

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 890 412**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/00** (2006.01)

**B01D 21/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2012** **PCT/EP2012/050508**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012** **WO12098055**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2012** **E 12703463 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.07.2021** **EP 2665806**

54 Título: **Aparato de separación**

30 Prioridad:

**17.01.2011 EP 11151110**

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

**19.01.2022**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BRAUNERSREUTHER, OSKAR;**  
**JOCKWER, ALEXANDER;**  
**KLABUHN, TORSTEN;**  
**POHLSCHIEDT, MICHAEL y**  
**THIELE, JOERG**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 890 412 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

Aparato de separación

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un aparato de separación y su uso, por ejemplo, en procedimientos de separación continua de células suspendidas de una suspensión, por ejemplo, en una fermentación en tren de semillas. Por tanto, la invención se refiere al cultivo de células o líneas celulares en suspensión.

10 Antecedentes de la invención

En la técnica, se conocen separadores por sedimentación para lograr altas concentraciones de células viables en suspensiones y para retirar productos sensibles, como polipéptidos y proteínas altamente glucosilados. En un procedimiento, se usan sedimentadores que están inclinados desde la vertical y comprenden una pluralidad de tubos o canales largos y estrechos. Las células más grandes se retiran de la suspensión al asentarse sobre las superficies orientadas hacia arriba del sedimentador, donde forman capas delgadas de sedimento que se deslizan hacia abajo y se recogen en el fondo de un recipiente localizado debajo del sedimentador. Un ejemplo de dicho separador por sedimentación se muestra en el documento WO 03/020919.

Con dicho separador por sedimentación siempre se desea reducir el tiempo de retención de las células en el aparato de separación para minimizar el tiempo que las células y el producto se mantienen en condiciones no controladas, por ejemplo, fuera del biorreactor bien controlado en un bucle externo; por tanto, para minimizar los daños de las células y del producto en las células. Desde esta perspectiva, existe la necesidad de tener un recipiente de recogida lo más pequeño posible. Por otra parte, se desea un alto rendimiento, que se puede obtener incrementando el volumen de entrada o el flujo continuo. Esto, por otra parte, es una desventaja ya que puede venir acompañado de turbulencias indeseables del flujo dentro del recipiente de recogida y puede dar lugar a tiempos de permanencia incrementados por efectos negativos sobre el comportamiento de sedimentación de las células que también afecten negativamente a los rendimientos del procedimiento.

Voisard, D., et al. (Biotechnol. Bioeng. 82 (2003) 751-765) informan del potencial de las técnicas de retención celular para el cultivo de perfusión de alta densidad a gran escala de células de mamíferos en suspensión. Chary, S. informó en 2010 del logro de títulos mayores y tasas de ejecución mayores a través de operaciones de perfusión de cultivo celular en el tren de inóculo (Conferencia de Bioproducción, 2010, Barcelona, España).

El documento DE-A-36 19 926 describe un aparato para tratar un líquido que contiene un depósito de contaminación de partículas sólidas, incluyendo el aparato al menos una cámara a través de la cual el líquido puede fluir y que tiene conexiones de alimentación y salida de líquido, estando provisto el aparato de superficies de guía para guiar el líquido a la cámara de separación. La fig. 2 del documento DE-A-36 19 926 muestra un separador estacionario diseñado principalmente para retirar partículas sólidas del agua y el aceite. El separador incluye una carcasa que alberga una cámara de depósito. El agua contaminada pasa a través del suministro de agua contaminada y viene en una cámara de preseparación. A lo largo del depósito, se ajusta un caudal bajo para que la separación de los componentes se produzca por la fuerza de la gravedad. Una parte del aceite se recoge en la cámara de preseparación que ya se encuentra encima y se puede descargar a través del drenaje del aceite. Una parte de los sólidos se hunde hasta el fondo de la cámara de preseparación y desciende a la cámara de depósito. El agua pretratada fluye a continuación con un caudal bajo a través de un envase de divisores hacia arriba.

El documento EP-A-0 003 146 divulga un dispositivo para separar agua y sustancias ligeras insolubles en agua contenidas en el mismo, por ejemplo, aceite. El dispositivo comprende un depósito para recibir una mezcla de agua y sustancias y una pluralidad de canales de separación secuenciales, paralelos e inclinados dispuestos en el depósito y delimitados por paredes de canal, una cámara de entrada, una entrada de mezcla que desemboca en la cámara de entrada y distribuye la mezcla en ángulos rectos al plano del dibujo, una cámara de alimentación que se comunica con la cámara de entrada, una salida de sustancia, un sensor de límite de capa, un rebosadero con un borde de rebose, una salida de agua que se comunica con el rebosadero y un tamiz que separa el rebosadero de un espacio colector de sustancias ligeras. El conjunto de canales de separación está dispuesto entre la cámara de alimentación y una cámara de salida del depósito. La mezcla fluye a través de un miembro dosificador, en el que se añaden productos químicos que promueven la floculación a la mezcla y a través de un mezclador hacia la entrada de la mezcla. La floculación deseada tiene lugar en la cámara de alimentación.

Por tanto, en los documentos DE-A-36 19 926 y EP-A-0 003 146 la dirección del flujo de la mezcla es paralela a las placas de separación, desde el extremo superior de las placas de separación hacia el extremo inferior de las placas de separación, antes de que la mezcla entre en las placas de separación.

65 Sumario de la invención

Es un objetivo de la invención proporcionar un aparato de sedimentación que tenga un tiempo de retención corto de

las células y al mismo tiempo sin perjudicar la eficacia de la separación.

Este objetivo se logra con los rasgos característicos de las reivindicaciones.

5 De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona un aparato separador que comprende un sedimentador y un recipiente de recogida. El recipiente de recogida está dispuesto por debajo del sedimentador y también está en comunicación fluida con el sedimentador. El recipiente de recogida forma una cámara de recepción que tiene una salida en el fondo de la cámara o contigua a él y tiene una abertura de entrada. En un modo de realización, el recipiente de recogida tiene una abertura de entrada. El recipiente de recogida está dispuesto de modo que la dirección de flujo  
10 del fluido en el área debajo del sedimentador esté sustancialmente en línea con la dirección de los canales del sedimentador.

La abertura de entrada de flujo de entrada está localizada al mismo nivel de altura vertical del aparato separador que el borde inferior del sedimentador o debajo. En el primer modo de realización descrito a continuación, la abertura de  
15 entrada de flujo de entrada está localizada preferentemente a un nivel de altura vertical por debajo del borde inferior del sedimentador. Por otra parte, en el segundo modo de realización descrito a continuación, la abertura de entrada de flujo de entrada está localizada preferentemente al mismo nivel de altura vertical del aparato separador que el borde inferior del sedimentador. Con dichas disposiciones, el flujo de entrada al recipiente de recogida tiene lugar por debajo del borde inferior del sedimentador, y, como máximo, al mismo nivel vertical que el sedimentador.

20 De acuerdo con un primer modo de realización de un primer aspecto, la invención proporciona un aparato separador que comprende un sedimentador y un recipiente de recogida. El recipiente de recogida está dispuesto por debajo del sedimentador y también está en comunicación fluida con el sedimentador. El recipiente de recogida forma una cámara de recepción que tiene una salida en el fondo de la cámara o contigua a él y tiene una abertura de entrada. En un  
25 modo de realización, el recipiente de recogida tiene una abertura de entrada. La abertura de entrada puede estar localizada en la pared lateral vertical del recipiente de recogida. Además, el recipiente de recogida comprende un elemento de desviación del flujo de entrada.

De acuerdo con un modo de realización, la entrada está por debajo del borde inferior del sedimentador. La invención también engloba que las placas del sedimentador no se extiendan al recipiente de recogida.

De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, se proporciona un único elemento de desviación del flujo de entrada.

35 El elemento de desviación está adaptado de modo que el tiempo de retención o de permanencia de una partícula y/o el tiempo de permanencia hidráulica, por ejemplo de una suspensión celular, en el recipiente de recogida se reduzca, por ejemplo en comparación con un aparato separador que tenga un recipiente de recogida sin un elemento de desviación. En particular, el tamaño del recipiente de recogida y el elemento de desviación están adaptados entre sí de modo que el tiempo de retención o permanencia de un fluido en el recipiente de recogida se reduzca en  
40 comparación con un aparato separador que tenga un recipiente de recogida sin un elemento de desviación.

De acuerdo con un modo de realización, el elemento de desviación del flujo de entrada está localizado en o cerca de la abertura de entrada. Además, se engloba que el elemento de desviación está conformado y dispuesto de modo que desvía hacia abajo la mayor parte de un flujo de entrada de líquido o fluido a través de la abertura de entrada. En caso  
45 de que la abertura de entrada esté localizada en la pared lateral vertical del recipiente de recogida, un flujo de entrada de líquido o fluido a la cámara de recepción fluirá, en general, en cierta medida hacia el fondo de la cámara de recepción debido a la gravedad. El elemento de desviación de acuerdo con la invención proporciona una desviación controlada del flujo de entrada en una dirección hacia el fondo de la cámara de recogida sin afectar negativamente a las células, por ejemplo por la fuerza de cizallamiento. Por tanto, el elemento de desviación impide que el flujo de  
50 líquido fluya a lo largo de su trayectoria natural guiado por la gravedad e impulsa la corriente de líquido a cambiar su dirección hacia abajo. Cada una de estas medidas proporciona que se reduzca el tiempo de retención o permanencia de una partícula y/o el tiempo de permanencia hidráulica, por ejemplo, de una suspensión celular, en el recipiente de recogida, como se menciona anteriormente.

55 La pared de la cámara de recepción puede estar curvada de modo que el área de la sección transversal horizontal disminuya hacia el fondo de la misma. Por ejemplo, la cámara de recepción tiene la conformación de un cono invertido o cono truncado, o tiene forma de copa o de cuenco, es decir, tiene una pared interna curvada que permite optimizar el volumen.

60 La disposición y la conformación del elemento de desviación y la curvatura de la cámara de recepción se pueden adaptar entre sí de modo que el flujo de entrada inicialmente desviado hacia abajo sea guiado además hacia el sedimentador. Por tanto, el flujo de entrada se desvía hacia abajo contiguo a la abertura de entrada; a continuación, es guiado por la curvatura o conformación de la pared interna de la cámara de recepción más hacia abajo, pero a continuación sigue la conformación cónica o de copa del recipiente y es guiado hacia arriba y hacia el sedimentador.

65

- El elemento de desviación del flujo de entrada es preferentemente una placa deflectora. La placa deflectora está dispuesta inclinada con respecto a un primer plano vertical imaginario que es perpendicular a un segundo plano vertical imaginario que comprende el eje de dirección del flujo de entrada a través de la abertura de entrada. De acuerdo con un modo de realización, la placa deflectora está inclinada de modo que interseca dicho primer plano vertical imaginario a lo largo de una línea horizontal. Además, es preferente que la inclinación de la placa deflectora sea la misma que la inclinación del sedimentador. Dicha disposición permite que se reduzca el tiempo de retención o permanencia de una partícula y/o el tiempo de permanencia hidráulica en el recipiente de recogida.
- De acuerdo con otro modo de realización, la placa deflectora se extiende en elongación del extremo inferior del sedimentador en el borde inferior del sedimentador más cercano a la abertura de entrada. De forma alternativa, la placa deflectora está conectada a la pared interna del recipiente de recogida por encima de la abertura de entrada. Dichas disposiciones también permiten que se reduzca el tiempo de retención o permanencia de una partícula y/o el tiempo de permanencia hidráulica en el recipiente de recogida.
- De acuerdo con un primer modo de realización de un segundo aspecto, la invención proporciona un aparato separador que comprende un sedimentador y un recipiente de recogida. El recipiente de recogida está dispuesto por debajo del sedimentador y también está en comunicación fluida con el sedimentador. El recipiente de recogida forma una cámara de recepción que tiene una salida en el fondo de la cámara o contigua a él y tiene una abertura de entrada. Además, la abertura de entrada de flujo de entrada está dispuesta de modo que la dirección del flujo de entrada de fluido a través de la abertura de entrada sea paralela a la dirección del sedimentador. En un sentido más amplio, la dirección del flujo de entrada de fluido a través de la abertura de entrada se desvía de la dirección del sedimentador en  $\pm 10^\circ$ , si se observa en un plano vertical imaginario que comprende el eje de dirección del flujo de entrada a través de la abertura de entrada. En otras palabras, el canal del flujo de entrada a través de la abertura de entrada está inclinado como en el sedimentador. Dicha disposición permite que se reduzca el tiempo de retención o permanencia de una partícula y/o el tiempo de permanencia hidráulica en el recipiente de recogida.
- La invención también engloba la combinación del primer y el segundo modo de realización del primer aspecto de la invención.
- De acuerdo con otro modo de realización, el aparato separador comprende un medio para controlar la dirección y reducir la velocidad del flujo de entrada corriente arriba de la abertura de entrada. En un modo de realización, el medio es un medio de equipo periférico. El medio puede ser, por ejemplo, un distribuidor de flujo o un reductor de velocidades de flujo conocido por un experto en la técnica.
- El sedimentador comprende una pluralidad de placas que forman una pluralidad de canales de sedimentación entre medias. Preferentemente, las placas del sedimentador, o todo el sedimentador, no alcanzan el recipiente de recogida desde arriba. Es decir, el aparato de separación se proporciona de manera modular, teniendo el recipiente de recogida como un módulo y el sedimentador como otro módulo separado e independiente. Esto permite un intercambio independiente de un módulo individual (que tiene otras dimensiones, por ejemplo) sin tener en cuenta e independientemente del otro módulo.
- De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona un aparato separador que comprende un sedimentador y un recipiente de recogida. El recipiente de recogida está dispuesto por debajo del sedimentador y también está en comunicación fluida con el sedimentador. El recipiente de recogida forma una cámara de recepción que tiene una salida en el fondo de la cámara o contigua a él y tiene una abertura de entrada. La abertura de entrada está preferentemente localizada en la pared lateral vertical del recipiente de recogida. El aparato separador comprende además un medio para controlar la dirección y reducir la velocidad del flujo de entrada corriente arriba de la abertura de entrada.
- De acuerdo con la invención, la disposición de un medio para controlar la dirección y reducir la velocidad del flujo de entrada corriente arriba de la abertura de entrada de acuerdo con el segundo aspecto se puede combinar con el primer y/o el segundo modo de realización del primer aspecto.
- En un modo de realización de los aspectos antes esbozados, el aparato de separación tiene una proporción del área de separación con respecto al volumen de  $50 \text{ m}^2/\text{m}^3$  a  $60 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . En otro modo de realización, el flujo continuo volumétrico es de menos de 5 al día. En un modo de realización, el flujo volumétrico a través del aparato de sedimentación es de 500 l/día a 3000 l/día.
- El volumen del recipiente de recogida puede variar desde 1 a  $20 \text{ m}^3$ .
- Un tercer aspecto de la invención se refiere a un sistema, en particular un sistema de tren de semillas, que comprende un primer fermentador, un aparato separador de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la invención localizado corriente abajo del primer fermentador, y al menos un segundo fermentador localizado corriente abajo del aparato separador. En un modo de realización, el segundo fermentador se inocula con una densidad celular de inoculación de desde  $5 \times 10^5$  células/ml a  $50 \times 10^5$  células/ml.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del aparato separador de acuerdo con la invención en un sistema de tren de semillas, que comprende un primer fermentador localizado corriente arriba del primer fermentador y al menos un segundo fermentador localizado corriente abajo del aparato separador. En un modo de realización, el segundo fermentador se inocula con una densidad celular de inoculación de desde  $5 \cdot 10^5$  células/ml a  $50 \cdot 10^5$  células/ml.

Con la invención, es posible proporcionar un aparato de separación que tiene un recipiente de recogida de volumen comparativamente pequeño en términos de garantizar un tiempo de residencia minimizado pero que al mismo tiempo tenga un flujo volumétrico y una eficacia de separación suficientemente altos. El elemento de desviación proporciona un flujo controlado de la suspensión hacia el sedimentador que no es perjudicial para el tiempo de retención en el aparato. El flujo de la suspensión celular es desviado por el elemento de desviación de modo que la dirección del flujo de la suspensión después de la entrada en el recipiente de recogida en el área por debajo del sedimentador esté sustancialmente en línea con la dirección de los canales del sedimentador.

Otros aspectos, rasgos característicos y ventajas resultarán evidentes del resumen anterior, así como de la descripción que sigue, incluyendo las figuras y las reivindicaciones.

#### Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra una vista esquemática en sección transversal de un aparato de separación de acuerdo con un primer modo de realización de la invención.

La fig. 2 muestra una vista esquemática superior en sección transversal del modo de realización de la fig. 1.

La fig. 3 muestra el aparato de separación de acuerdo con la fig. 1.

La fig. 4 muestra una conformación preferente de la abertura de entrada del aparato de separación.

La fig. 5 muestra una vista esquemática en sección transversal de un aparato de separación de acuerdo con un segundo modo de realización de la invención.

La fig. 6 muestra una vista esquemática en sección transversal de un aparato de separación de acuerdo con un tercer modo de realización de la invención.

La fig. 7 muestra una vista esquemática en sección transversal de un aparato de separación de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

La fig. 8 muestra una vista esquemática en sección transversal de un aparato de separación de acuerdo con un tercer modo de realización de la invención.

La fig. 9 muestra un tren de semillas estándar y un procedimiento de fermentación principal.

La fig. 10 muestra un dibujo esquemático de un tren de semillas modificado con el aparato de separación empleado en la fermentación (N-1) e inoculación paralela de una fermentación paralela múltiple a diferente escala.

La fig. 11 muestra la densidad celular viable y el perfil de viabilidad de las series de perfusión P1 (♦) y P2 (▲).

La fig. 12 muestra el volumen de alimentación de perfusión por día (tasa de perfusión) y el nivel de retención de las dos series de perfusión P1 (♦) y P2 (▲).

La fig. 13 muestra el curso de la densidad celular viable de dos cultivos de 2 l (♦/▲) en comparación con un procedimiento de 10.000 l (mostrado como línea discontinua negra).

La fig. 14 muestra el curso de la viabilidad de dos cultivos de 2 l (♦/▲) en comparación con un procedimiento de 10.000 l (mostrado como línea discontinua negra).

La fig. 15 muestra el curso de la densidad celular viable de cultivos a partir de una densidad celular de inoculación del 333 %: densidad celular viable del biorreactor de 400 l y los dos cultivos de 2 l (♦/▲) en comparación con un procedimiento de 10.000 l (línea discontinua negra; densidad celular de inoculación del 100 %).

La fig. 16 muestra el curso de la viabilidad de cultivos a partir de una densidad celular de inoculación del 333 %: Viabilidad del biorreactor de 400 l y los dos controles de 2 l (♦/▲) en comparación con un procedimiento de 10.000 l (línea discontinua negra; densidad celular de inoculación del 100 %).

La fig. 17 muestra las curvas de la figura 15 desplazadas aproximadamente +2 días a lo largo del eje x.

La fig. 18 muestra las curvas de la figura 16 desplazadas aproximadamente +2 días a lo largo del eje x.

La fig. 19 muestra el curso de la densidad celular viable de cultivos a partir de una densidad celular de inoculación del 666 %: Crecimiento celular de dos cultivos de 2 l (♦/▲) en comparación con un procedimiento de 10.000 l (línea discontinua negra; densidad celular de inoculación del 100 %).

La fig. 20 muestra el curso de la viabilidad de cultivos a partir de una densidad celular de inoculación del 666 %: Viabilidad de dos cultivos de 2 l (♦/▲) en comparación con un procedimiento de 10.000 l (línea discontinua negra; densidad celular de inoculación del 100 %).

La fig. 21 muestra las curvas de la figura 19 desplazadas durante aproximadamente +3 días a lo largo del eje x.

La fig. 22 muestra las curvas de la figura 20 desplazadas durante aproximadamente +3 días a lo largo del eje x.

La fig. 23 muestra el curso de la concentración de glucosa determinada para diferentes densidades celulares de inoculación (DCI). Procedimiento de 10.000 l (línea discontinua negra; densidad celular de inoculación del 100 %); fermentaciones de 2 l (♦/DCI 100 %); fermentaciones de 2 l y 400 l (○/●/DCI 333 %) y fermentación de 2 l (■/DCI 666 %).

La fig. 24 muestra el curso de la concentración de lactato determinada para diferentes densidades celulares de inoculación (DCI). Procedimiento de 10.000 l (línea discontinua negra; densidad celular de inoculación del 100 %); fermentaciones de 2 l (♦/DCI 100 %); fermentaciones de 2 l y 400 l (○/●/DCI 333 %) y fermentación de 2 l (■/DCI 666 %).

La fig. 25 muestra el curso de la concentración de glutamina determinada para diferentes densidades celulares de inoculación (DCI). Procedimiento de 10.000 l (línea discontinua negra; densidad celular de inoculación del 100 %); fermentaciones de 2 l (♦/DCI 100 %); fermentaciones de 2 l y 400 l (○/●/DCI 333 %) y fermentación de 2 l (■/DCI 666 %).

La fig. 26 muestra el curso de la concentración de amonio determinada para diferentes densidades celulares de inoculación (DCI). Procedimiento de 10.000 l (línea discontinua negra; densidad celular de inoculación del 100 %); fermentaciones de 2 l (♦/DCI 100 %); fermentaciones de 2 l y 400 l (○/●/DCI 333 %) y fermentación de 2 l (■/DCI 666 %).

La fig. 27 muestra el curso de la actividad de LDH determinada para diferentes densidades celulares de inoculación (DCI). Procedimiento de 10.000 l (línea discontinua negra; densidad celular de inoculación del 100 %); fermentaciones de 2 l (♦/DCI 100 %); fermentaciones de 2 l y 400 l (○/●/DCI 333 %) y los cultivos de 2 l (■/DCI 666 %).

La fig. 28 muestra la producción de anticuerpos para dos fermentaciones de 2 l (♦/▲) con una densidad celular de inoculación del 100 %.

La fig. 29 muestra la producción de anticuerpos para el biorreactor de 400 l (♦) y los dos controles de 2 l (▲/△) con una densidad celular de inoculación del 333 % en comparación con un procedimiento de 10.000 l (línea discontinua negra; densidad celular de inoculación del 100 %).

La fig. 30 muestra la producción de anticuerpos para los dos cultivos de 2 l (▲/♦) con una densidad celular de inoculación del 666 % en comparación con un procedimiento de 10.000 l (línea discontinua negra; densidad celular de inoculación del 100 %).

#### Descripción de modos de realización

La fig. 1 muestra un apartado separador 1 de acuerdo con un primer modo de realización de la invención. El aparato separador comprende un sedimentador 2 y un recipiente de recogida 3. El recipiente de recogida 3 está dispuesto por debajo del sedimentador 2 y también está en comunicación fluida con el sedimentador 2. El recipiente de recogida 3 forma una cámara de recepción 4, y la cámara de recepción 4 tiene una salida 5 proporcionada en su parte inferior. Las placas del sedimentador 2 no se extienden dentro del recipiente de recogida 3. Además, la cámara de recepción 4 tiene una abertura de entrada 6. La fig. 1 también muestra el tubo de entrada 61 a través del cual se guía líquido o fluido al recipiente de recogida 3. La abertura de entrada 6 está localizada en la pared lateral vertical 41 del recipiente de recogida 3, por ejemplo, a determinada distancia por debajo del borde superior del recipiente de recogida 3. Es decir, la abertura de entrada de flujo de entrada 6 está por debajo del borde inferior 22 del sedimentador 2. El líquido o fluido en el presente campo es típicamente una suspensión que contiene células o líneas celulares. La suspensión se origina, por ejemplo, a partir de un fermentador (no mostrado) y se suministra desde el mismo al aparato de separación. Por tanto, la suspensión suministrada desde el fermentador se introduce en el recipiente de recogida por debajo del sedimentador con una dirección descendente controlada, y a continuación se guía hacia arriba y a través del sedimentador 2. El término "descendente" indica que el flujo va en dirección a la salida del recipiente de recogida pero no directamente a la salida del recipiente de recogida. La fase clara de la suspensión se retira por encima del sedimentador y las células sedimentadas se retiran en la salida 5.

Como se muestra en la fig. 1, el recipiente de recogida 3 puede comprender un elemento de desviación del flujo de entrada 7. En términos más generales, un elemento de desviación 7 está dispuesto de modo que se localice dentro del recipiente de recogida 3. El tamaño del recipiente de recogida 3 y el elemento de desviación 7 están adaptados entre sí de modo que el tiempo de retención de un fluido en el recipiente de recogida se reduzca 3 en comparación con un aparato separador que tenga un recipiente de recogida sin un elemento de desviación. El elemento de desviación minimiza la interacción directa de las partículas, las células y/o los fluidos del flujo de entrada y, al mismo tiempo, permite caudales mayores sin perturbar negativamente la comunicación fluida y/o la sedimentación de las partículas, por ejemplo, células, que es necesaria para reducir los tiempos de retención. De acuerdo con la fig. 1, el elemento de desviación del flujo de entrada 7 está localizado cercano o contiguo a la abertura de entrada 6. Está conformado y dispuesto de modo que desvíe hacia abajo un flujo de entrada de líquido o fluido a través de la abertura de entrada 6. Esto se muestra en la fig. 1 mediante una flecha que visualiza la curva de flujo provocada por el elemento de desviación 7. Como se menciona anteriormente, un flujo de entrada de líquido o fluido en la cámara de recepción 4 fluirá, en general, en cierta medida hacia el fondo de la cámara de recepción 4 debido a la gravedad (mostrada en la fig. 1 por la flecha continua). Sin embargo, el elemento de desviación 7 desvía el flujo de entrada en una dirección controlada hacia el fondo del recipiente de recogida 3. En otras palabras, el elemento de desviación 7 impide que el flujo de líquido fluya a lo largo de su trayectoria natural guiado por la gravedad y controla que la corriente de líquido cambie su dirección hacia abajo.

La pared 41 de la cámara de recepción 4 de la fig. 1 está curvada como una taza o cuenco, es decir, la pared vertical no es plana sino que comprende una curvatura de modo que el área de la sección transversal horizontal disminuya hacia el fondo de la misma. Por ejemplo, la cámara de recepción 4 tiene la conformación de un cono invertido o cono truncado, o tiene forma de copa o de cuenco, es decir, tiene una pared interna curvada.

La disposición y la conformación del elemento de desviación 7 y la curvatura de la cámara receptora 4 están adaptadas entre sí de modo que el flujo de entrada inicialmente desviado hacia abajo sea guiado además hacia arriba al sedimentador 2. Esto también se muestra en la fig. 1 mediante las flechas que ejemplifican el flujo del fluido para alcanzar el sedimentador 2. Por tanto, contiguo a la abertura de entrada 6, el flujo de entrada se desvía en primer lugar hacia abajo. A continuación, es guiado por la pared interna 41 de la cámara de recepción 4 más hacia abajo y sigue la conformación en general curvada del recipiente 3 y es guiado hacia arriba y hacia el sedimentador 2.

El elemento de desviación del flujo de entrada 7 puede ser una placa deflectora. La placa deflectora 7 está dispuesta inclinada con respecto a un primer plano vertical imaginario  $V_1$  que es perpendicular a un segundo plano vertical imaginario  $V_2$  que comprende el eje de dirección del flujo de entrada a través de la abertura de entrada. Esto se muestra en la fig. 3 que es idéntica a la fig. 1 excepto por los planos imaginarios mostrados. En la fig. 3, el segundo plano vertical imaginario  $V_2$  es el plano del dibujo. El primer plano vertical imaginario  $V_1$  se muestra perpendicular a este plano  $V_2$ . En el modo de realización mostrado, la placa deflectora 7 está inclinada en un ángulo  $\alpha$  de modo que interseca dicho primer plano vertical imaginario  $V_1$  a lo largo de una línea horizontal  $H_1$ . En la fig. 3, la línea horizontal  $H_1$  también es perpendicular al segundo plano  $V_2$ . Esto se puede ver en la fig. 2 que muestra la línea horizontal  $H_1$  perpendicular al segundo plano  $V_2$  y también muestra el borde superior del elemento de desviación 7. En el modo de realización de las figs. 1 y 3, la inclinación  $\alpha$  de la placa deflectora 7 es la misma que la inclinación  $\alpha'$  del sedimentador 2 (véase la fig. 3).

En este modo de realización, la abertura de entrada de flujo de entrada 6 también está localizada por debajo del borde inferior 22 del sedimentador 2.

En el modo de realización alternativo mostrado en la fig. 6, la placa deflectora 7' está dispuesta inclinada con respecto a un primer plano vertical imaginario  $V_1$  que es perpendicular a un segundo plano vertical imaginario  $V_2$  que comprende el eje de dirección del flujo de entrada a través de la abertura de entrada. Sin embargo, en este modo de realización, la placa deflectora está inclinada de modo que interseca dicho plano vertical imaginario secundario  $V_2$  a lo largo de una línea horizontal  $H_2$ .

En el modo de realización de la fig. 1, la placa deflectora 7 se extiende en elongación del extremo inferior 21 del sedimentador 2. En particular, se extiende dentro de la cámara receptora 4 en ese borde inferior 22 del sedimentador 2 que está más cerca de la abertura de entrada 6. Por tanto, se puede decir que el elemento de desviación forma una extensión de la superficie externa del sedimentador que llega al recipiente de recogida.

De forma alternativa, la placa deflectora 170 está conectada a la pared interna del recipiente de recogida 130 por encima de la abertura de entrada 160. Dicho modo de realización se muestra en la fig. 5. En la fig. 5, se muestra una placa de desviación curva 170 pero también puede ser recta siempre que esté inclinada con respecto a la horizontal. También en este modo de realización, la abertura de entrada de flujo de entrada 6 está localizada por debajo del borde inferior del sedimentador 2.

De forma alternativa, la placa deflectora 270 está conectada a la pared interna del recipiente de recogida 230 directamente por encima de la abertura de entrada 260, es decir, la placa deflectora es una extensión de la mitad superior de la entrada 261. Dicho modo de realización se muestra en la fig. 8. En la fig. 8, se muestra una placa de

desviación curva 270 pero también puede ser recta siempre que esté inclinada con respecto a la horizontal.

En cualquiera de los modos de realización de la invención, el elemento de desviación se extiende hacia la cámara de recepción hasta el punto de que se extiende hacia abajo más allá del eje de dirección del flujo de entrada a través de la abertura de entrada. Más preferentemente, el elemento de desviación se extiende a la cámara de recepción hasta el punto de que se extiende hacia abajo más allá del borde inferior 22 de la abertura de entrada para garantizar que el flujo de entrada alcance el elemento de desviación y no pueda fluir sustancialmente horizontalmente, por tanto, pasando simplemente el elemento de desviación.

La altura vertical del recipiente de recogida 3 está preferentemente en el intervalo de 400 mm a 500 mm, más preferentemente aproximadamente 450 mm. Su diámetro máximo o superior puede variar desde 600 mm a 700 mm, preferentemente aproximadamente 650 mm. La línea central horizontal o eje de dirección del flujo de entrada de la abertura de entrada está localizado preferentemente aproximadamente 80 mm a 90 mm por debajo del borde superior del recipiente de recogida, más preferentemente aproximadamente 88 mm. La longitud de la placa deflectora está preferentemente en el intervalo de 150 mm a 200 mm, más preferentemente aproximadamente 180 mm. La anchura horizontal de la placa deflectora es al menos la misma que la anchura del flujo proyectado que sale de la abertura de entrada en la localización de la placa deflectora, o mayor.

La longitud de la placa del sedimentador puede estar dentro de un intervalo de 600 a 900 mm, preferentemente de 700 a 800 mm, y más preferentemente aproximadamente 720 mm. La anchura de la placa del sedimentador puede estar entre 400 mm y 500 mm, y es preferentemente de aproximadamente 430 mm. La inclinación del sedimentador puede ser de 15 a 60°, preferentemente de 30 a 45° y más preferentemente de 30°.

La placa de desviación puede tener una anchura de 450 - 200 mm, preferentemente aproximadamente de 430 mm en su extremo inferior y aproximadamente de 215 mm en su extremo superior. La altura de la placa de desviación puede estar entre 130 mm a 200 mm, y es preferentemente de aproximadamente 130 mm.

La abertura de entrada puede tener una conformación ovalada con diámetros preferentemente de aproximadamente 80 - 90 mm (preferentemente aproximadamente 85 mm) y de 12 a 20 mm (preferentemente aproximadamente 17 mm).

De acuerdo con otro modo de realización, el aparato separador 1 puede comprender un medio para controlar la dirección y reducir la velocidad del flujo de entrada corriente arriba de la abertura de entrada 6, o dentro del tubo de entrada 61. El medio puede ser, por ejemplo, un distribuidor de flujo o cualquier reductor de velocidades de flujo conocido por un experto en la técnica. El medio reduce la aceleración negativa cuando las células chocan contra la placa de desviación y soporta un flujo de la suspensión celular a lo largo de las paredes del recipiente (similar al flujo de acuerdo con el modo de realización mostrado en la fig. 6, descrito a continuación).

El sedimentador 2 comprende una pluralidad de placas 23 que forman una pluralidad de canales de sedimentación entre medias. El sedimentador tiene preferentemente de 60 a 70 canales, preferentemente 65 o 66 canales.

La fig. 4 muestra un modo de realización de la abertura de entrada 6'. Como se puede observar en la fig. 4, la abertura de entrada tiene una conformación no circular, preferentemente la conformación de un óvalo. La fig. 4 es una vista superior esquemática de modo que la abertura de entrada se extiende a lo largo de la circunferencia del recipiente de recogida. Dicha abertura de entrada no circular provoca una relajación del flujo de entrada de modo que se disminuye la velocidad del flujo. Además, con dicha abertura de entrada, el flujo de entrada de líquido permite que se use toda la anchura de la placa deflectora para desviar el flujo hacia abajo. La sección transversal del flujo se ensancha mediante dicha abertura de entrada.

La fig. 7 muestra una vista esquemática en sección transversal de un aparato de separación 10 de acuerdo con el segundo modo de realización de la invención. En la fig. 7, en comparación con la fig. 1, los mismos componentes del aparato de separación se indican con los mismos números de referencia.

En este modo de realización, la abertura de entrada de flujo de entrada 6 está localizada al mismo nivel de altura vertical del aparato separador que el borde inferior del sedimentador 2.

En este modo de realización de la invención, la abertura de entrada de flujo de entrada 6', es decir, el tubo de flujo de entrada 61', está dispuesta de modo que la dirección del flujo de entrada de fluido a través de la abertura de entrada 6' sea paralela a la dirección o inclinación ( $\alpha'$ ) del sedimentador 2.

De forma alternativa, la abertura de entrada de flujo de entrada no es estrictamente paralela a la dirección de los canales del sedimentador 2, sino que se desvía de la dirección/inclinación del sedimentador en  $\pm 10^\circ$ , si se observa en un plano vertical imaginario ( $V_2$ ) que comprende el eje de dirección del flujo de entrada a través de la abertura de entrada 6'.

Por tanto, esta disposición del tubo de flujo de entrada 61' guía el flujo de entrada en una dirección hacia el fondo del recipiente de recogida 3. La disposición y localización del tubo de flujo de entrada 61' y la abertura de entrada 6' y la



curvatura de la cámara de recepción 4 están adaptadas entre sí de modo que el flujo de entrada inicialmente desviado hacia abajo se guía además hacia el sedimentador 2. Esto también se muestra en la fig. 7 mediante las flechas que ejemplifican el flujo del fluido para alcanzar el sedimentador 2. Por tanto, el flujo de entrada se dirige inicialmente hacia abajo. A continuación, es guiado por la pared interna 41 de la cámara de recepción 4 más hacia abajo y sigue la conformación en general curvada del recipiente 3 y es guiado a continuación hacia arriba y hacia el sedimentador 2. No obstante, se puede añadir un elemento de desviación de acuerdo con el primer modo de realización (por ejemplo, como se muestra en la fig. 3) al segundo modo de realización para guiar además el flujo a lo largo de la dirección deseada.

Si bien la invención se ha ilustrado y descrito en detalle en los dibujos y la descripción anterior, dichas ilustración y descripción se han de considerar ilustrativas o ejemplares y no restrictivas. Se entenderá que los expertos en la materia pueden realizar cambios y modificaciones dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. En particular, la presente invención cubre otros modos de realización con cualquier combinación de rasgos característicos de diferentes modos de realización descritos anteriormente y a continuación.

Además, en las reivindicaciones la palabra "que comprende" no excluye otros elementos o etapas, y el artículo indefinido "un" o "una" no excluye una pluralidad. Una sola unidad puede cumplir las funciones de varios rasgos característicos enumerados en las reivindicaciones. Los términos "esencialmente", "aproximadamente" y similares en relación con un atributo o un valor en particular también definen exactamente el atributo o exactamente el valor, respectivamente. Ningún signo de referencia en las reivindicaciones se debe interpretar como una limitación del alcance.

Lo siguiente representa ejemplos no limitantes de la invención y sus usos prácticos.

## **Ejemplo 1: Material y procedimientos de los siguientes cultivos celulares y separaciones celulares ejemplificados**

### **1.1 Línea celular**

La línea celular usada en los ejemplos fue una línea celular CHO DG44 recombinante que produce un anticuerpo terapéutico de clase IgG humana.

### **1.2 Tampón/Medios**

Para la prevención de la espuma se usó Antifoam Dow Emulsion; Biesterfeld Spezialchemie GmbH. Para regular el pH se empleó carbonato de sodio 1 mol/l.

### **1.3 Cultivo**

#### **13.1 Sistema experimental**

La línea celular CHO (véase anteriormente) se cultivó en un cultivo de alimentación por lotes. El tren de semillas comenzó con una inoculación de matraces agitadores y comprendió cuatro cultivos en trenes de semillas consecutivos, cada cultivo consecutivo con un volumen de cultivo incrementado (20 l a 3000 l) y una fermentación principal de 10.0000 l (véase la figura 9).

La temperatura se regula automáticamente mediante una doble camisa calefactora en todos los cultivos. La regulación del pH se realiza mediante la adición de una solución alcalina (base) con bombas peristálticas así como mediante la introducción de CO<sub>2</sub> gaseoso por medio de flujos máscos. El oxígeno disuelto se regula automáticamente mediante aire y nitrógeno, así como la presión y la velocidad de agitación.

#### **1.3.2 Cultivo de inoculación**

El cultivo tiene lugar en matraces agitadores con una expansión de volumen escalonada hasta 2 l. Los parámetros de cultivo fueron aproximadamente 37 °C, gasificación con aire y 5 % CO<sub>2</sub> a una humedad relativa de ≥70 %. Como velocidad de agitación se usó 125 rpm. Al alcanzar la densidad celular deseada en los matraces de 2 l, se inoculó el biorreactor de 20 l.

#### **1.3.3 Tren de semillas hasta 400 l**

La etapa N-4 (20 l) se realizó con presión selectiva y alimentación al 3 % del volumen del reactor (VR) por día. En las etapas de N-3 a N-1, las células se cultivaron sin presión selectiva y también se alimentaron con VR al 3 % por día. La temperatura se reguló a 37 °C. El valor del pH se reguló a aproximadamente pH 7. La pO<sub>2</sub> se reguló aproximadamente al 30 % usando aire a presión. Se tomaron diariamente muestras durante el tren de semillas (etapa N-4 a N-2) y se determinaron la concentración celular, pH, pCO<sub>2</sub>, osmolalidad y concentración del producto. Para los procedimientos analíticos, véase el ejemplo 1.4.

Se realizó un procedimiento de producción a pequeña escala que comprendió tren de semillas e inóculo. En la escala n-1 (véase, por ejemplo, la figura 10), la operación por lotes usada de forma rutinaria se reemplazó por la perfusión a gran escala para generar densidades celulares altas para lograr mayores densidades celulares de inoculación del biorreactor de producción N. El procedimiento establecido que usa el modo de no perfusión que da lugar a menores densidades celulares de inoculación en la escala de producción se comparó con el procedimiento modificado que usa el elemento de perfusión que da lugar a mayores densidades celulares. Los detalles de los resultados, las operaciones y la comparación del procedimiento se muestran a continuación usando el aparato de separación descrito anteriormente.

#### 1.3.4 Procedimiento de perfusión a escala de 3000 l

La etapa N-1 se realizó como cultivo de perfusión con el objetivo de alcanzar mayores densidades celulares en 5 días de perfusión en comparación con un procedimiento sin cultivo de perfusión (véase, por ejemplo, la figura 10).

Hasta la etapa N-2 se realizó el tren de semillas de acuerdo con el procedimiento establecido. Se introdujeron modificaciones solo en el cultivo N-1.

Todo el sistema de perfusión consistía en un biorreactor de 3000 l, el aparato de separación como se informa en el presente documento con vibrador e intercambiador de calor de flujo cruzado en espiral conectado, tres bombas peristálticas (Watson Marlow Inc.) para la adición de alimento (modelo 624Di), drenaje de perfundido (modelo 624Di) y circulación (modelo 620U), dos tanques intermedios (cada uno de un volumen de 3000 l) para el medio de perfusión y los residuos (perfundido). Los dispositivos de muestra estaban en la línea del perfundido y en el biorreactor.

El aparato de separación se usó para separar las células del sobrenadante de cultivo y reciclar las células viables de vuelta al biorreactor.

Se realizaron dos fermentaciones de perfusión consecutivas con cinco días de perfusión cada una. La segunda fermentación de perfusión se inoculó mediante una división de la primera operación de 3000 l a una densidad de siembra cuatro veces mayor que la del primer biorreactor con inoculación simultánea de los biorreactores de producción (figura 10).

Las células se cultivaron en primer lugar en modo discontinuo durante uno o dos días, y, a continuación, se inició la perfusión como se explica anteriormente para la primera operación de perfusión. Durante la perfusión se tomaron al principio muestras del biorreactor y del perfundido cada tres horas. Después del segundo día, se tomaron muestras cada seis horas, pero el flujo volumétrico de alimentación se reguló cada tres horas.

Durante la producción también se tomaron muestras de cultivo todos los días.

#### 1.3.5 Cultivos a volumen de cultivo variable

La inoculación del cultivo en tren de semillas N-1 del biorreactor posterior se realizó en sistemas de diferente escala (2 l hasta 400 l) con diferentes parámetros (véase la tabla 1), tales como diferentes densidades celulares que son el principal objetivo de estos experimentos. Otros parámetros se adaptaron a las densidades celulares incrementadas. Una condición representa el procedimiento de referencia establecido con menores densidades celulares en comparación con el modo de perfusión del que se informa en el presente documento. Las células no muestran ninguna fase de retardo ni limitaciones después de la inoculación a mayores densidades celulares. Con ello, el tiempo total de fermentación (tren de semillas y cultivo principal) se puede reducir, con lo que se pueden lograr rendimientos iguales en un solo lote.

Se usaron diferentes parámetros para determinar si las mayores densidades celulares de inoculación disponibles usando un cultivo de perfusión influyen en el crecimiento o la calidad de las células.

El medio y las alimentaciones fueron los mismos en todos los cultivos. El programa de tiempo de los eventos individuales durante el cultivo, por ejemplo, el tiempo de inicio de la alimentación, se ajustó de acuerdo con el volumen de cultivo y la densidad celular de inicio en base al procedimiento de producción de referencia. Por ejemplo, los puntos de tiempo se desplazaron a un punto anterior si la densidad celular de inoculación se había incrementado en comparación con un procedimiento sin sedimentador/perfusión (procedimiento de referencia).

La temperatura se reguló a aproximadamente 37 °C durante la fase de crecimiento, el valor del pH se reguló a aproximadamente pH 7 y la pO<sub>2</sub> se ajustó al 30 % usando aire presurizado.

Tabla 1: Visión general de los cultivos

| N.º | volumen              | densidad celular de inoculación [%] |
|-----|----------------------|-------------------------------------|
| 1   | 400 l                | 333                                 |
| 2   | 80 l                 | 666                                 |
| 3   | 2 x 2 l (referencia) | 100                                 |
| 4   | 2 x 2 l              | 333                                 |
| 5   | 2 x 2 l              | 666                                 |
| 6   | 1 x 2 l              | 666                                 |
| 7   | 1 x 2 l              | 333                                 |
| 8   | 10 l                 | 666                                 |
| 9   | 10 l                 | 666                                 |

#### 1.4 Procedimientos analíticos

##### 5 1.4.1 Densidad celular

Las densidades celulares se determinaron mediante el procedimiento del azul tripano usando un contador celular automatizado CEDEX HiRes (Roche Innovatis, Bielefeld) según las instrucciones del fabricante. Los fluidos de cultivo celular se diluyeron 1:5 con PBS-tampón alcanzando una densidad celular de más de 16 veces la densidad de inoculación estándar. La proporción de células viables frente a todas las células medidas mostró la viabilidad.

##### 1.4.2 Concentraciones de sustrato

La concentración de glucosa, lactato, glutamina y amonio en el cultivo se determinó usando un analizador BIOPROFILE flex (Nova Biomedicals, Waltham). El procedimiento de medición se basa en biosensores o electrodos selectivos de iones.

##### 1.4.3 Medición de pH y pCO<sub>2</sub>

El valor de pH en el biorreactor se controló diariamente externamente mediante un medidor de pH (WTW, Inolab). El valor de pCO<sub>2</sub> se comprobó diariamente con un analizador de gases en sangre AVL Compact 3 (Roche, Suiza).

##### 1.4.4 Osmolalidad

Para comprobar la presión osmótica durante la perfusión y la alimentación modificada, se midió diariamente la osmolalidad. Se usó un Osmomat 030 (Gonotec, Berlín, Alemania). La técnica de medición se basa en mediciones comparativas de los puntos de congelación del agua pura y de las soluciones. Mientras que el agua tiene un punto de congelación de 0 °C, una solución con una concentración salina de 1 mOsmol/kg tiene un punto de congelación de -1,858 °C.

##### 1.4.5 Actividad de lactato deshidrogenasa

La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) está relacionada con la exposición de las células durante la fermentación. Las células dañadas suministran más LDH al medio que las células viables. La técnica de medición se basa en un ensayo enzimático en placas de microtitulación. Con la presencia de LDH, el NADH se oxidará a NAD<sup>+</sup> y el piruvato se reducirá a lactato. La velocidad de disminución de NADH se mide mediante una extinción de 340 nm.

#### 1.5 Análisis de anticuerpos

Los títulos de anticuerpos se cuantificaron mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) usando una columna de afinidad Poros A.

#### Ejemplo 2: Cultivo de tren de semillas

##### 45 1.1 Tren de semillas hasta 400 l

Se llevó a cabo como se explica en el ejemplo 1. Una vez que se alcanzó una densidad celular de inoculación, la alimentación en el biorreactor de 20 l a 400 l comenzó con un caudal volumétrico definido. El biorreactor de 20 l se

dividió una vez y el biorreactor de 80 l se inoculó dos veces con fines de reserva.

## 1.2 Diseño del aparato de separación

Debido a la gran escala del aparato de separación, también tuvo que construirse un intercambiador de calor adecuado para enfriar el cultivo antes de la aplicación al aparato. Para reducir la tensión y la presión sobre las células se usó un intercambiador de calor de flujo cruzado en espiral (MCE AG, Alemania).

Internamente, el sedimentador constaba de 65 placas extraíbles de acero inoxidable. El área de sedimentación total se estableció de desde 7 m<sup>2</sup> o 10 m<sup>2</sup>, por ejemplo, 8 m<sup>2</sup>. El sedimentador estaba inclinado en un ángulo de 60° con respecto a la horizontal. La inclinación se puede cambiar mediante una rueda giratoria si es necesario. Se acopló un vibrador electromagnético, que se activó automáticamente durante 10-20 s cada 15 min. El ajuste angular y el intervalo de vibración garantizaron que las células se reciclaran eficazmente.

Antes de su uso, todo el equipo se desinfectó o más bien se esterilizó (CIP y SEP) y se sometió a prueba la ausencia de microorganismos. La calificación del diseño (DQ), la instalación (IQ), la siguiente calificación del funcionamiento (OQ) y el rendimiento (PQ) del equipo correspondiente al procedimiento de funcionamiento estándar y la prueba de esterilidad no mostraron anomalías.

## 1.3 Perfusión

### 1.3.1 Procedimiento

Para iniciar la perfusión del cultivo, el fluido de cultivo celular del biorreactor se bombeó a través de un tubo de inmersión al intercambiador de calor, que enfrió el cultivo a 10-15 °C. Esto sirvió como una ralentización del metabolismo celular durante el tiempo fuera del biorreactor, es decir, en condiciones no controladas.

La bomba de circulación controlaba el caudal del cultivo con un caudal volumétrico de aproximadamente 390 l/h de forma constante. El volumen total del bucle fue de aproximadamente 200 l. La velocidad de alimentación de la perfusión estuvo regulada por la densidad celular en el biorreactor.

### 1.3.2 Crecimiento celular

La comparación de la densidad celular viable (DCV) y la viabilidad celular en el transcurso de dos perfusiones consecutivas (P1 y P2) se muestran en la figura 11. En ambos casos se alcanzó una densidad celular de más de un 100 % (aproximadamente de un 130 %). No se ha producido un recorte de la viabilidad de <85 %.

### 1.3.3 Retención celular (grado/eficacia)

Como se explica en el presente documento, el aparato de separación funcionó bien para separar las células del sobrenadante. La eficacia de separación y los volúmenes de perfusión se muestran en la figura 12. La eficacia de separación (nivel de retención) fue  $\geq 0,9 = 90\%$  durante todo el tiempo. Una vez que la retención disminuyó a <95 %, se prolongó el tiempo de vibración.

Un recambio máximo de la alimentación de perfusión de 0,9 veces los volúmenes del biorreactor o 2400 l/d (correspondiente a 3000 l para todo el sistema y 200 l de líquido en la circulación) fue suficiente para apoyar el crecimiento celular. Las eficacias de separación para ambas perfusiones se mantuvieron por encima de un 95 %. Estos resultados se obtuvieron sin optimización de la perfusión mediante el ajuste del ángulo del sedimentador o las bombas.

Como se puede observar en la figura 12, ambas series de perfusión muestran una retención celular comparable de al menos un 95 % (parte superior de la figura 12) y un incremento comparable en la tasa de perfusión. Se debe tener en cuenta que P1 inició la perfusión después de dos días de alimentación discontinua, mientras que P2 inició la perfusión después de solo un día de alimentación discontinua. Por tanto, las curvas de P2 comienzan antes que las de P1.

Se puede realizar una optimización de la tasa de perfusión mediante el ajuste del ángulo del sedimentador para un mejor reflujo celular o mediante la optimización de la alimentación para densidades celulares mayores.

## 1.4 Cultivo

### 1.4.1 Crecimiento y viabilidad celular

Ejemplares las fermentaciones n.º 1, 3, 4 y 5 (véase la tabla 1 anteriormente) se comparan con un cultivo de producción.

Las fermentaciones se inocularon con diferentes densidades celulares. La hora de inicio de la alimentación se ajustó

en consecuencia. Para obtener una concentración de producto comparable en comparación con el cultivo de 10.000 l (serie 3 con un volumen de 2 l con una densidad celular de inoculación de un 100 %) en un tiempo más corto, las densidades celulares de inoculación se elevaron a un 333 % (series 1 y 4 con un volumen de 400 l y un volumen de 2 l, respectivamente) y 666 % (serie 5 con un volumen de 2 l). También se realizaron dos fermentaciones con una densidad celular de inoculación de un 100 % como control del procedimiento de producción.

La perfusión empleada en la fermentación N-1 del tren de semillas no influye en el crecimiento celular de las células en las fermentaciones siguientes posteriores, es decir, no se identificó ninguna fase de retardo.

La figura 13 muestra el crecimiento celular de los cultivos de 2 l en comparación con el promedio de una fermentación de 10.000 l.

Se realizó una comparación del procedimiento de producción establecido con las densidades celulares de inoculación mayores derivadas del funcionamiento del sedimentador (véase la figura 14). No se observaron diferencias en la viabilidad, crecimiento celular, metabolismo de las células. La perfusión no tuvo influencia sobre el crecimiento y la viabilidad de las células.

Las figuras 15/16 muestran las densidades celulares viables y las viabilidades de tres fermentaciones (1 x 400 l y 2 x 2 l) con una densidad celular de inoculación de un 333 % en comparación con un procedimiento de producción de referencia (líneas discontinuas). La mayor densidad celular de inoculación acortó el tiempo de cultivo en aproximadamente 2 días, ya que las densidades celulares máximas ya se alcanzaron aproximadamente el día 5 con un volumen de 400 l y un volumen de 2 l en comparación con el día 7 a un volumen del procedimiento de producción. La mayor densidad celular de inoculación no dio lugar tampoco a una fase de retardo durante el crecimiento celular exponencial.

Para la comparación en las figuras 17 y 18, las curvas para la viabilidad y densidad celular viable se desplazan durante aproximadamente +2 días para mostrar la comparabilidad de los cultivos. Esto proporciona pruebas del hecho de que el uso del aparato de separación como se informa en el presente documento no tiene influencia sobre las características de crecimiento de las células.

Se han obtenido resultados análogos con una densidad celular de inoculación de un 666 % como se muestra en las figuras 19/20 y las figuras 21/22. En las mismas, se muestra el crecimiento celular y las viabilidades de dos cultivos de 2 l con una densidad celular de inoculación de un 666 %. Como se puede observar la máxima densidad celular ya se alcanzó después de 4 días de cultivo, lo que redujo el tiempo del procedimiento durante aproximadamente 3 días (se muestra en la figura 21/22 en la que las curvas de la figura 19/20 se desplazan durante aproximadamente +3 días). Por tanto, a una densidad celular de inoculación de un 666 %, el aparato de separación no tiene influencia sobre el crecimiento celular y la viabilidad en un cultivo posterior.

No se observó una fase de retardo del crecimiento celular con una densidad celular de inoculación de un 666 %. No se pudo reconocer ninguna limitación o inhibición del crecimiento celular usando el sedimentador para proporcionar una suspensión celular concentrada para inocular a una densidad celular incrementada de un 666 %. No se observaron efectos negativos del aparato y su equipo.

#### 1.4.2 Producción de anticuerpos

La concentración de producto durante el tiempo de cultivo de los cultivos de 2 l con una densidad celular de inoculación de un 100 % se muestra en la figura 28. Una comparación de las curvas inoculadas más altas muestra claramente que el tiempo total del procedimiento se puede reducir en 4 a 5 días usando el aparato de separación como se informa en el presente documento con densidades celulares de inoculación mayores.

Por tanto, como se explica en las secciones anteriores, usando un aparato de separación como se informa en el presente documento en la fermentación del tren de semillas N-1, el cultivo principal se puede inocular a densidades celulares mayores. Además, aunque las células crecen a densidades celulares mayores en la fermentación del tren de semillas N-1, no se puede observar una fase de retardo después de la inoculación del cultivo principal. Las células comienzan a crecer inmediatamente de forma exponencial. Con el mismo, los valores correspondientes con respecto a la densidad celular y la concentración de producto en comparación con una fermentación de producción de referencia sin usar el aparato de separación en la fermentación del tren de semillas N-1 se alcanzaron en un momento anterior durante el cultivo. El rendimiento del cultivo celular y los títulos de producto no muestran diferencias significativas y permiten un acortamiento total del tiempo de funcionamiento en al menos 2 o al menos 4 días, respectivamente, dependiendo de las densidades celulares de inoculación. Usando este procedimiento como ejemplo, el tiempo de producción se puede reducir en un 25 %.

## 2. RESULTADOS

La invención se refiere a un novedoso aparato de sedimentación que es, entre otras cosas, adecuado para su uso a gran escala (por ejemplo, de un nivel de 2000 l/día a 3000 l/día) en cultivo celular y separación celular.

5 Con respecto a una mayor densidad celular en el tren de semillas de la etapa N-1, se puede ilustrar una buena comparabilidad del crecimiento celular entre los cultivos principales que usan el aparato de separación de matrices en la fermentación del tren de semillas y los que no lo usan, además del hecho de que las curvas para los principales cultivos que usan el aparato de separación en el tren de semillas se pueden acortar de 2 a 4 días en comparación con el procedimiento de referencia (procedimiento de producción establecido).

El aparato no afectó al cultivo celular, lo que dio lugar a altas tasas de retención.

10 La esencia de la invención es proporcionar un crecimiento celular comparable (sin fase de retardo) y una cantidad de producto estable en el siguiente cultivo de producción (etapa N) usando una mayor densidad celular de inoculación para un mayor rendimiento espacio-temporal con el aparato de la presente invención.

15 Ninguna de las diferentes densidades celulares de inoculación mostró fase de retardo ni inhibiciones después de la inoculación con una suspensión celular obtenida usando el aparato de la invención.

20 Resumiendo lo anterior, usando un aparato de separación como se informa en el presente documento, es posible reducir el tiempo requerido de la fermentación principal en al menos aproximadamente 2 a 4 días sin impacto negativo sobre la concentración del producto. Por tanto, mediante la reducción general del tiempo requerido para una sola campaña de producción, es decir, fermentación del tren de semillas y fermentación principal, se pueden realizar más campañas al mismo tiempo, por ejemplo, un año, o se puede evitar una expansión de las instalaciones de producción, es decir, los volúmenes de los biorreactores.

## REIVINDICACIONES

1. Aparato separador (1), que comprende:  
 5 un sedimentador (2) que tiene una pluralidad de canales; y  
 un recipiente de recogida (3) dispuesto por debajo y en comunicación fluida con el sedimentador (2), formando el  
 10 recipiente de recogida (3) una cámara de recepción (4) que tiene una salida (5) en o contigua al fondo de la cámara y  
 que tiene una abertura de entrada de flujo de entrada (6) por encima de la salida (5),  
 en el que la abertura de entrada de flujo de entrada (6) está localizada al mismo nivel de altura vertical del aparato  
 15 separador (1) que el borde inferior (22) del sedimentador (2) o por debajo del borde inferior (22) del sedimentador (2),  
 y  
 en el que el recipiente de recogida (3) está dispuesto de modo que la dirección del flujo de entrada de fluido en la  
 cámara de recepción (4) esté sustancialmente en línea con la dirección de los canales del sedimentador (2) después  
 de pasar la abertura de entrada (6), y  
 20 en el que el recipiente de recogida (3) comprende un elemento de desviación del flujo de entrada (7).
2. El aparato separador de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el elemento de desviación del flujo de entrada  
 (7) está localizado en o cerca de la abertura de entrada (6).
- 25 3. El aparato separador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el elemento de  
 desviación (7) está conformado y dispuesto de modo que desvía hacia abajo un flujo de entrada de fluido después de  
 pasar por la abertura de entrada (6).
- 30 4. El aparato separador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la pared (41) de la  
 cámara de recepción (4) está curvada de modo que el área de la sección transversal horizontal disminuye hacia el  
 fondo de la misma.
5. El aparato separador de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la disposición y la conformación del elemento  
 35 de desviación (7) y la curvatura de la cámara de recepción (4) están adaptadas entre sí de modo que el flujo de entrada  
 inicialmente desviado hacia abajo se guía además hacia arriba al sedimentador (2).
6. El aparato separador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el elemento de  
 desviación de flujo de entrada (7) es una placa deflectora.
- 40 7. El aparato separador de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la placa deflectora está dispuesta inclinada  
 con respecto a un primer plano vertical imaginario ( $V_1$ ) que es perpendicular a un segundo plano vertical imaginario  
 ( $V_2$ ) que comprende el eje de dirección del flujo de entrada a través de la abertura de entrada.
- 45 8. El aparato separador de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la placa deflectora está inclinada de modo  
 que interseca dicho primer plano vertical imaginario ( $V_1$ ) a lo largo de una línea horizontal ( $H_1$ ).
9. El aparato separador de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la inclinación ( $\alpha$ ) de la placa deflectora es la  
 misma que la inclinación ( $\alpha'$ ) de los canales del sedimentador (2).
- 50 10. El aparato separador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la placa deflectora se  
 extiende en elongación del extremo inferior (21) del sedimentador (2) en el borde inferior (22) del sedimentador (2)  
 más cercano a la abertura de entrada.
11. El aparato separador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la placa deflectora está  
 55 conectada a la pared interna del recipiente de recogida (3) por encima de la abertura de entrada (6).
12. El aparato separador de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la abertura de entrada de flujo de entrada  
 (6) está dispuesta de modo que la dirección de flujo de entrada de fluido después de pasar la abertura de entrada (6)  
 es paralela a la dirección ( $\alpha'$ ) del sedimentador (2), o cuando la dirección del flujo de entrada de fluido a través de la  
 60 abertura de entrada (6) se desvía de la dirección ( $\alpha'$ ) del sedimentador (2) en  $\pm 10^\circ$ , si se observa en un plano vertical  
 imaginario ( $V_2$ ) que comprende el eje de dirección del flujo de entrada a través de la abertura de entrada (6).
13. El aparato separador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además  
 65 un elemento de turbulencia (600) dispuesto corriente arriba de la abertura de entrada (6) para poner en rotación el  
 flujo de entrada.

14. El aparato separador de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el elemento de turbulencia es un rotor que comprende una o más paletas (601-606).

5 15. El aparato separador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sedimentador (2) comprende una pluralidad de placas ( $23_1, \dots, 23_n$ ) que forman una pluralidad de canales de sedimentación entre medias.

16. Un sistema, que comprende:

10 un primer fermentador,

un aparato separador (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes localizado corriente abajo del primer fermentador, y

15 al menos un segundo fermentador localizado corriente abajo del aparato separador.



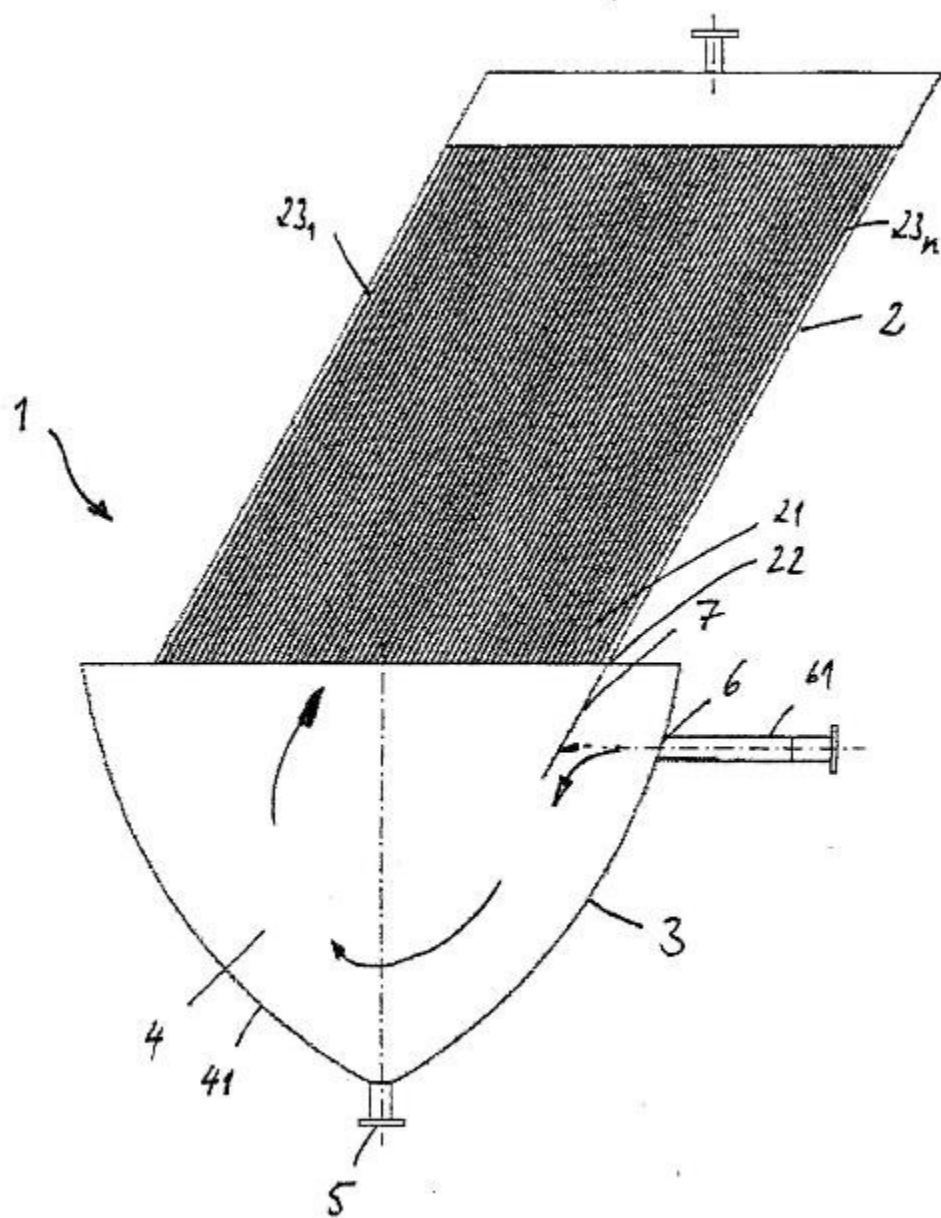


Fig. 1

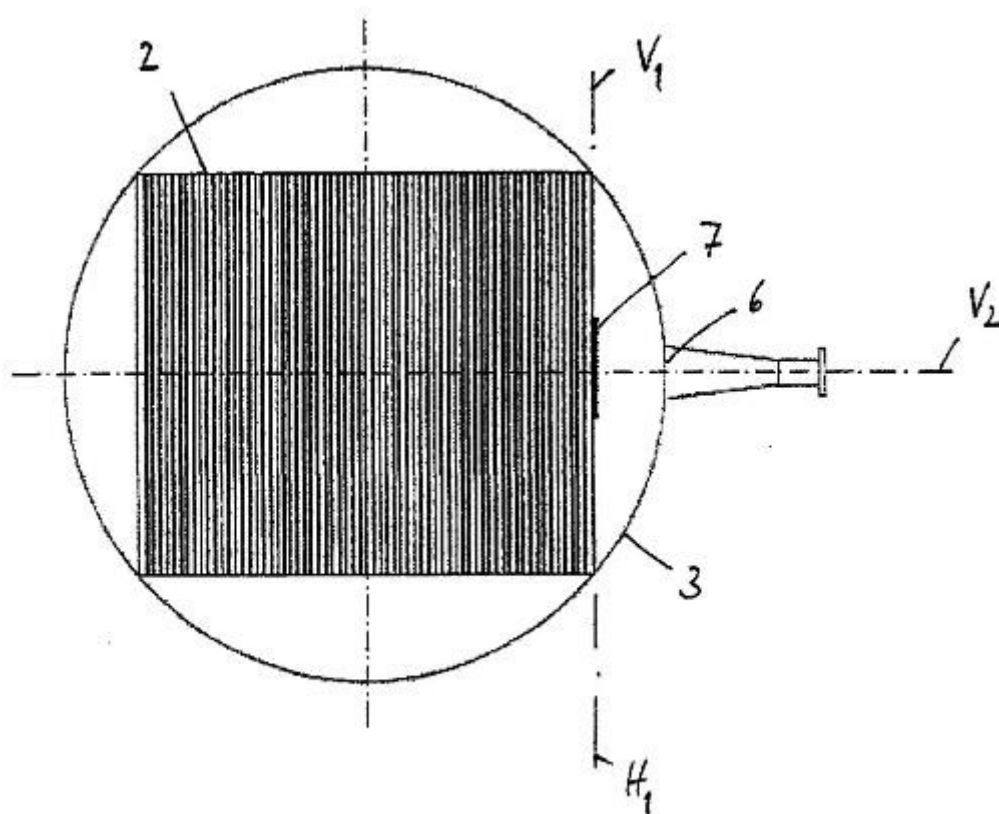


Fig. 2

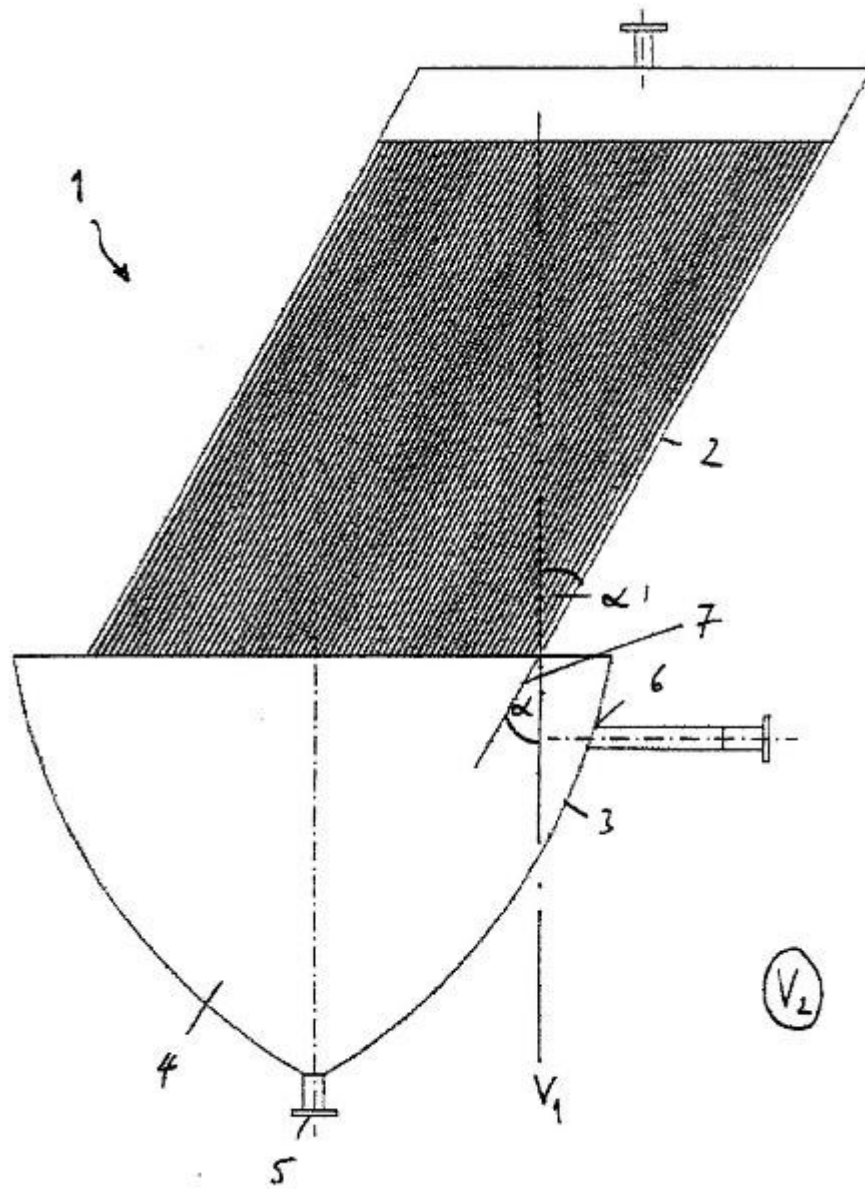


Fig. 3

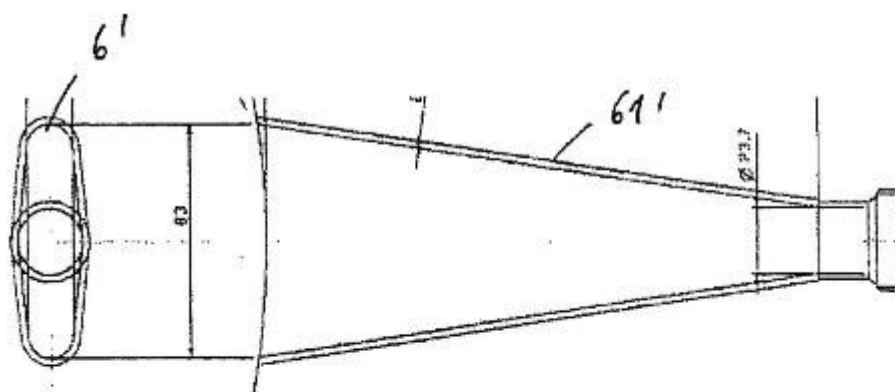


Fig. 4

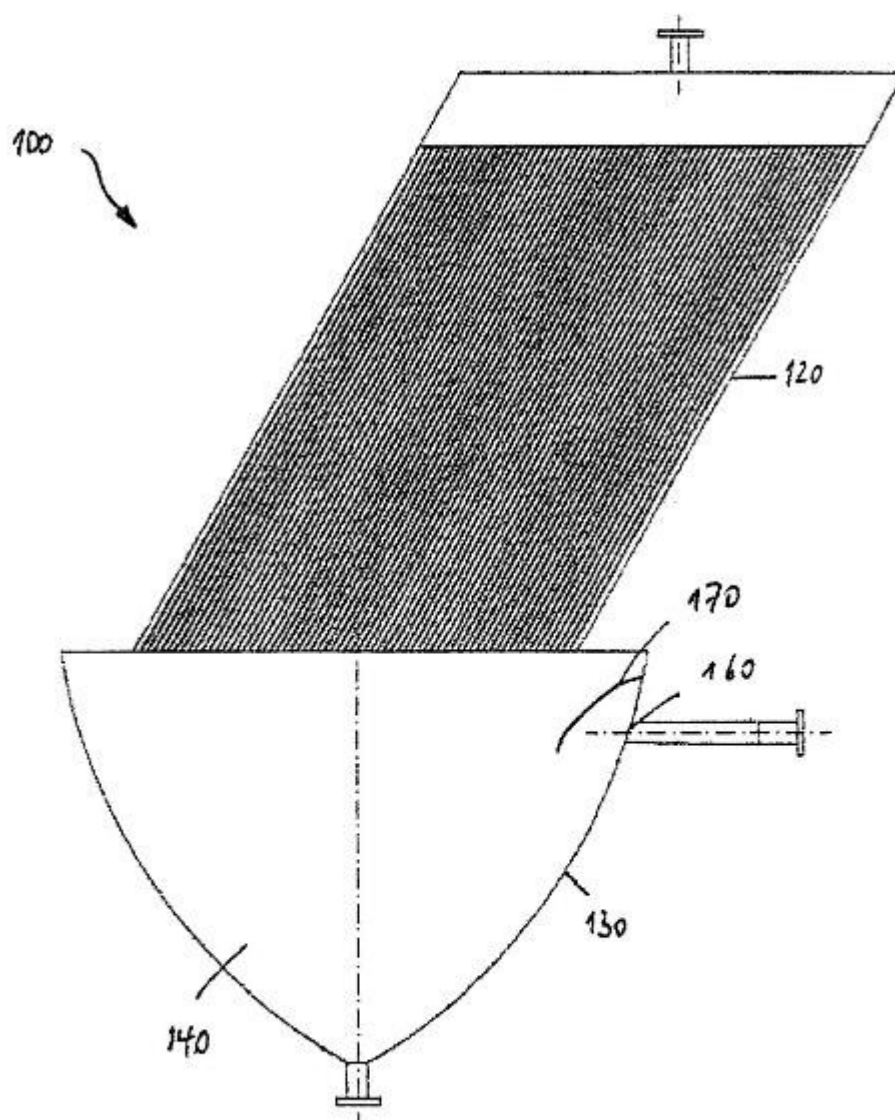


Fig. 5

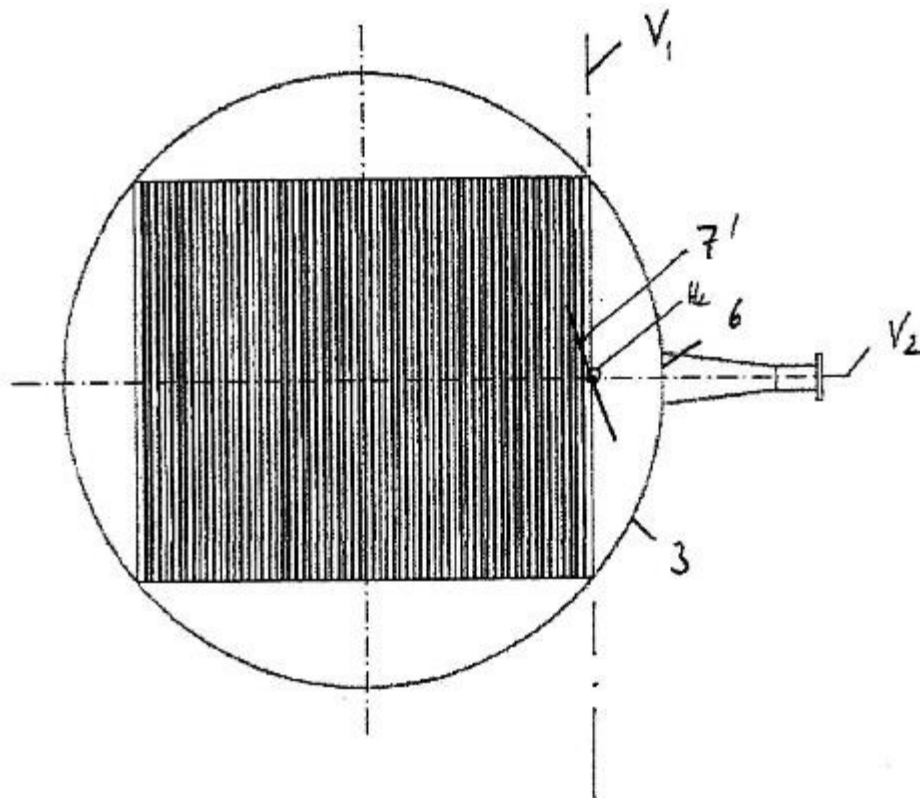


Fig. 6

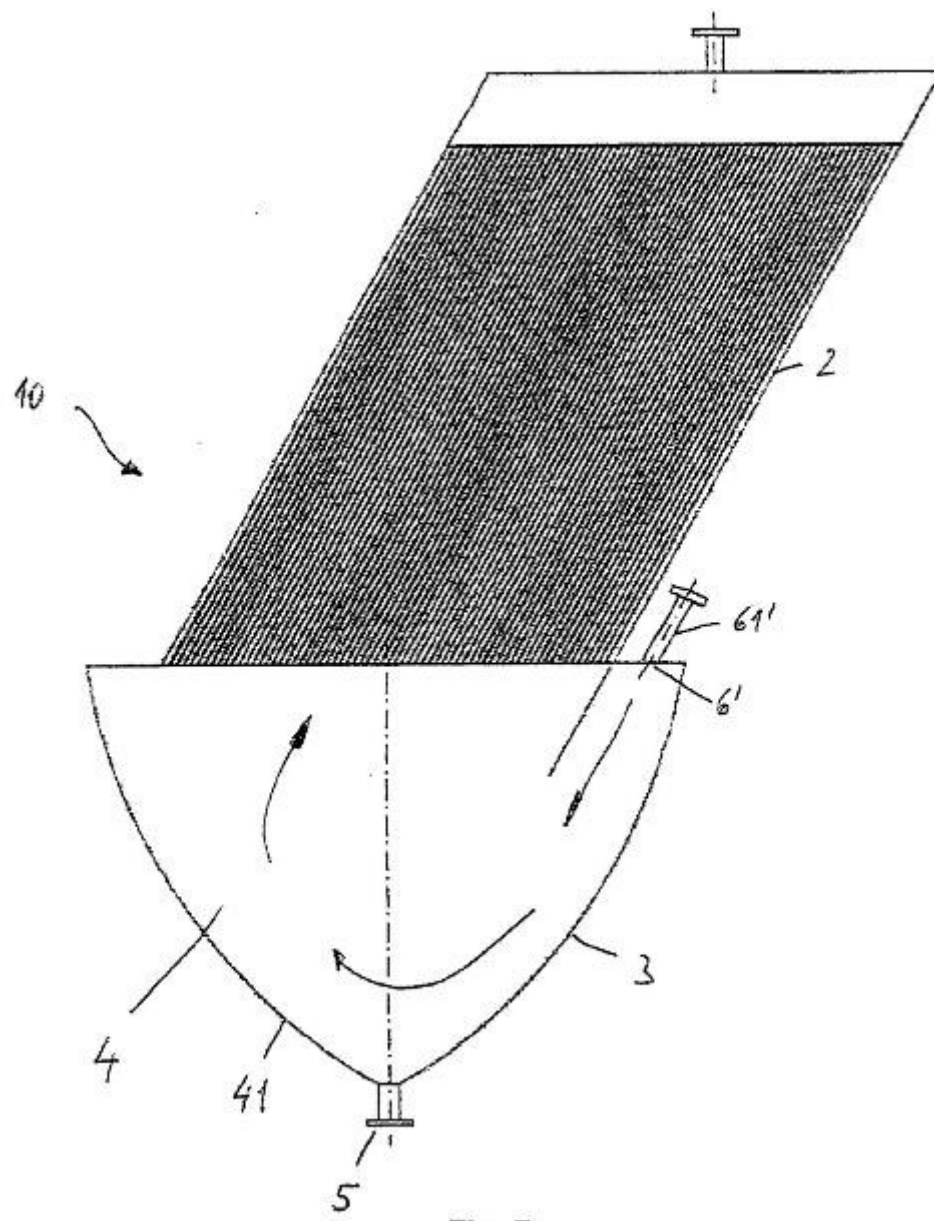


Fig. 7

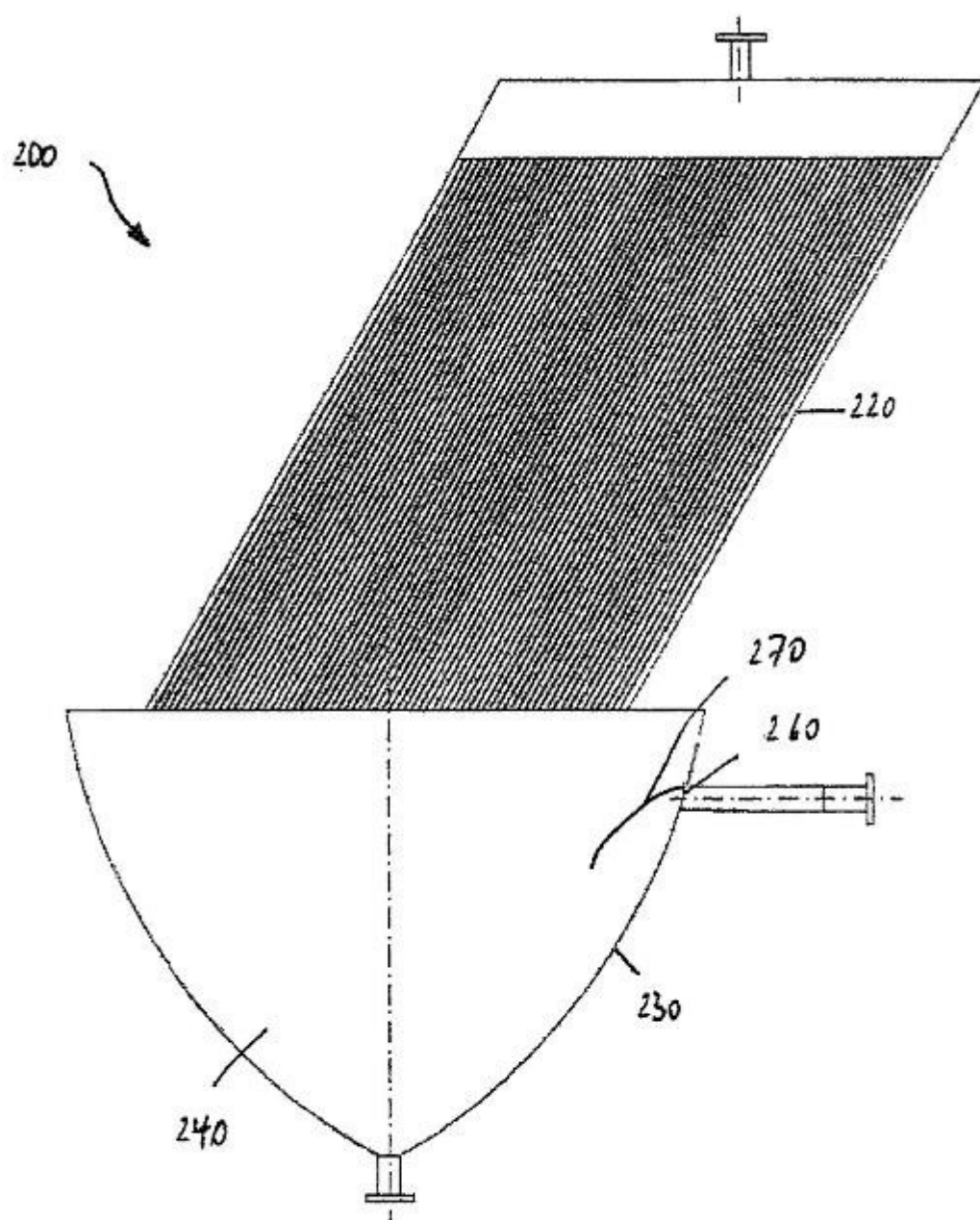


Fig. 8

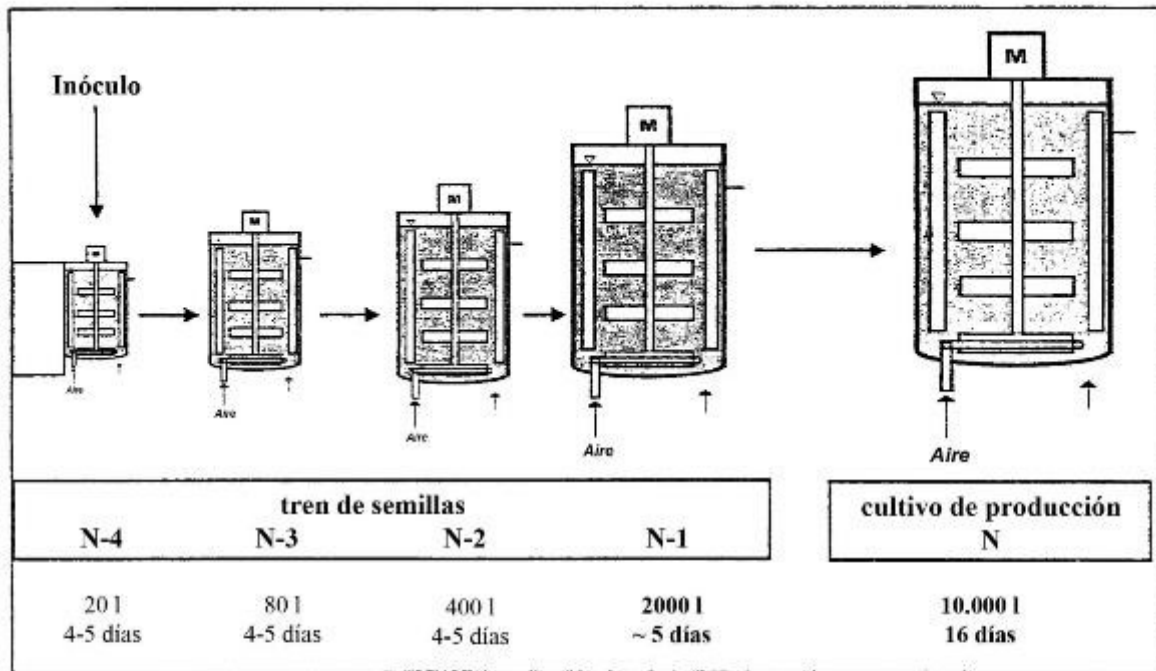


Fig. 9

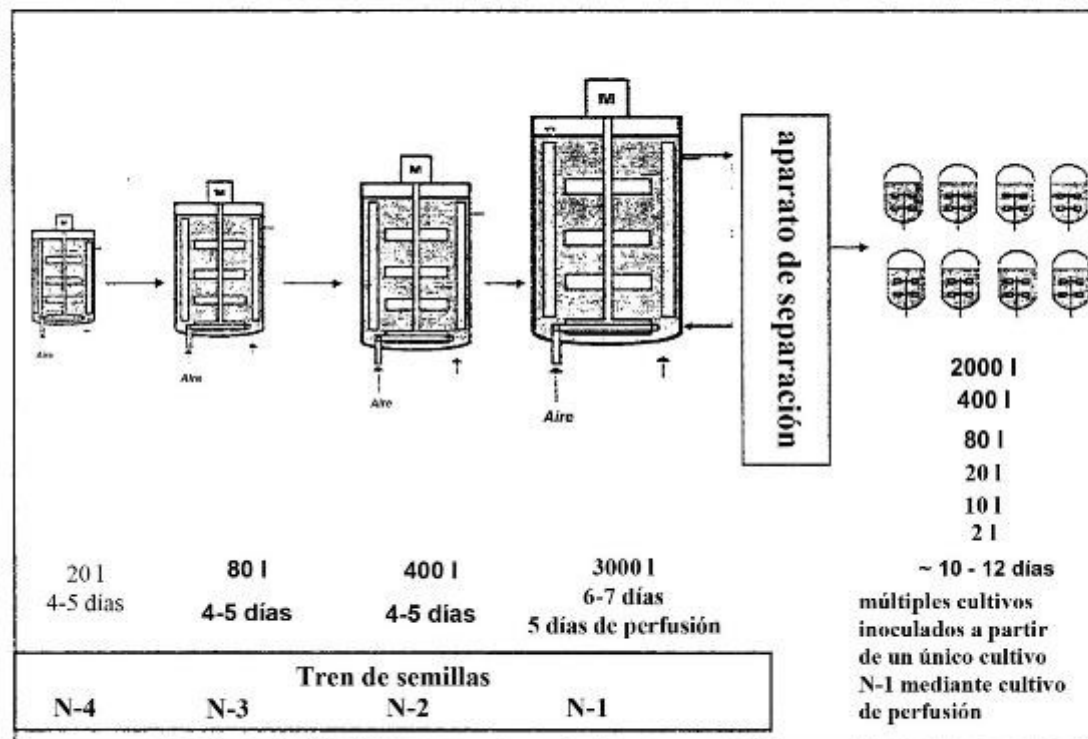


Fig. 10



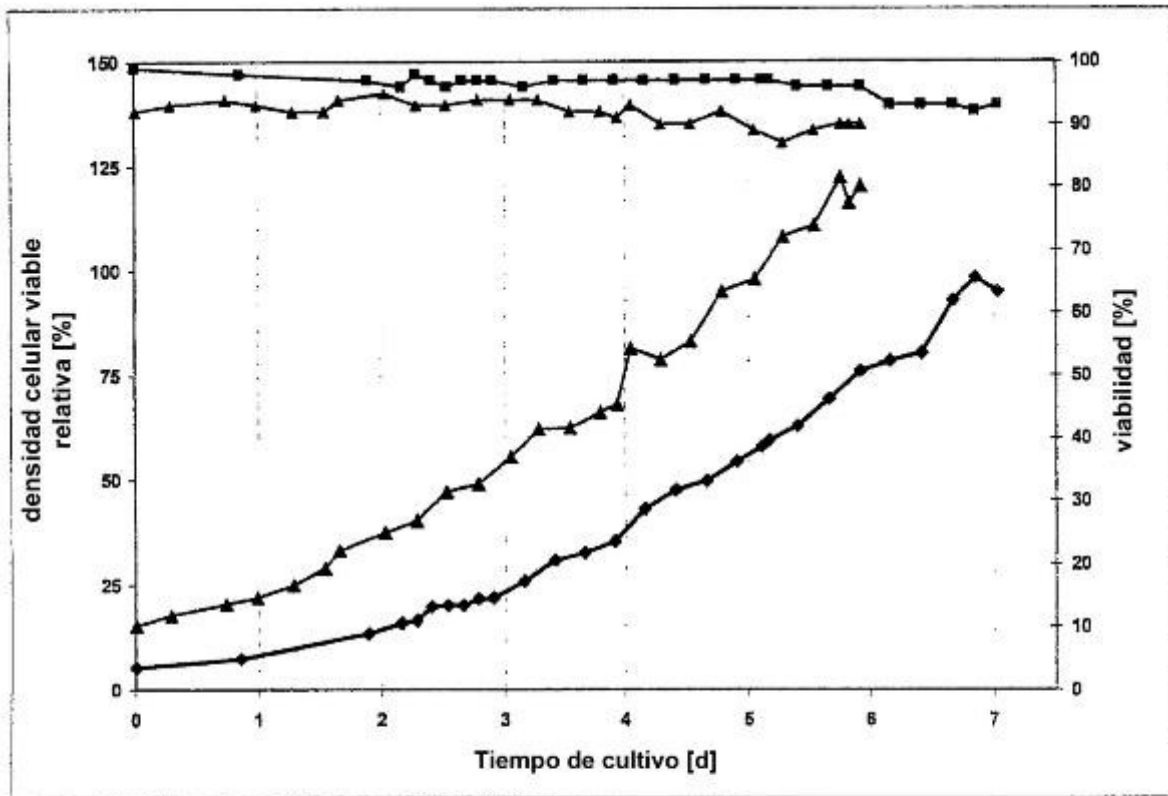


Fig. 11

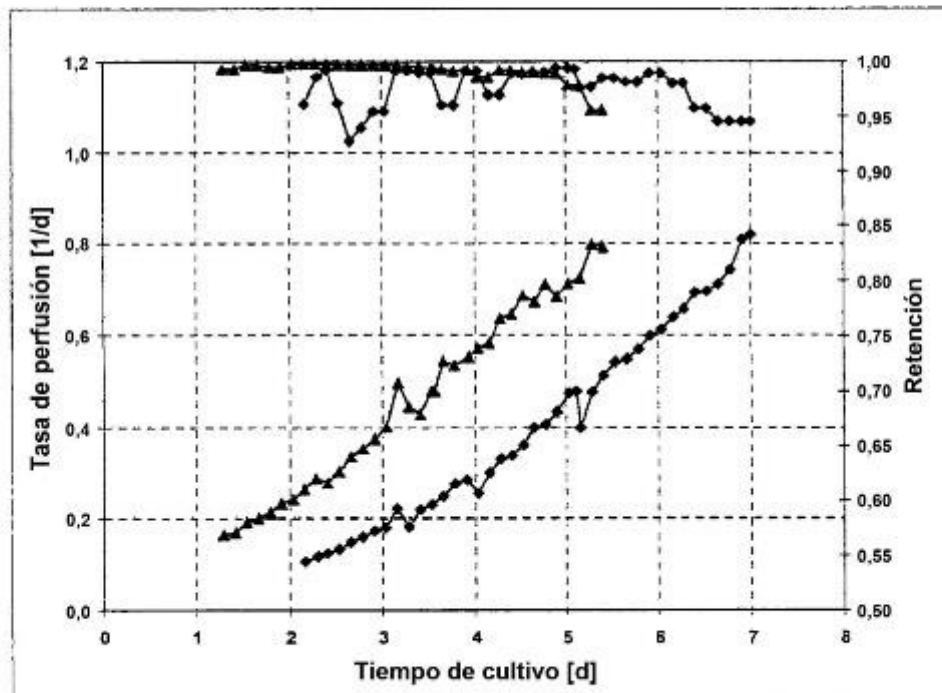


Fig. 12

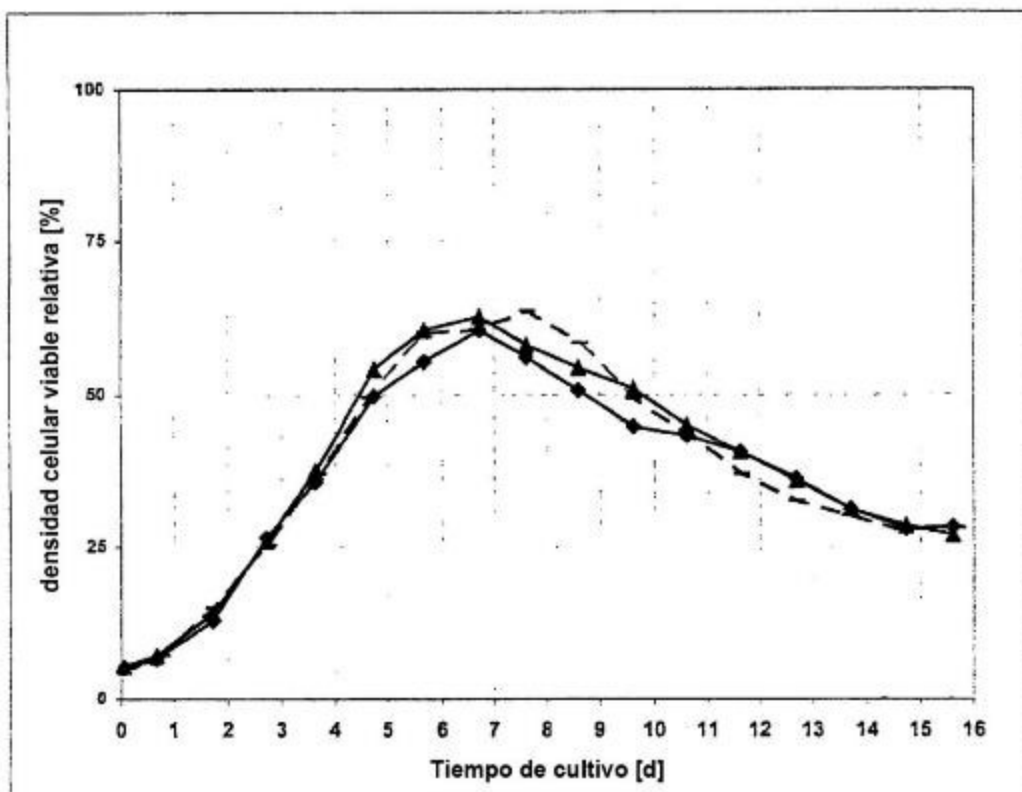


Fig. 13

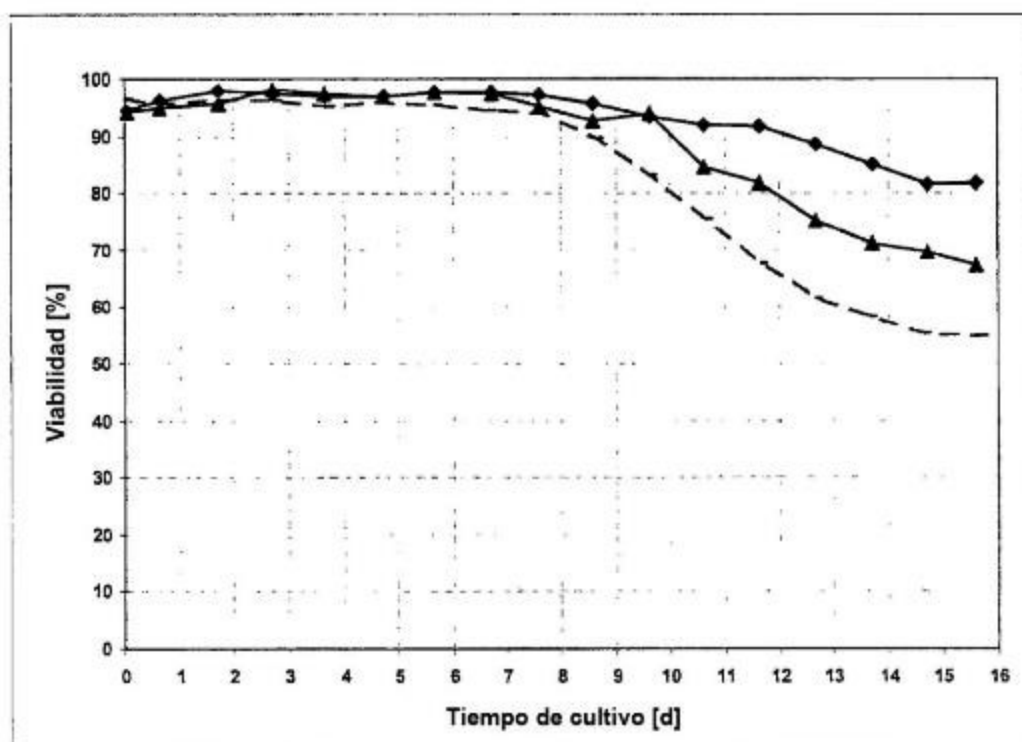


Fig. 14

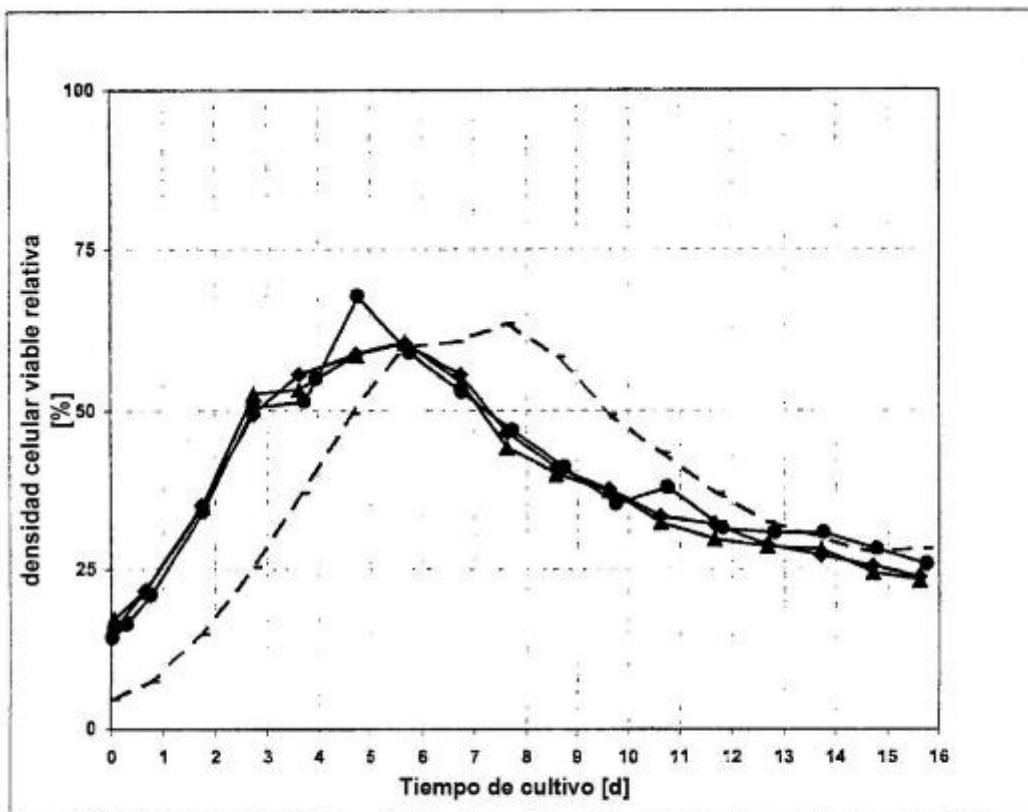


Fig. 15

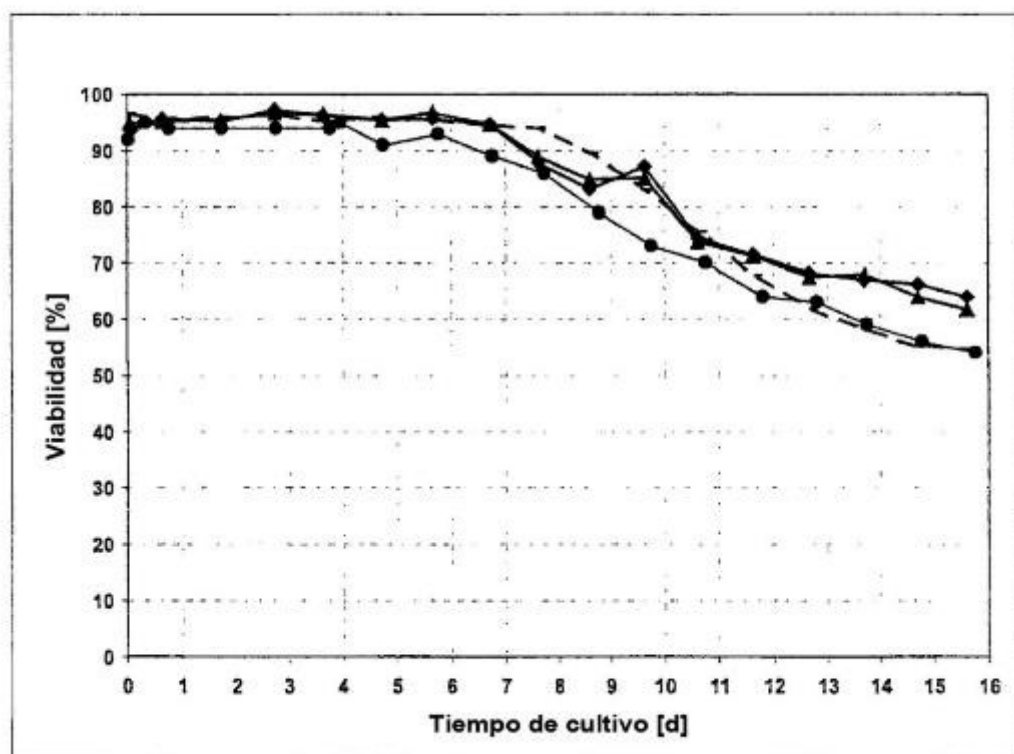


Fig. 16

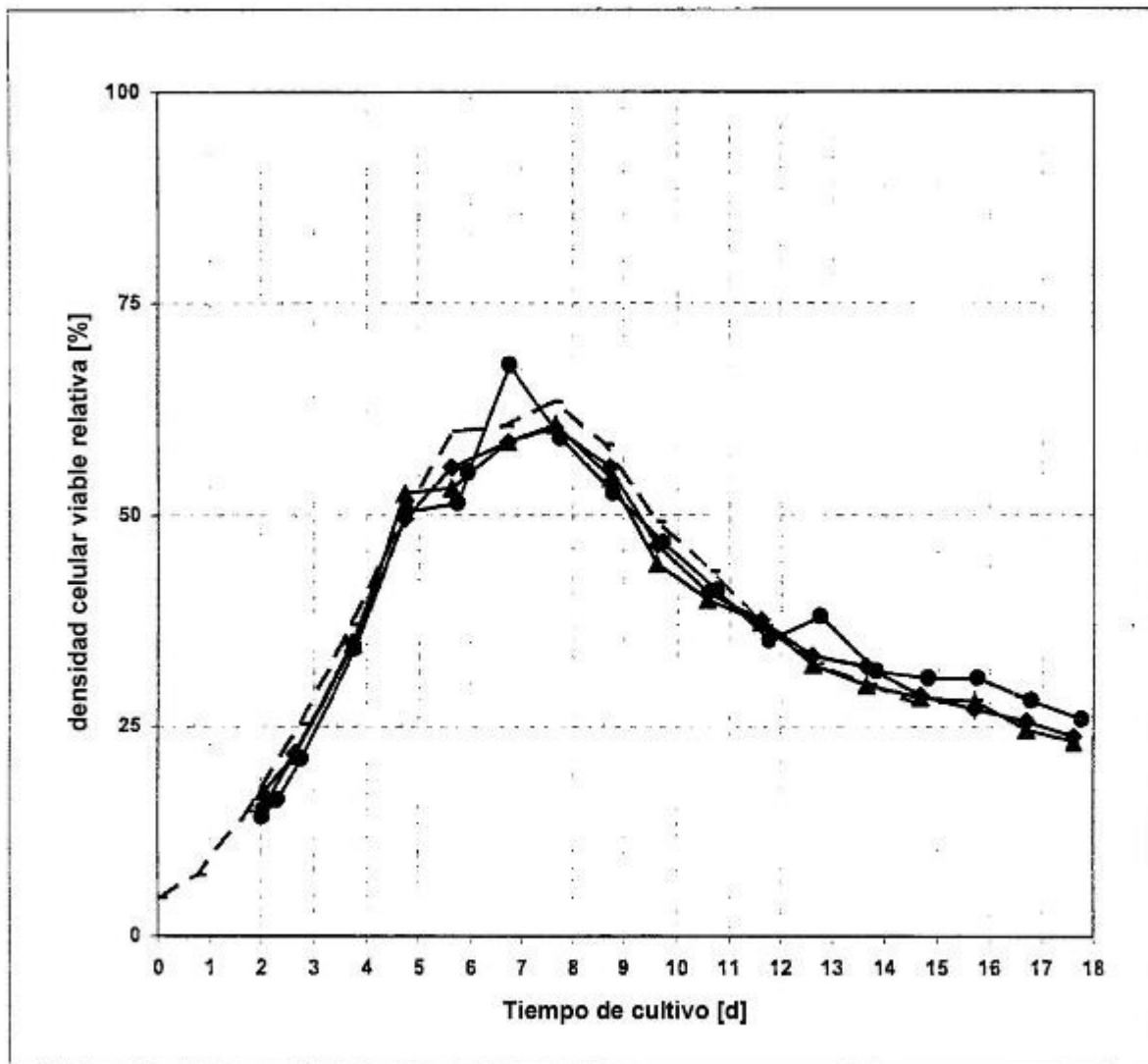


Fig. 17

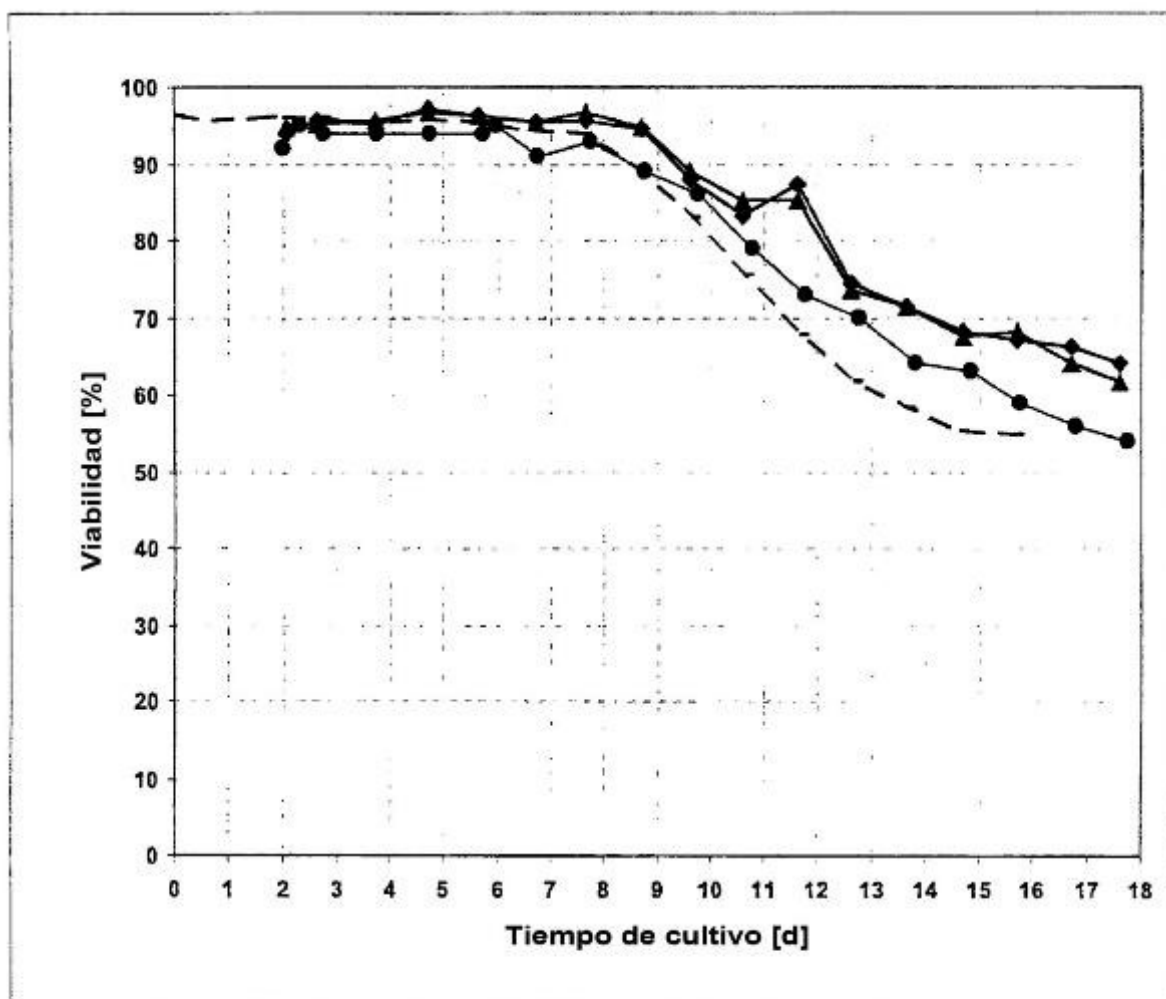


Fig. 18

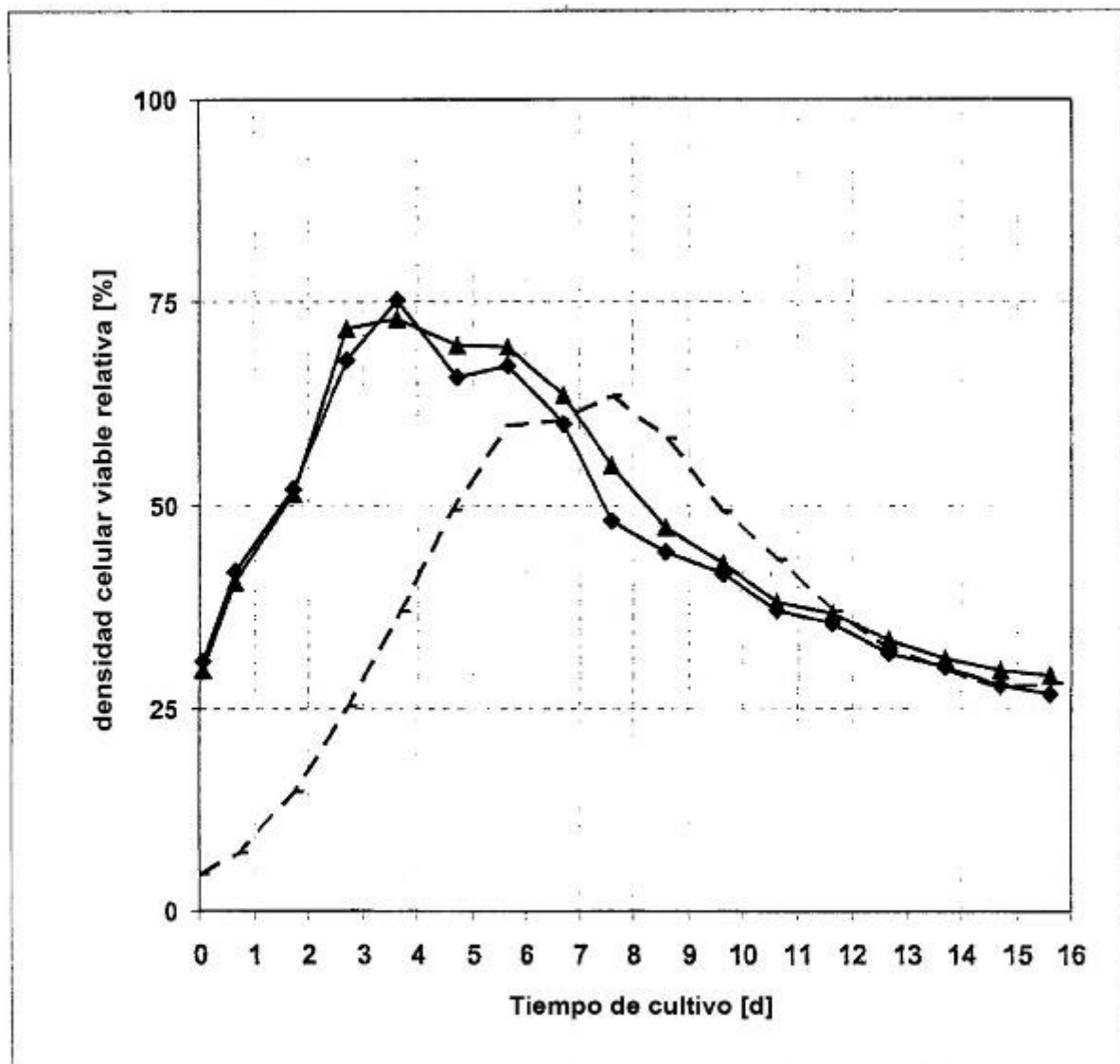


Fig. 19

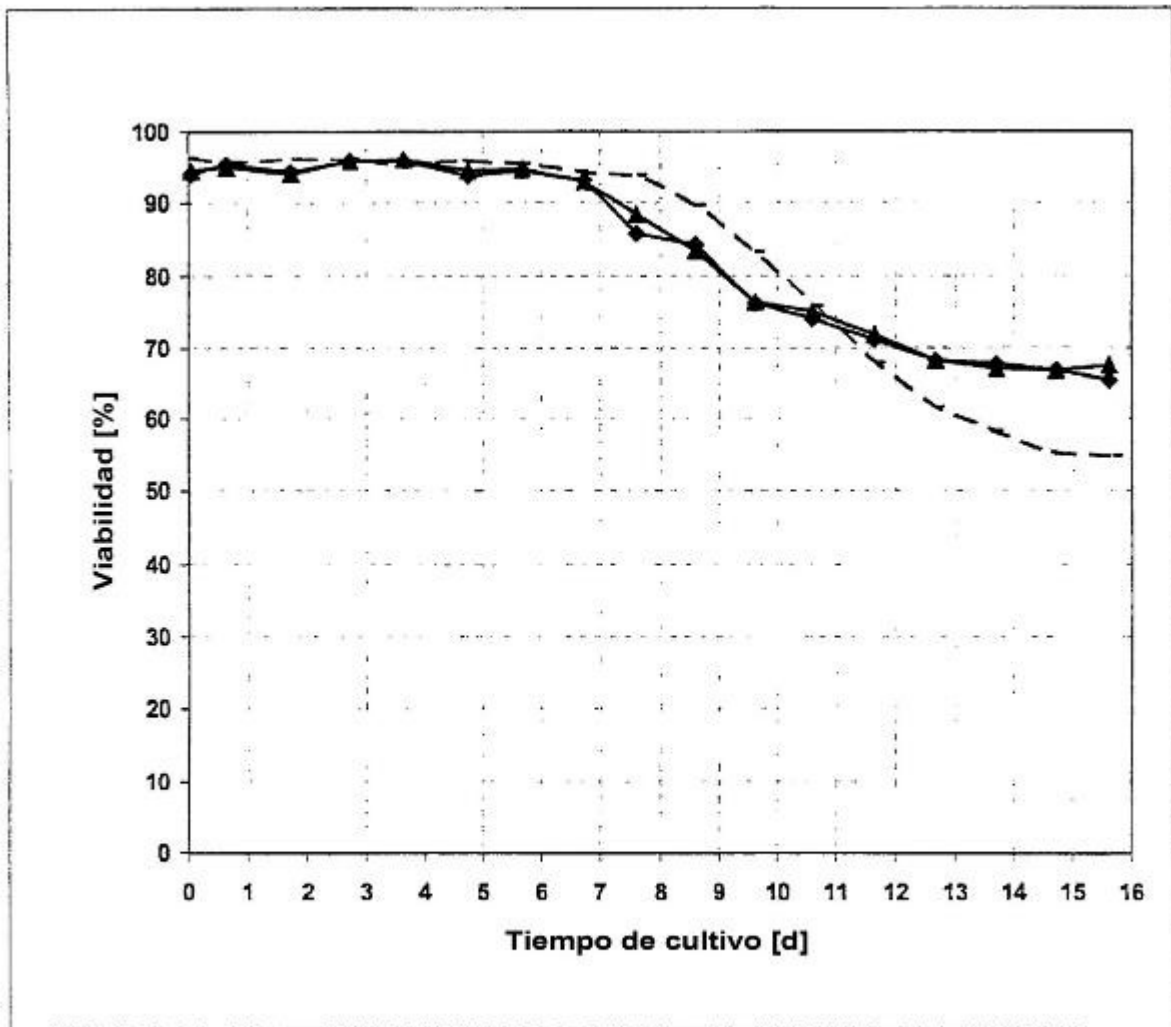


Fig. 20

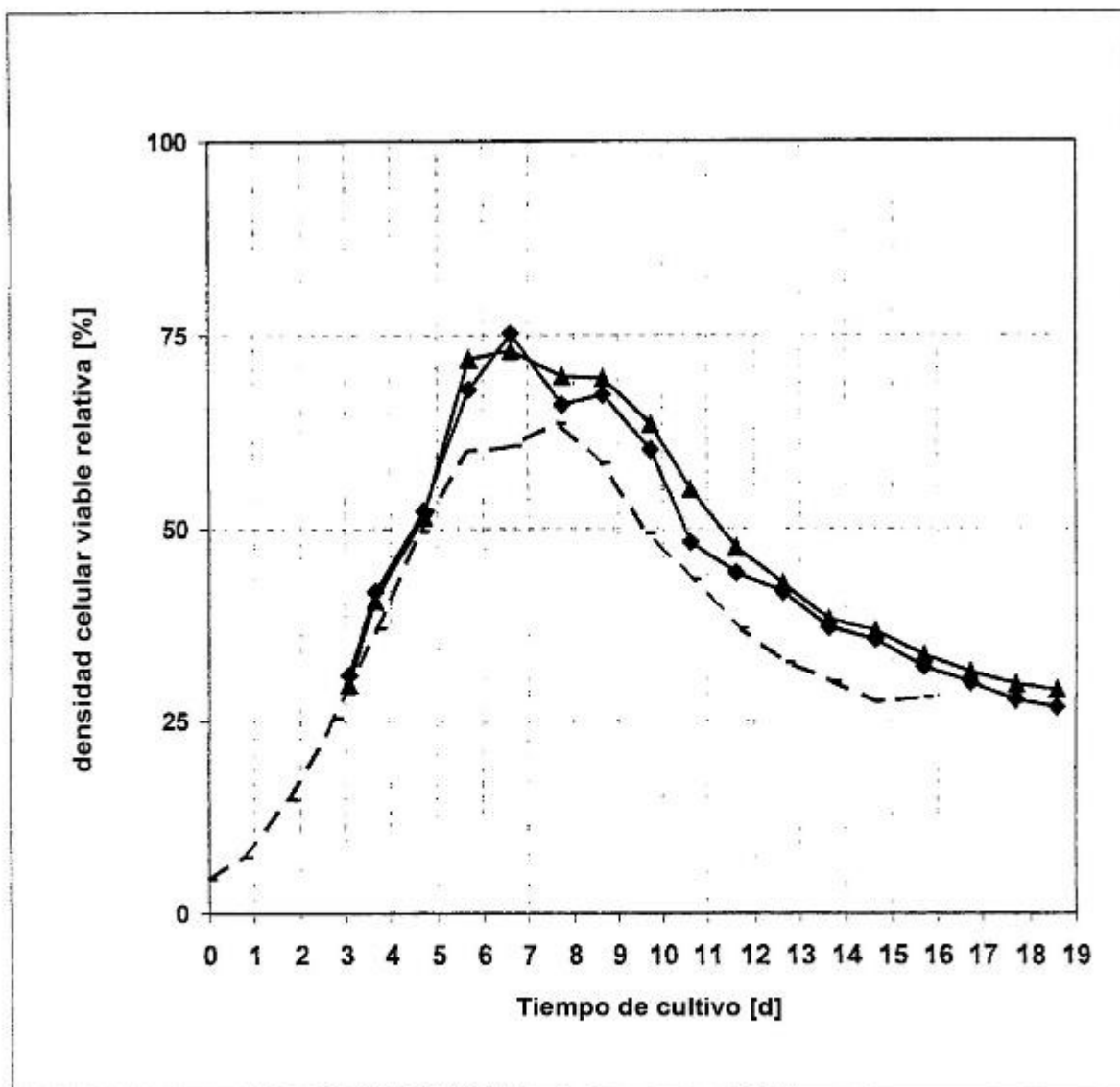


Fig. 21



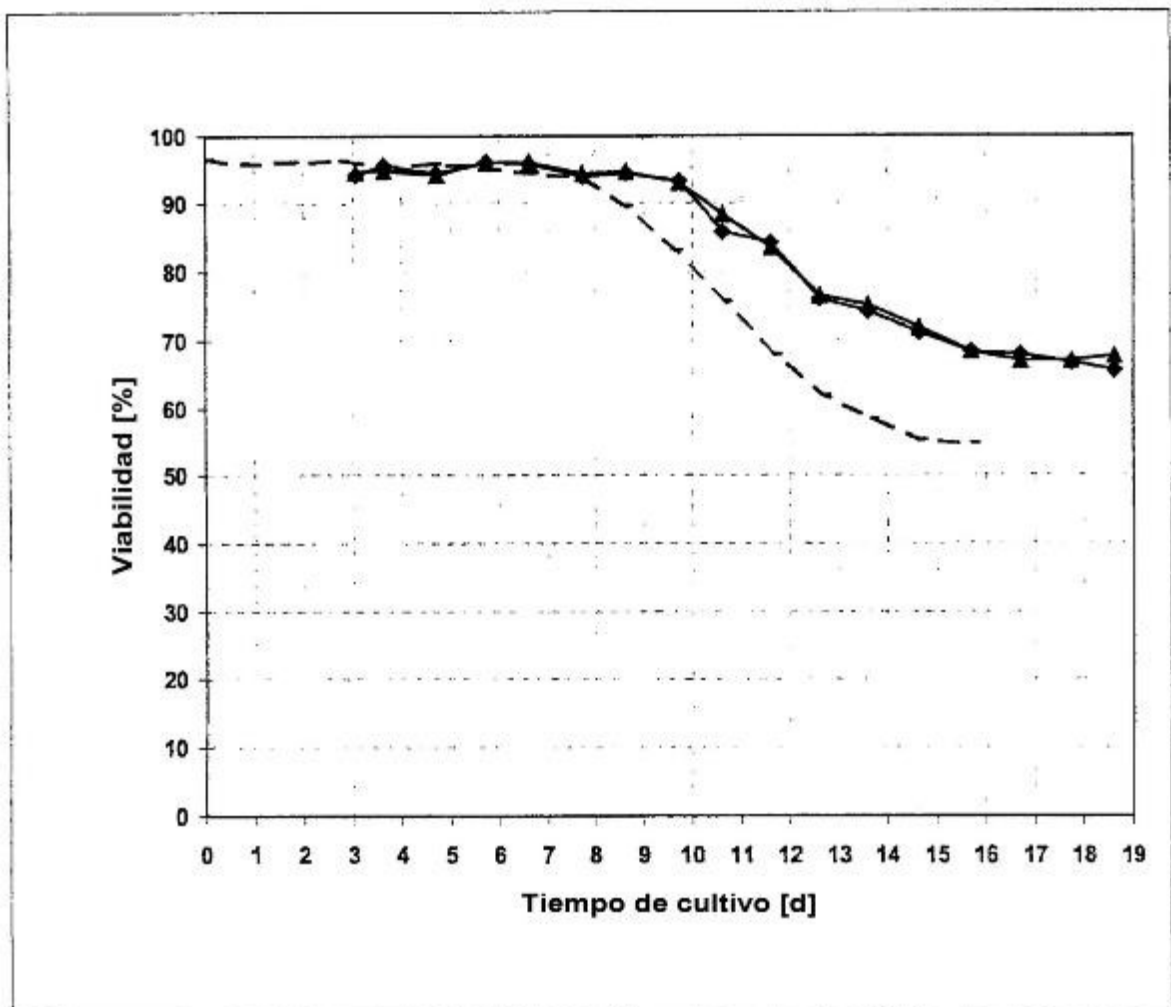


Fig. 22

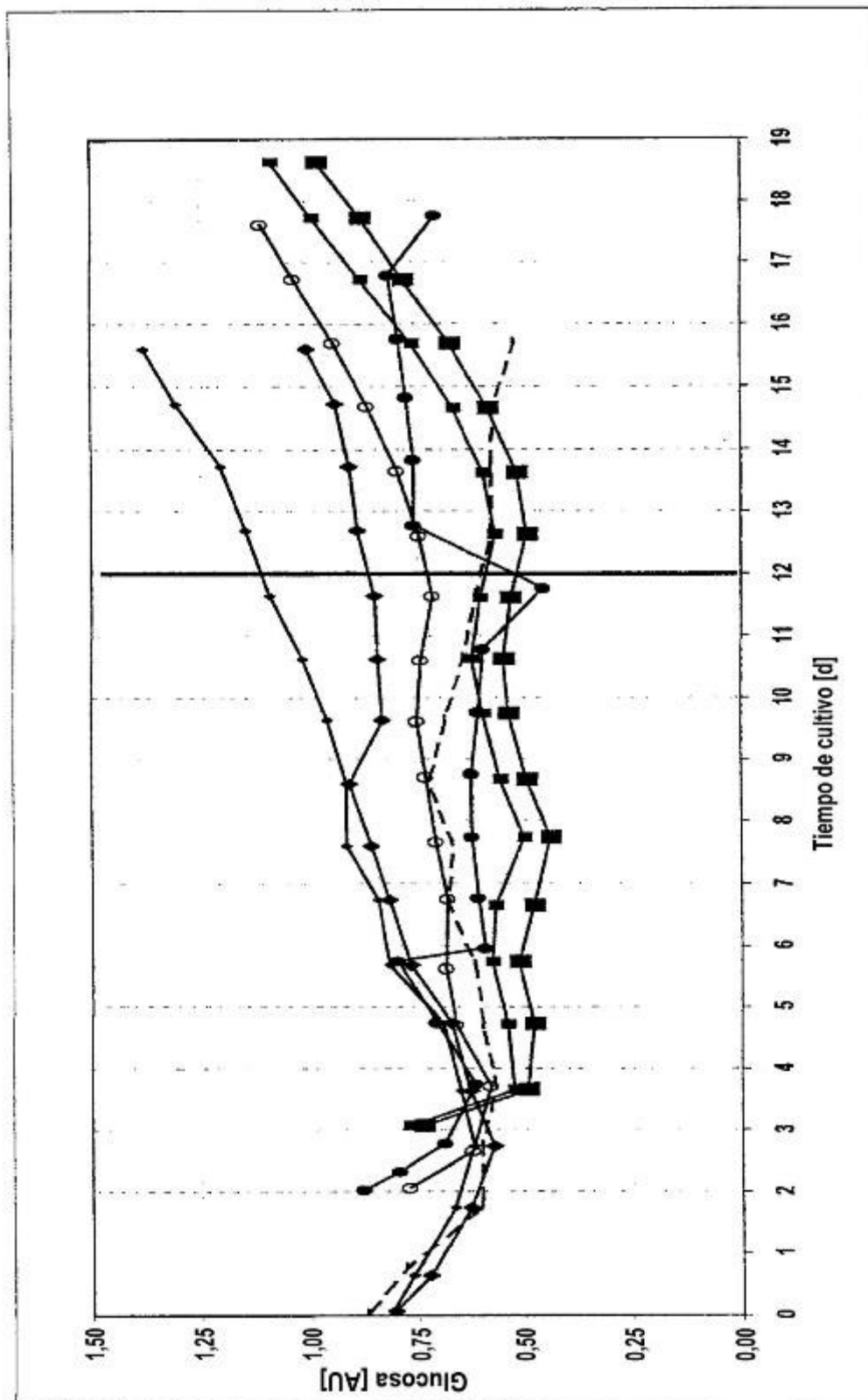


Fig. 23

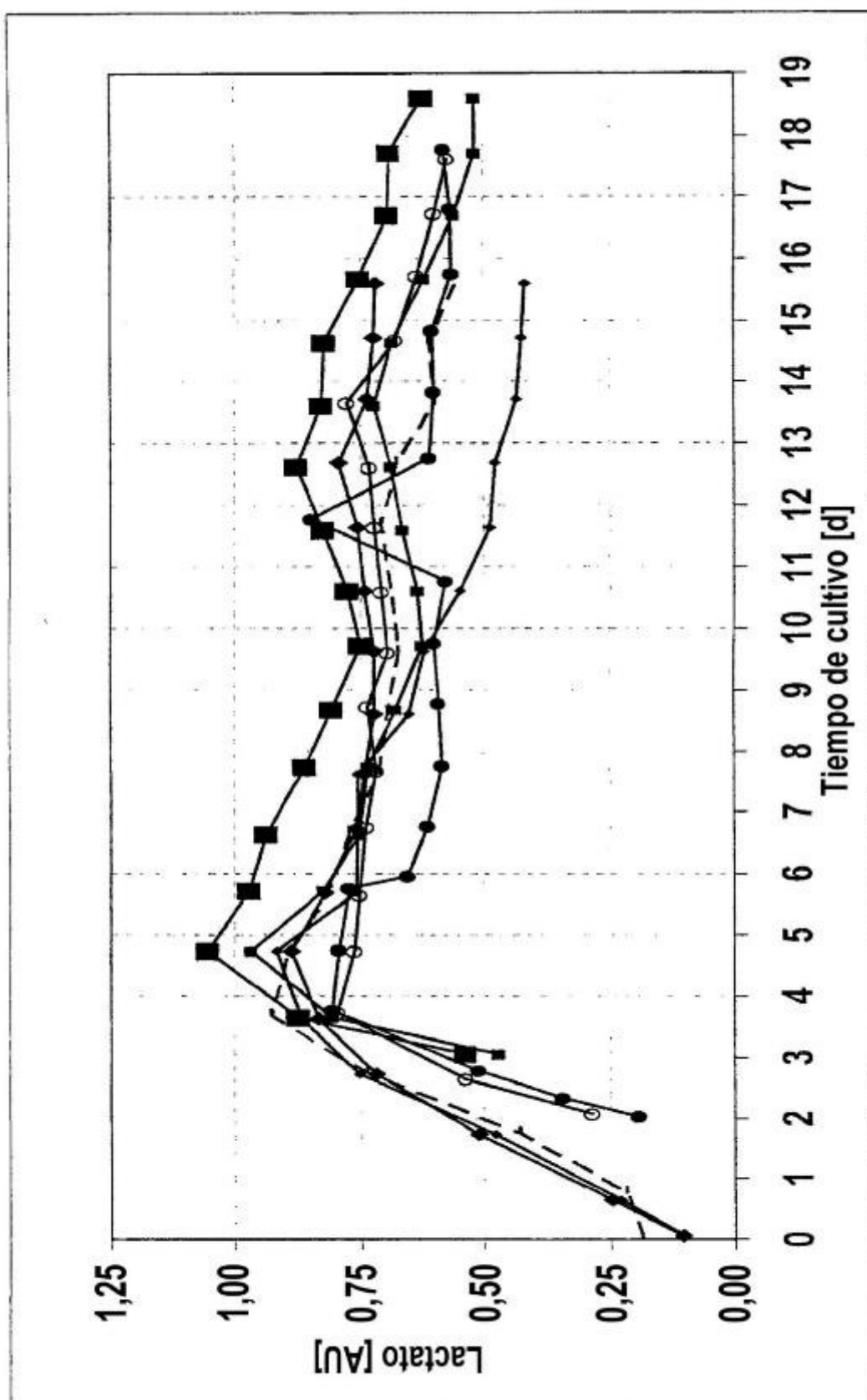


Fig. 24

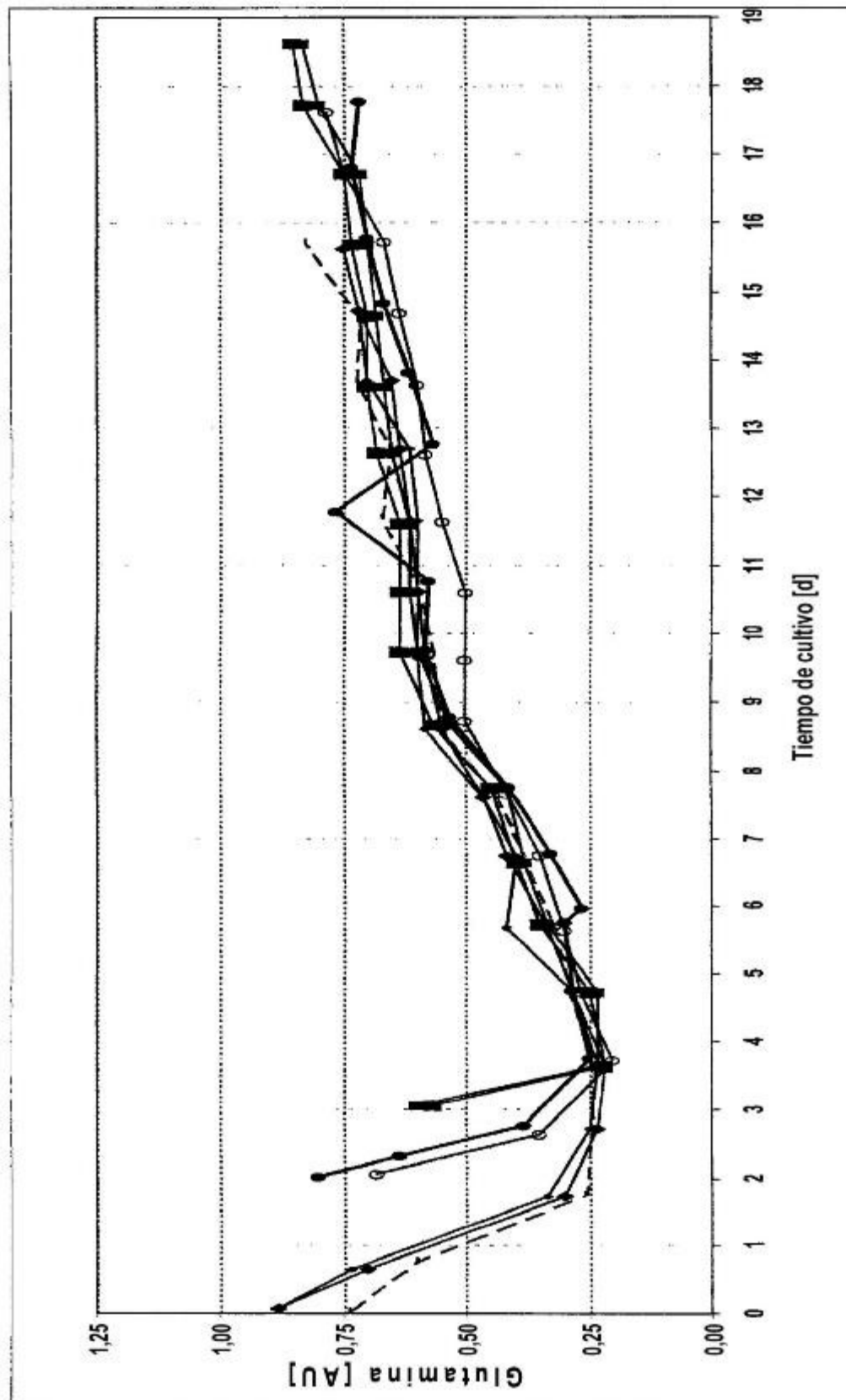


Fig. 25

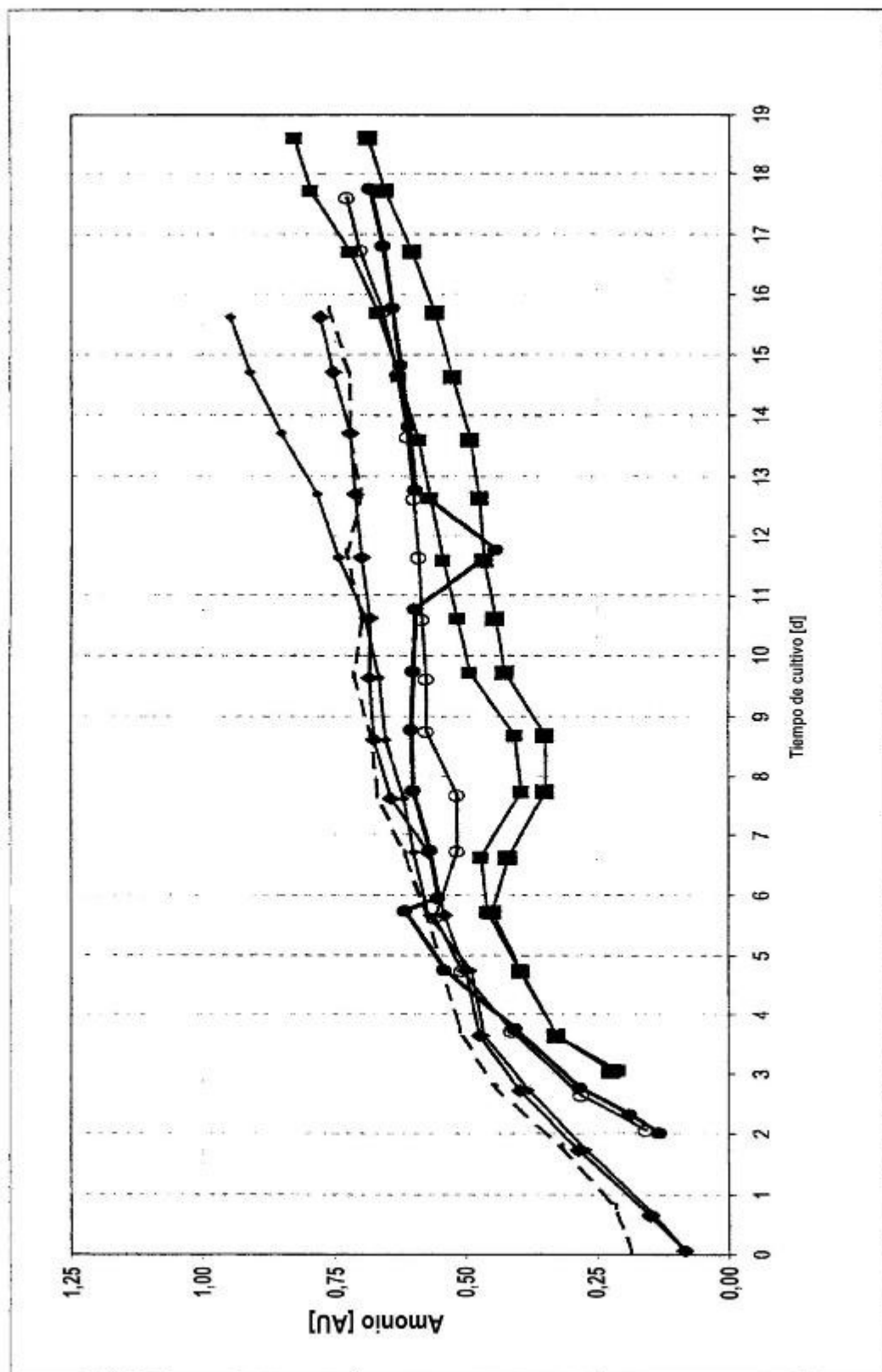


Fig. 26

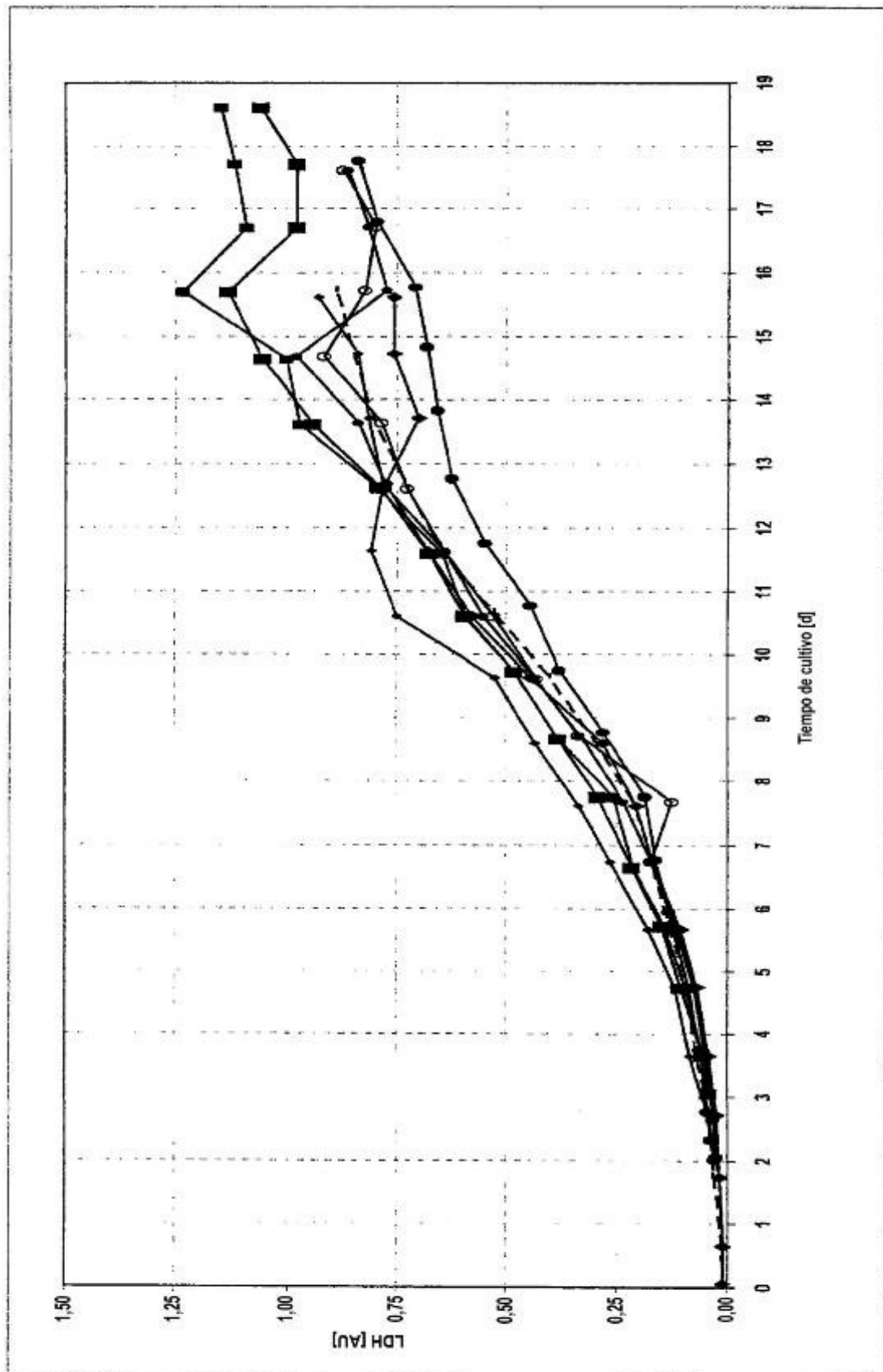


Fig. 27

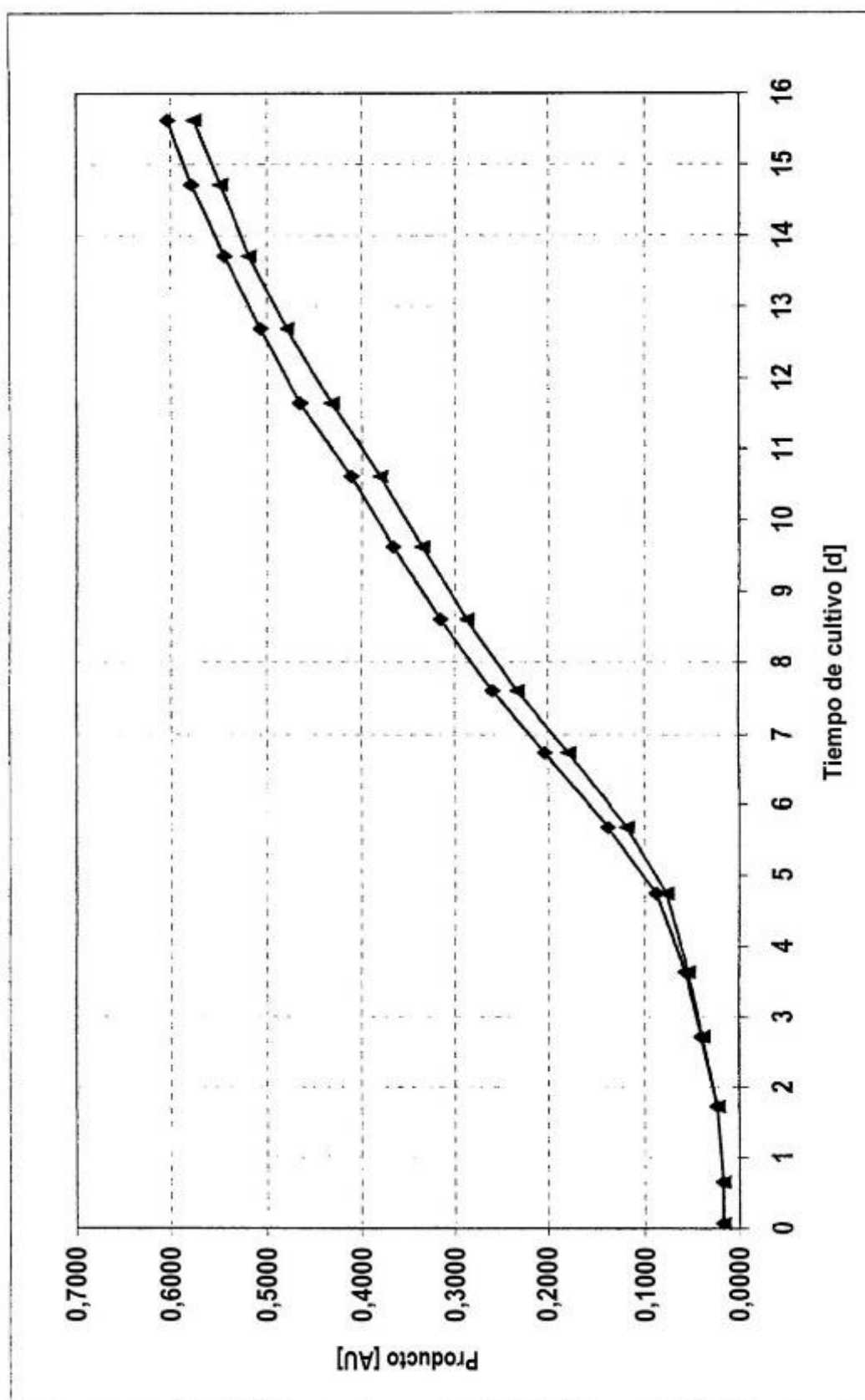


Fig. 28

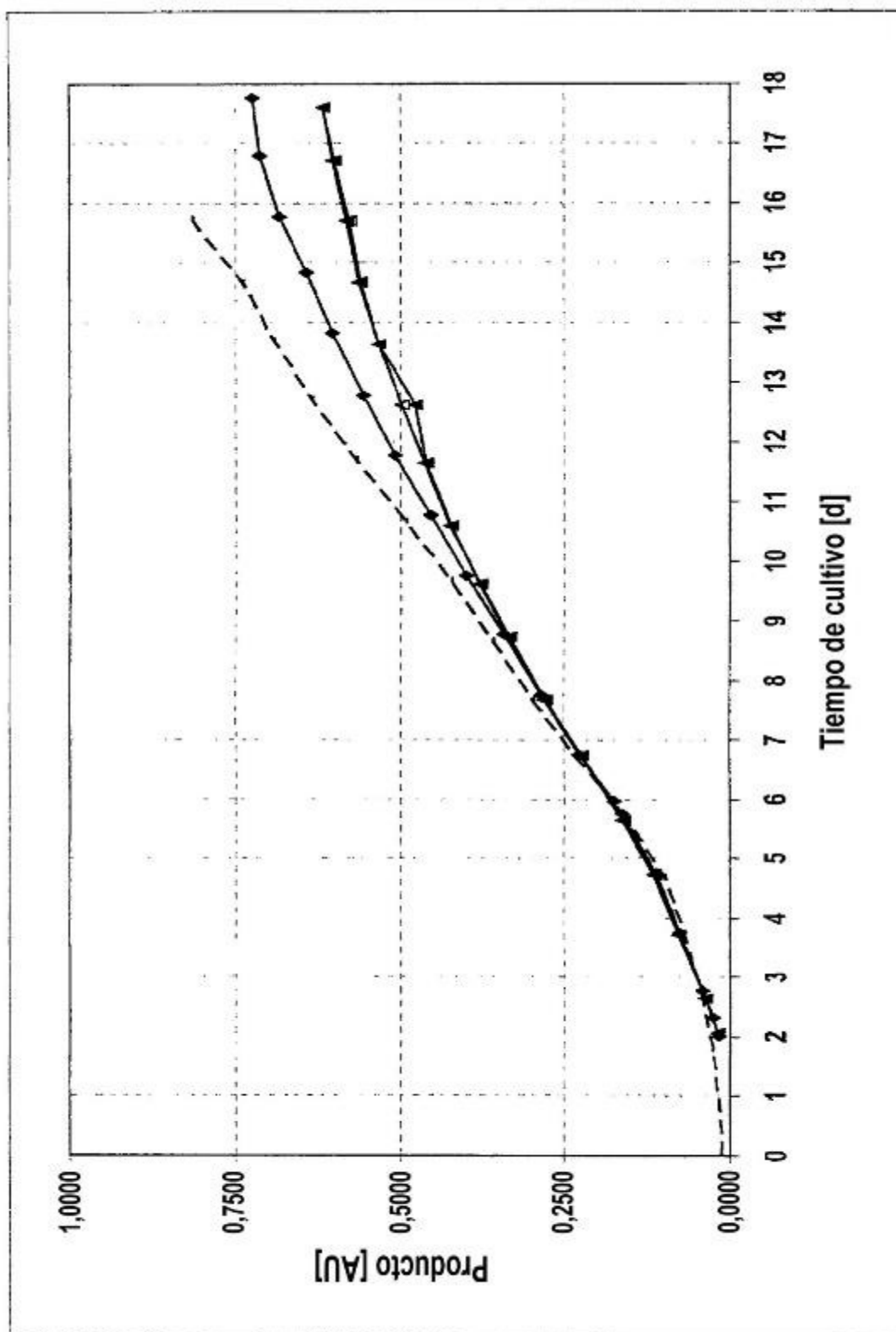


Fig. 29



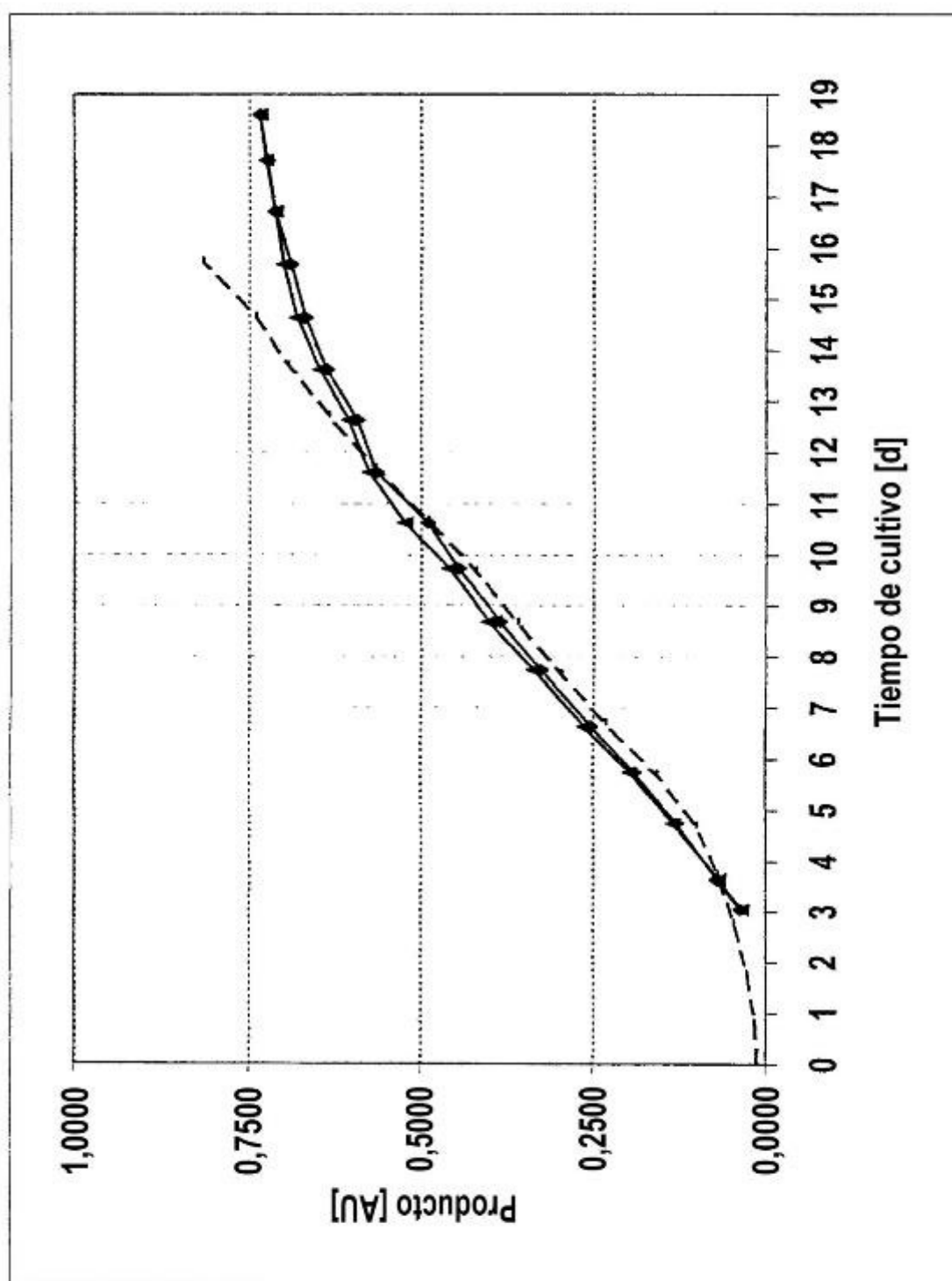


Fig. 30