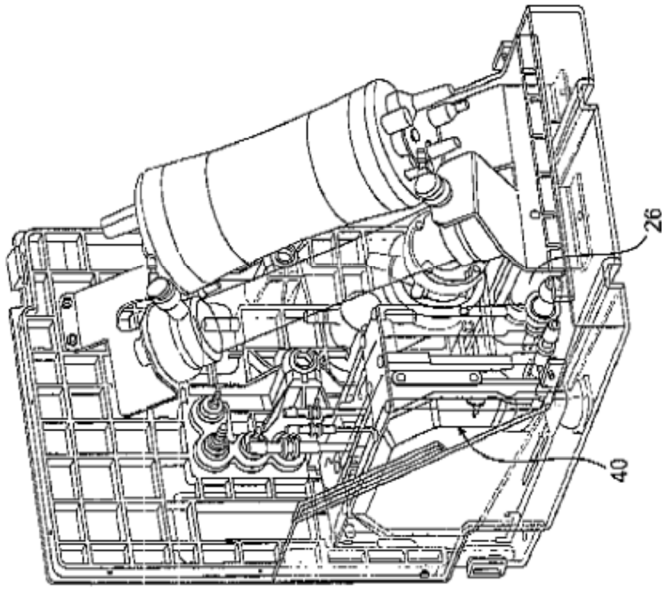


FIG. 18

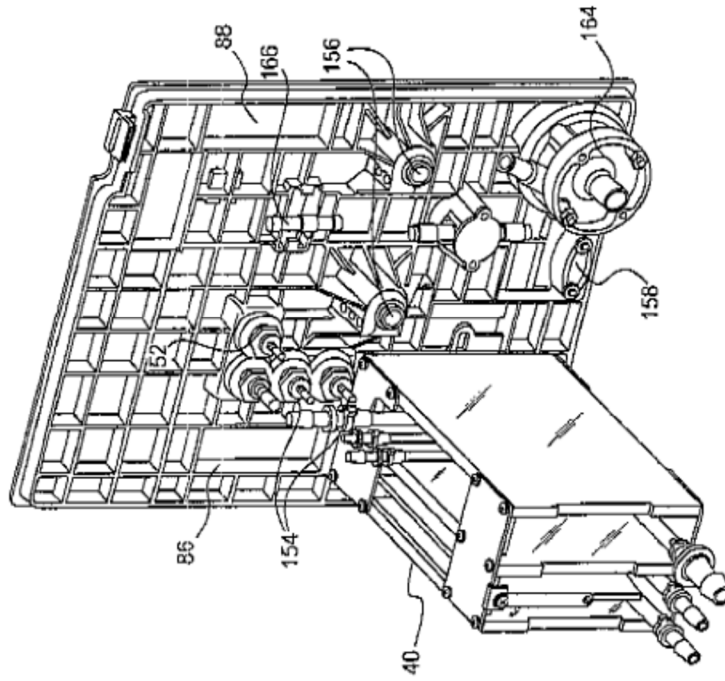


FIG. 19

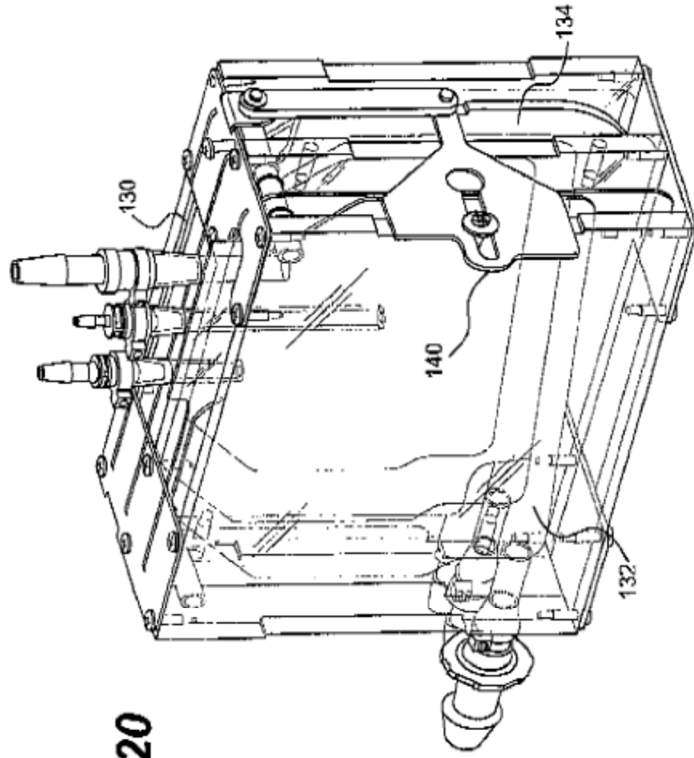


FIG. 20

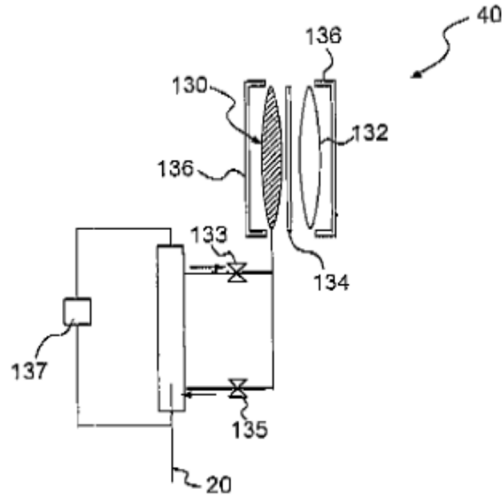


FIG. 21A

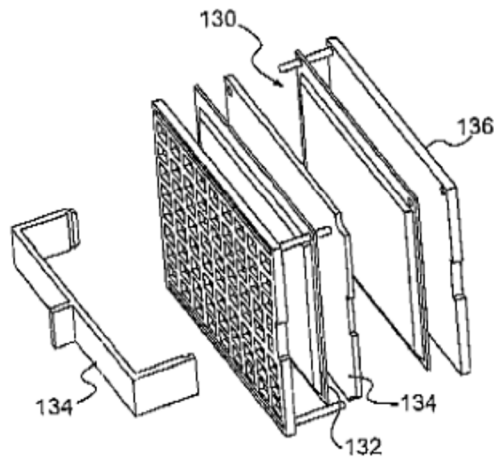


FIG. 21B

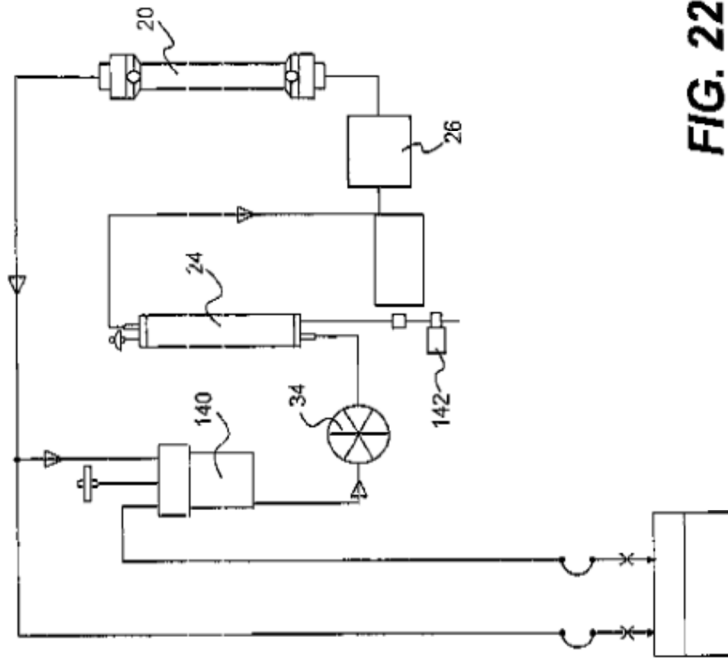


FIG. 22

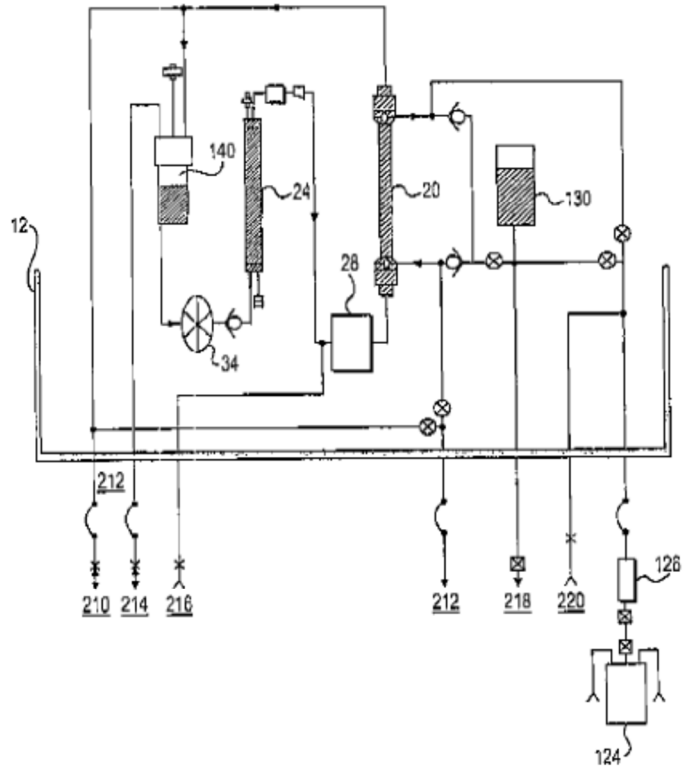


FIG. 23

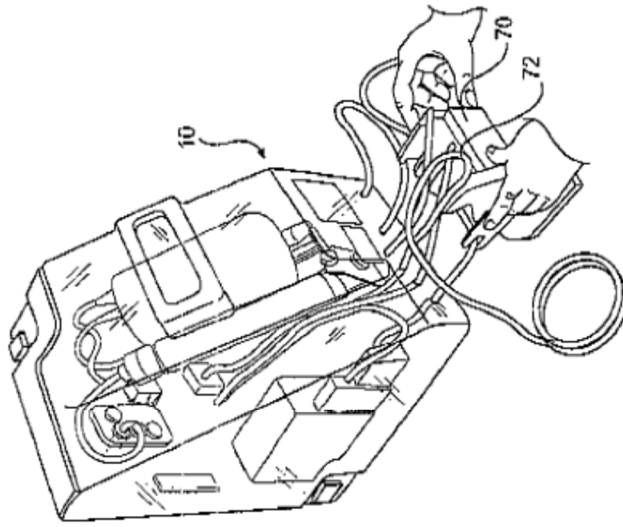


FIG. 24

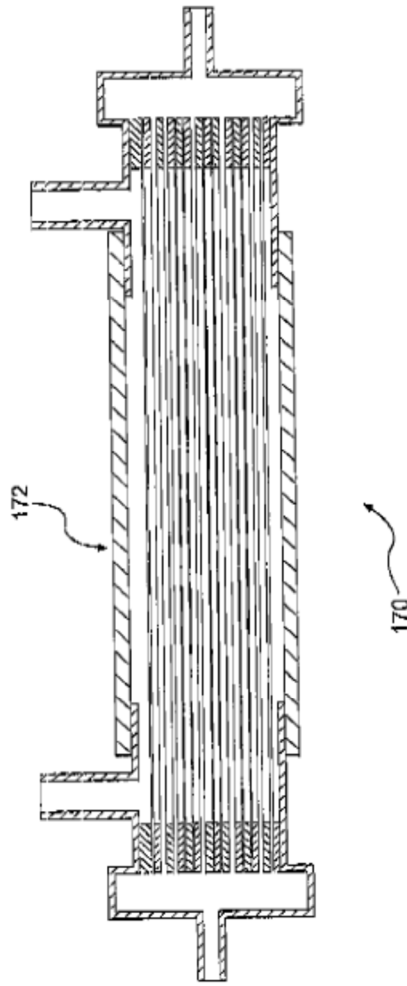


FIG. 25

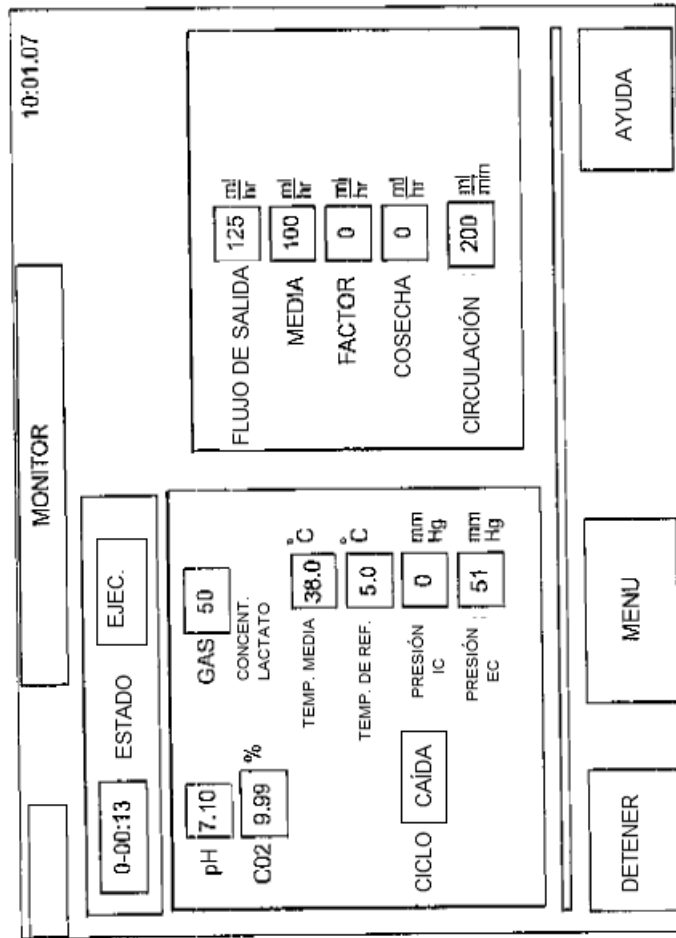


FIG. 26

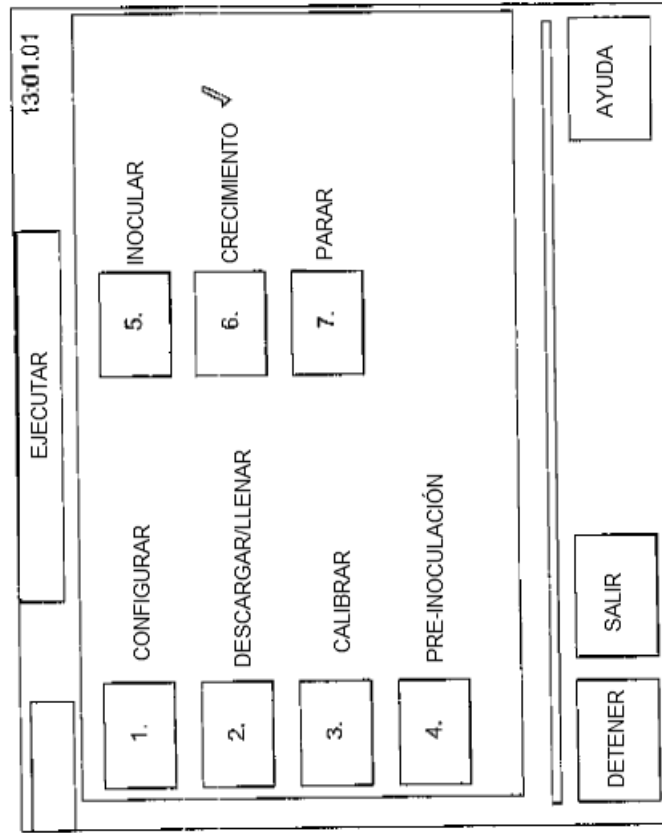


FIG. 27

ENTRADA DE AIRE PRESIÓN BAJA												
PH	GAS	ICP	ECP	ECS	TREF	TMED	TINC	FUERA	MED	FACT	COSE	CIRC
OCT.01,2004	6.65	0.0	0		1.6	25.0	26.1	0	100	0	0	200
OCT.01,2004	9:47.43											
OCT.01,2004	9:47.43											
OCT.01,2004	9:47.49											
OCT.01,2004	9:48.26											
OCT.01,2004	9:49.48											
OCT.01,2004	9:52.44											
OCT.01,2004	9:54.53											
OCT.01,2004	9:55.29											
OCT.01,2004	9:57.45											
OCT.01,2004	9:58.59											
OCT.01,2004	9:59.00											
TOTAL: 278												
INSTRUMENTO DETENIDO. BOMBAS PARADAS												
INSTRUMENTO REACTIVADO DESDE LA DETENCIÓN												
REGISTROS 158 HASTA 168												
LIBRE: 0.0 MB												
ARRIBA			PG.ARR.			PG.ABA.			FIN			
DETENER				SALIR				AYUDA				

FIG. 28

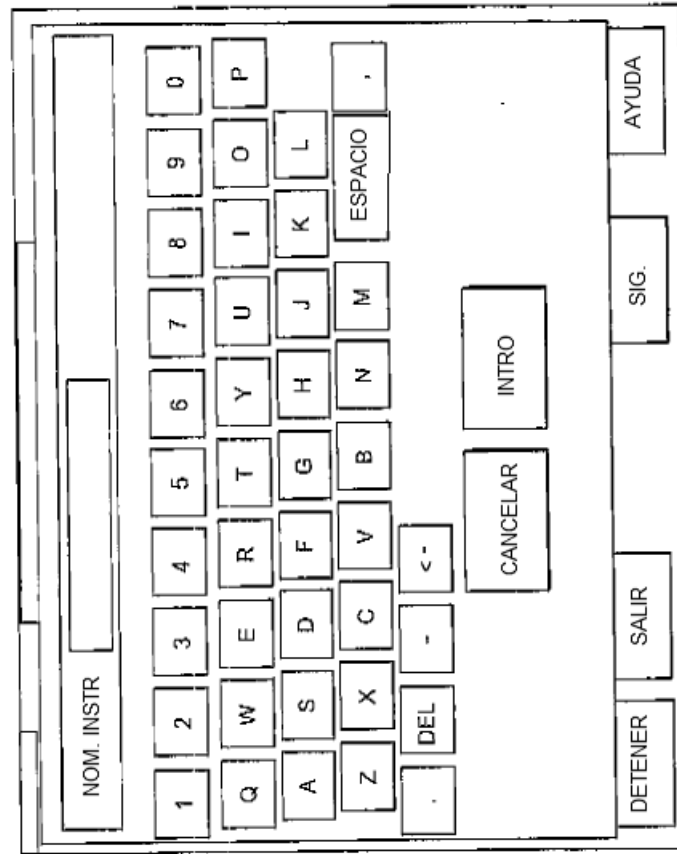


FIG. 29

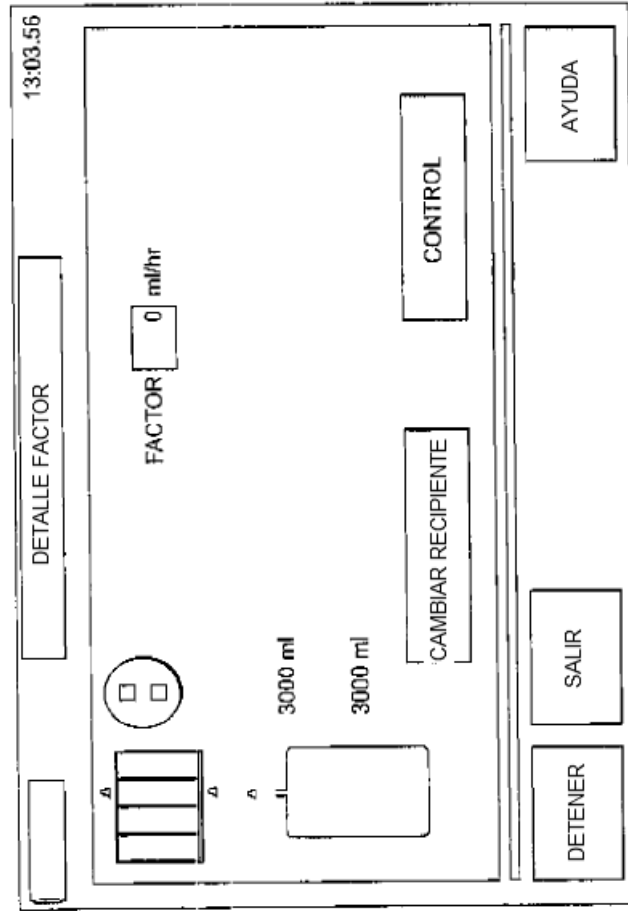


FIG. 30

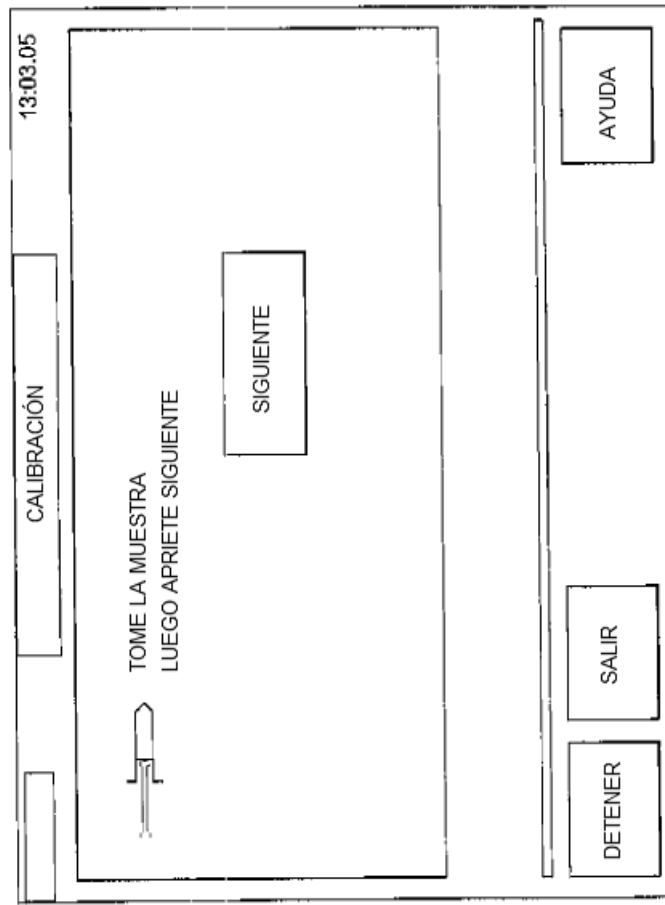


FIG. 31