(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 299 837**

(51) Int. Cl.:
C12M 3/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **04738699 .0**
(86) Fecha de presentación : **14.06.2004**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1756263**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

(54) Título: **Reactor de exposición a fases líquida y gaseosa para el cultivo de células.**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

(73) Titular/es: **ProBioGen AG.**
Goethestrasse 54
13086 Berlin, DE

(72) Inventor/es: **Marx, Uwe;**
Riedel, Marco y
Bushnaq-Josting, Hikmat

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Reactor de exposición a fases líquida y gaseosa para el cultivo de células.

La invención concierne a un procedimiento y un dispositivo para la cría de células y para el cultivo de células en altas densidades, en donde las células que se han de cultivar se encuentran en membranas de hilos huecos y son llevadas alternativamente a un medio nutriente líquido y a una fase gaseosa situada por encima de éste.

Estado de la técnica

El cultivo de células de mamíferos para la producción de medicamentos biofarmacéuticos se realiza predominantemente en reactores agitadores. Hasta ahora, se utilizan menos frecuentemente reactores "airlift" y muy raramente reactores de fibras huecas para atender al mercado con medicamentos basados en células de mamíferos. Para mejorar los rendimientos volumétricos de producto se incrementan en los reactores agitadores la densidad de células y el tiempo de producción efectivo de las células por optimización del medio y mediante un régimen de adición de alimento específico de la línea celular en los llamados procedimientos "fed-batch". La tecnología de producción está distribuida en cadenas de biorreactores con tres a cuatro calderas agitadoras cuyas capacidades ascienden en cada caso aproximadamente a cinco veces la del biorreactor precedente. El mayor reactor agitador disponible para el cultivo de células de mamífero tiene actualmente una capacidad de 20.000 litros. Los procesos "fed-batch" en reactores agitadores son robustos, se pueden agrandar a escala hasta los volúmenes citados y están aceptados desde hace bastante tiempo por las autoridades para la fabricación de medicamentos. Inconvenientes son los largos tiempos de permanencia de los productos en el compartimiento de cultivo, la necesidad de la separación de células del sobrante de cosechado, los gastos de limpieza y esterilización originados por el aprovechamiento múltiple y los altos costes de inversión y de explotación para fábricas equipadas con esta tecnología.

Para proteínas susceptibles de degradación, cuya fabricación presupone un pequeño tiempo de permanencia en el biorreactor, tal como, por ejemplo, el factor VII, se han desarrollado dispositivos y sistemas que permiten la perfusión del compartimiento de cultivo y, por tanto, el funcionamiento continuo de los reactores agitadores. Es necesaria para esto la eficiente retención de células junto con una continua alimentación de medio y un continuo cosechado de producto. En el compartimiento interior de la caldera agitadora se utilizan aquí filtros centrífugos, y en los casos en los que las células de producción pueden adherirse a superficies, se utilizan materiales de soporte en procedimientos de lecho fluidizado o de lecho fijo. El modo de funcionamiento continuo de calderas agitadoras puede materializarse también por medio de sistemas externos de retención de células, como, por ejemplo, sedimentación de células, centrifugado continuo de células o separación de células por ultrasonidos. Ventajas del modo de funcionamiento continuo son cortos tiempos de permanencia del producto en el biorreactor, calidad constante del producto durante la fabricación, aumento de la productividad volumétrica y flexibilización del volumen de las tandas en función del tiempo de cultivo a establecer. Desventajas son el ensuciamiento de la cosecha con células residuales, los costes de limpieza y esterilización producidos por el aprovechamiento múltiple y los altos costes de inversión y de explotación para las fábricas correspondientes.

Aparte de los reactores de fibras huecas de la ACUSYST® X Cell Generation, que se han acreditado para la fabricación de productos biofarmacéuticos, existen otros sistemas de reactores en los que todos los componentes que hacen contacto con el cultivo celular están diseñados como componentes de un solo uso. Éstos pueden ser desechados después de su utilización para la producción de una tanda. Se suprimen costosos procedimientos de limpieza y esterilización. Los sistemas obtenibles en el comercio son aquí sistemas basados en membranas, como, por ejemplo, CellPharm®, Cellmax®, Technomouse®, CELLine®, miniPERM® u OptiCell®. Los procedimientos de membrana poseen varias ventajas. En el funcionamiento de percusión se pueden conseguir -debido a una gran superficie de membrana por unidad de volumen- unas densidades de células muy altas (10^7-10^8 c/ml). Además, las células están protegidas por las membranas contra fuerzas de cizalladura. Fundamentalmente, se basan en el principio de un solo uso, de modo que se suprimen la limpieza y la esterilización después de la utilización. Para la fabricación biofarmacéutica ha dado buenos resultados en el dominio de los biorreactores de un solo uso el llamado biorreactor "wave", hasta ahora todavía en las fases de pruebas. Las células se cultivan en el sistema dentro de un sistema de bolsas movidas deliberadamente para mejorar el mezclado a fondo. Ventaja de esta técnica de reactor es la posibilidad de un solo uso del sistema de cultivo. Inconvenientes son las pequeñas densidades de células obtenibles y el limitado agrandamiento a escala.

En todos los procedimientos y dispositivos citados en suministro uniforme de materias nutrientes y especialmente el suministro de oxígeno son problemáticos a altas densidades de células. Tanto el intento de resolver este problema mediante complejos pasos de procedimiento con solicitación de presión (1989, US 4,804,628 A) como la introducción de directa de oxígeno en el compartimiento de cultivo celular a través de otro sistema de membrana (1986, DE 24 31 450 A1 y 1995, DE 42 30 194 A1) no han conducido a sistemas de cultivo que se puedan agrandar a voluntad a escala, en los que puedan alimentarse uniformemente las células. En biorreactores de fibras huecas en los que se cultivan las células entre las fibras huecas y se transportan las materias nutrientes en el lumen de las fibras, el agrandamiento a escala viene limitado por la longitud de las fibras huecas. Sin embargo, la longitud de las fibras huecas viene limitada por el consumo del oxígeno procedente de dichas fibras huecas. Un agrandamiento a escala es posible así solamente por paralelización. Sin embargo, esto conduce en la práctica a procesos poco rentables, es decir que la escalabilidad de los biorreactores de fibras huecas deja de proporcionar un abastecimiento homogéneo adecuado de las células con componentes frescos de materias nutrientes gaseosas y líquidas.

Se ha propuesto en la solicitud de patente WO 03/064586 A2 cultivar células en alta densidad dentro de cámaras, no sobrepasando las cámaras en una dimensión la longitud de 5 mm. El espacio interior de las cámaras forma un compartimiento de cultivo que está separado del espacio de suministro en forma semipermeable. Las células son retenidas en las cámaras y el intercambio de materia se efectúa a través de membranas de fibras huecas. El abastecimiento de las células con materias nutrientes y con oxígeno se garantiza por medio de una mezcla de gas/medio de cultivo de células que se puede ajustar en forma variable. Aun cuando el dispositivo de cultivo y el procedimiento resuelven los problemas del abastecimiento de materias nutrientes y de oxígeno y garantizan la escalabilidad, un inconveniente del procedimiento descrito en el documento WO 03/064586 A2 consiste en que se tienen que introducir células de alta densidad en las cámaras. Para eliminar este inconveniente se propone en la solicitud de patente WO 03/102123 A2 utilizar geles biodegradables para reducir la densidad de inoculación al comienzo del cultivo.

Un biorreactor de exposición a fases líquida y gaseosa ha sido desarrollado en principio por la firma Zellwerk® y es distribuido por la firma Sartorius®. En este biorreactor las células que se adhieren a superficies están inmovilizadas sobre discos de material de soporte. Los discos están dispuestos uno tras otro sobre un eje y son hechos girar dentro de un cilindro lleno de medio hasta la mitad y de gas hasta la otra mitad. Ventaja de esta disposición es la exposición cíclica de estas células en las dos fases. Inconvenientes son la limitación del sistema y del procedimiento a células adheridas, la permanencia de células desprendidas en el líquido de cosechado y la limitación en el agrandamiento a escala.

Problema de la invención

El problema de la invención consiste en mejorar aún más el procedimiento descrito en WO 03/064586 A2.

Solución del problema

El problema - tal como se formula en las reivindicaciones - ha sido resuelto. Según la invención la cría y cultivo de células se realiza en un biorreactor de exposición a fases líquida y gaseosa que comprende un compartimiento de suministro en el que se encuentran membranas de hilos huecos con un diámetro interior de no más de 5 mm y cuyo volumen interior está formado por cámaras de cultivo. Se ejecutan los pasos siguientes del procedimiento:

- introducción de las células en las cámaras de cultivo,

- llenado de aproximadamente la mitad del compartimiento de suministro con medio nutriente y de la otra mitad con una mezcla gaseosa,

- inclusión simultánea o decalada de la perfusión de medio y de gas,

- exposición cíclica de las membranas de hilos huecos y de las células contenidas en ellas en las fases de gas y de líquido.

Según una variante de realización preferida del procedimiento conforme a la invención, las membranas de hilos huecos están dispuestas horizontalmente en el biorreactor. Después del llenado del reactor, la mitad de las membranas queda cubierta con medio nutriente. Haciendo girar el reactor 360º en una dirección y a continuación en la otra dirección, se consigue la exposición cíclica de las membranas de hilos huecos y, por tanto, de las células en las fases de gas y de líquido.

El giro en una dirección y a continuación en la otra impide que se retuerzan los tubos flexibles conectados al reactor.

Para conseguir respectivos tiempos de exposición idénticos en las fases gaseosa y líquida se procede según la invención a interrumpir el giro después de 180º durante un tiempo determinado. Los tiempos de paro son ajustables en forma variable. Se garantiza así que las células sean abastecidas suficientemente con materias nutrientes durante la estancia de las membranas en el medio nutriente líquido y sean abastecidas suficientemente con oxígeno durante la estancia en la fase gaseosa. Al mismo tiempo, variando los tiempos de paro se pueden tener en cuenta las necesidades individuales del metabolismo de las distintas líneas celulares.

Como alternativa a esto, la exposición cíclica de las membranas de hilos huecos puede efectuarse por inmersión de dichas membranas de hilos huecos en el medio nutriente y extracción subsiguiente hasta dejarlas dentro de la fase gaseosa. Con este modo de proceder se pueden conseguir tiempos de permanencia diferentes de las células en las dos fases.

Para la ejecución del procedimiento según la invención se introducen primero células de pequeña densidad en el compartimiento de cultivo y éstas crecen después formando células de alta densidad. Mediante la utilización de geles - como se describe en la solicitud de patente WO 03/102123 A2 - es posible introducir en el compartimiento de cultivo células de densidad celular mínima junto con geles de polipéptidos reticulados que presentan una alta proporción de glutamina y/o con medios semisólidos a base de líquidos viscosos o líquidos provenientes de trozos de gel microscópicamente pequeños.

La introducción de las células en las cámaras se efectúa a través de un sistema de carga central por fuera del compartimiento de suministro, de modo que es posible la aportación simultánea uniforme de las células a todas las cámaras a través de una acometida.

El procedimiento según la invención es adecuado para cultivar protozoos, bacterias, levaduras, hongos, células vegetales o células de mamíferos.

El procedimiento es nuevo en comparación con el procedimiento descrito en la solicitud de patente WO 03/064586 A2, ya que allí no está prevista ninguna exposición de las células en dos fases diferentes, sino solamente la exposición de las células en una mezcla de gas/medio de cultivo celular que puede ajustarse en forma variable. Tampoco se describe allí ningún movimiento del reactor o de las membranas. Tampoco se obtiene en WO 03/064586 A2 ninguna indicación referente a que se muevan las membranas con las células durante tiempos determinados en las fases correspondientes. Esto se debe a que en el documento citado se necesita un equipo para generar la mezcla de gas/medio de cultivo celular ajustable en forma variable y, por tanto, un movimiento de las membranas - sobre todo una rotación - haría necesarias otras medidas complicadas respecto de las acometidas.

El dispositivo según la invención consiste en un compartimiento de suministro de dos fases (susceptible de ser cargado con gas y con medio) de forma cilíndrica o esférica, en el que - paralelamente al eje longitudinal de la envolvente cilíndrica - están fijadas en las placas extremas unas membranas polímeras de hilos huecos de microfiltración para retención de células con un diámetro interior de no más de 5 mm, cuyo volumen interior está formado por cámaras de cultivo en las que se encuentran las células que se han de cultivar, conteniendo el compartimiento de suministro una fase de gas que puede ser recorrida con una mezcla gaseosa y una fase de líquido que puede ser recorrida con medio de cultivo, teniendo cada membrana de hilos huecos, en toda la longitud del cilindro, una distancia de al menos 0,5 mm a la membrana inmediata de hilos huecos, estando las membranas de hilos huecos dispuestas simétricamente con respecto a una sección transversal imaginaria a lo largo del eje de rotación del cilindro y no encontrándose membranas sobre un plano imaginario de sección transversal a lo largo del eje de rotación del cilindro.

Las membranas son permeables para todas las materias, pero no para todas las células. El compartimiento de cultivo, que está constituido por el volumen total de las cámaras, está separado del compartimiento de suministro por medio de la membrana. Esto permite que los substratos de suministro entren en el compartimiento de cultivo y alimenten las células. El sistema de separación permite también que pasen productos de las cámaras de las células al entorno de suministro.

Las membranas consisten en polímeros, por ejemplo en polisulfona, polietersulfona o policarbonato. Se han manifestado como especialmente adecuadas membranas de hilos huecos hechas del material biocompatible polietersulfona que presentan espesores de pared de membrana inferiores a 300 μm, permeabilidad al agua superior a 6 $m^3/m^2*h*bar$ y un diámetro de poros de 0,1 a 1,0 μm.

Para impedir la formación de películas de líquido y, por tanto, para la exposición uniforme de las membranas en la fase gaseosa, estas membranas tienen una distancia mínima entre ellas.

Las membranas están dispuestas preferiblemente en forma exagonal. Esto significa que cada membrana - con excepción de las que se encuentran en los bordes exteriores - está rodeada por 6 respectivas membranas a la misma distancia de la membrana central. Se puede garantizar así la más alta densidad de empaquetamiento uniforme en el compartimiento de suministro. No son necesarios otros equipos que requieran espacio.

Las membranas de hilos huecos están dispuestas simétricamente con respecto a una sección transversal imaginaria a lo largo del eje de rotación del cilindro - que representa prácticamente el límite de fases -. Sobre el plano de la sección transversal imaginaria a lo largo del eje de rotación del cilindro no se encuentran membranas. Se asegura así que durante los tiempos de paro todas las membranas se encuentren completamente en la fase gaseosa o completamente en la fase líquida.

El dispositivo según la invención es nuevo en comparación con el dispositivo descrito en el documento WO 03/064586 A2, ya que allí no está prevista una explotación de dos fases. Además, el dispositivo de la invención no necesita ningún equipo especial para la generación de una mezcla de gas/medio y para la separación de líquido de la mezcla de gas/medio consumida.

Cada placa extrema del cilindro contiene al menos dos acometidas para la entrada y la salida de gas, las cuales se encuentran respectivamente por encima y por debajo del plano de la sección transversal imaginaria, con lo que queda garantizado el suministro continuo de gas incluso bajo rotación del cilindro alrededor de su eje de rotación.

Asimismo, en las superficies de cabeza se encuentran al menos sendas acometidas de tubo flexible para la perfusión del medio y al menos sendos accesos al compartimiento de cultivo para la siembra celular.

Además, están contenidos tubos flexibles, humectadores de gas, una trampa de medio en el trayecto de gas, una unidad de ultrafiltración en el trayecto de cosechado de producto, una unidad de equipamiento físico, bombas, unidades de medida y regulación, así como un motor de accionamiento y un bastidor que hace posible el montaje y la rotación del dispositivo.

La unidad de ultrafiltración dispuesta en un trayecto de cosechado de producto sirve para la concentración del respectivo producto.

Sorprendentemente, se ha comprobado que con el dispositivo según la invención se han podido lograr una mayor densidad celular y, por tanto, un mayor rendimiento de productos celulares que con el dispositivo según el documento WO 03/064586 A2. Esto se puede atribuir, por un lado, al aprovechamiento óptimo del espacio y, por otro, al abastecimiento mejorado de las células por exposición cíclica de las membranas de hilos huecos en las dos fases.

Como alternativa a esto, las acometidas para el suministro de gas pueden estar montadas no en las superficies de cabeza, sino en la envolvente cilíndrica, por encima y por debajo del plano de la sección transversal imaginaria.

El uso del dispositivo según la invención reside en el cultivo de células en altas densidades y en la obtención de productos celulares, constituyentes celulares, virus, proteínas o sustancias de bajo peso molecular, por ejemplo medicamentos y reactivos de diagnóstico y de investigación.

Las características de la invención se desprenden de los elementos de las reivindicaciones y de la descripción, representando tanto características individuales como varias características en forma de combinaciones unas realizaciones ventajosas para las que se solicita protección con este documento.

La esencia de la invención consiste en una combinación de elementos conocidos (separación de los compartimientos de cultivo y de suministro por medio de membranas) y elementos nuevos (disposición de las membranas en el compartimiento de suministro, capacidad de giro del dispositivo, exposición alternante de las células en la fase gaseosa y en la fase líquida), los cuales se influencian mutuamente y dan como resultado en su nueva acción total una ventaja de uso y el éxito buscado, que reside en que se proporciona una posibilidad para el cultivo efectivo continuo de células en altas densidades y para la obtención de productos a partir de estas células junto con una retención simultánea de células.

En lo que sigue se explicarán la invención y su funcionamiento con ayuda de dibujos. Los dibujos sirven solamente para una mejor comprensión, pero no deberán entenderse como un modo de construcción único con el que pueden materializarse las reivindicaciones.

Figura 1

Esquema del sistema de biorreactor

La figura representa una variante del sistema de biorreactor a base de un compartimiento de suministro cilíndrico 12. La orientación, pero no las dimensiones reales y el número real de las cámaras de cultivo de hilos huecos dispuestas en el compartimiento de suministro, está representada por las líneas negras en el compartimiento de suministro. El recipiente cilíndrico es movido con el ritmo adecuado y cambiando periódicamente de dirección por un dispositivo de giro 23. Se asegura el flujo por la fase gaseosa del compartimiento de suministro a través del trayecto de gas que está constituido por una estación mezcladora de gas 13 y un humectador de gas 14 para la alimentación de gas al cilindro y por una trampa de medio 15 y una trampa de contaminación 16 para la evacuación de gas del cilindro. Se asegura el flujo por la fase líquida del cilindro a través de un trayecto de medio que está constituido por el depósito de medio y una bomba 17 para la alimentación del medio, así como una bomba 19 y el recipiente colector de producto 20 para la evacuación desde el cilindro. En el trayecto de evacuación está integrada, además, una cadena de sondas de medida 18 para la medición de oxígeno, valor de pH y temperatura. El recipiente colector de producto lleva conectado un circuito con una bomba 21 y un módulo de ultrafiltración 22 para la concentración del producto contenido en el recipiente colector de producto 20. El filtrado exento de producto es evacuado hacia abajo desde este módulo de ultrafiltración y desechado, mientras que el producto concentrado es realimentado al recipiente colector de producto. Ventajosamente, todos los elementos del sistema de biorreactor, comenzando con la conexión a la estación mezcladora de gas, son materiales de un solo uso. Las bombas están diseñadas como bombas de tubo flexible.

Figura 2

Sección longitudinal del compartimiento de suministro cilíndrico de dos fases

El compartimiento de suministro cilíndrico 12 contiene, durante el funcionamiento del reactor, en la zona superior una fase de gas 5 y en la zona inferior una fase de líquido 6 que forman una superficie límite de fases 7. El compartimiento de suministro está limitado a la izquierda por una placa extrema 1 para la alimentación de gas y medio y a la derecha por una placa extrema 2 para la evacuación. Se conduce gas a través de lumbreras 3, 4 de las placas extremas. El transporte del medio se efectúa a través de sendas lumbreras centrales 8, 9 de las placas extremas colocadas sobre el eje de rotación del cilindro. Las distintas cámaras de cultivo para las células están diseñadas como membranas iguales de hilos huecos y están representadas en el compartimiento de suministro en forma de líneas negras paralelas. La aportación de la suspensión de células se efectúa por separado del suministro de gas y de medio a través de las lumbreras 10 representadas en negro en las placas extremas. Para lograr una siembra uniforme de las células en todas las membranas de hilos huecos, las lumbreras terminan en compartimientos distribuidores de células 11 que están unidos con el recinto interior de cada membrana individual de hilos huecos.

Figura 3

Vista en planta de las placas extremas del compartimiento de suministro

En la vista en planta de la placa extrema de alimentación 1 se ilustra una de las disposiciones utilizadas para los accesos de gas - representados como círculos pequeños - y de medio 8 al compartimiento de suministro. La vista en planta de la placa extrema de evacuación 2 muestra la lumbrera central para la evacuación de producto 9 y una disposición utilizada de lumbreras para la evacuación de gas que están representadas con círculos pequeños. En este ejemplo se han integrado en cada una de las dos placas extremas cuatro lumbreras representadas por puntos negros para la siembra de la suspensión de células, las cuales pueden ser cargadas a través de una acometida de tubos flexibles combinados.

Se explicará la invención ayudándose de ejemplos de realización sin que la misma quede limitada a estos ejemplos.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

Células de alta densidad

Se construyeron dos sistemas de reactor según el esquema ilustrado en la figura 1. El compartimiento de suministro cilíndrico tenía una capacidad total de 14 litros. La fase de líquido comprendía 7 litros en el proceso. En ambos casos, se dispusieron con simetría axial en el compartimiento de suministro 144 membranas de hilos huecos de 500 mm de longitud cada una. La siembra de células se efectuó con células en alta densidad dentro del medio de base PBG1.0 con adición de 0,02% de seroalbúmina humana a través de las lumbreras de siembra de las placas extremas que dan a los recintos interiores de las membranas de hilos huecos. La línea celular produce una proteína humana que puede aislarse del sobrante de cultivo por medio de un procedimiento de cromatografía de un solo paso y que puede determinarse después exactamente en su cantidad. El tiempo de cultivo fue de 10 y 23 días. Durante este tiempo se hizo circular continuamente a través de la fase gaseosa del compartimiento de suministro una mezcla de aire y 5% de CO_2. En total, se utilizaron de manera correspondiente 11 litros de medio de cultivo en 10 días y 24 litros de medio de cultivo en 23 días para el suministro de las células en los ciclos de trabajo. Los ciclos de exposición a fase líquida y a fase gaseosa ascendieron en el experimento a 30 segundos en cada caso entre los cambios de fase. Después de concluido el proceso de cultivo, se cosecharon las células de las membranas de hilos huecos a través de las lumbreras de siembra y se determinaron la densidad celular y la vitalidad. Se aisló la proteína de una parte alícuota de la cosecha de producto exenta de células y se determinó la cantidad de dicha proteína. En la tabla siguiente se relacionan la densidad celular y la vitalidad conseguidas en las cámaras de cultivo de hilos huecos.

	Ciclo de trabajo 1 del biorreactor (10 días)	Ciclo de trabajo 2 del biorreactor (23 días)
Número total de células del inóculo [células por ml de compartimiento de cultivo]	1,5E7	1,8E7
Vitalidad del inóculo [%]	67	80
Número total de células de la cosecha	2,4E7	2,25E7
Vitalidad de la cosecha [%]	54	29
Cantidad total de proteína [mg]	48	168

En el sistema se pudieron obtener altas densidades de células. Además, se formaron durante el proceso 48 mg y 168 mg de proteína y estas cantidades se recogieron en el sobrante de cultivo exento de células dentro del recipiente colector de producto correspondiente.

Ejemplo 2

Células de pequeña densidad

Células en densidades de células vivas de 1,3E5 células por milímetro de compartimiento de cultivo se inocularon en dos reactores de exposición a dos fases, cada uno con 12 membranas de hilos huecos de una longitud de 200 mm, y se cultivaron durante 4 días haciendo girar las dos calderas de plástico. Antes del inóculo se mezclaron las células con trozos microscópicamente pequeños de gel de HSA. El intercambio del medio se efectuó de forma discontinua. Se midió la actividad del metabolismo por medio del consumo de glucosa. Se determinaron las densidades de células después de concluidos los ciclos de trabajo por cosechado del gel con las células contenidas en el mismo y recuento por medio de tripanazul. Se pudieron conseguir dentro del corto tiempo de cultivo una expansión de las células hasta 6E5 células vivas por milímetro de compartimiento de cultivo (4,6 veces) y 5E5 células vivas por milímetro de compartimiento de cultivo (3,8 veces).

Ejemplo 3

Funcionamiento del sistema de biorreactor

El principio de suministro del biorreactor se basa en que las células residan alternativamente en un medio y en una mezcla gaseosa y, por tanto, se ha podido mejorar el suministro de las células con oxígeno en comparación con sistemas convencionales.

Ejemplo 4

Constitución del sistema

El corazón del biorreactor está formado por una caldera de plástico cilíndrica que se monta en posición horizontal. En este recipiente están sujetas unas membranas de hilos huecos en toda su longitud, paralelamente al eje de rotación, tal como se representa en la figura 2. Resultan así en el cilindro dos compartimientos separados uno de otro por las membranas. Éstos son, por un lado, el compartimiento de suministro que rodea a las membranas de hilos huecos y que está constituido por una fase líquida y una fase gaseosa. La superficie límite entre estas dos fases está esbozada en las figuras 2 y 3. Por otro lado, está el espacio situado dentro de cada membrana de células huecas. Las suma de todos los espacios internos de los hilos huecos representa el compartimiento de cultivo para las células. En función del número de membranas de hilos huecos dispuestas con simetría respecto de su eje de rotación, el sistema puede construirse a cualquier escala en lo que respecta a su compartimiento de cultivo. Ambos compartimientos disponen de accesos independientes y están separados uno de otro. La única unión entre el compartimiento de suministro y el compartimiento de cultivo está constituida por los poros de la membrana. Estos poros, con un diámetro de poro ventajoso de 0,1 a 1,0 μg por mililitro, pueden ser atravesados por moléculas pequeñas y por proteínas, pero no por las células. La capacidad de flujo continuo de gas y de líquido a través del sistema se asegura por medio del dispositivo total comentado y descrito en relación con la figura 1.

Pertenece también al sistema de biorreactor una unidad móvil de equipamiento físico que incluye bombas, compresores y unidades de medida y regulación. Asimismo, esta unidad comprende un motor de accionamiento y un dispositivo de giro que hace posible el montaje y la rotación de la caldera de plástico.

Ejemplo 5

Funcionamiento

La caldera de plástico es hecha girar alrededor de su eje de rotación por el dispositivo de giro en un ciclo de rotación adaptable a la respectiva línea celular. Este ciclo de rotación se repite ininterrumpidamente de manera ventajosa durante todo el tiempo de funcionamiento del biorreactor. Se relacionan seguidamente a título de ejemplo las ocho fases de un ciclo de rotación.

Fase: Giro a derechas de 180º

Fase: Tiempo de paro

Fase: Giro a derechas de 180º

Fase: Tiempo de paro

Fase: Giro a izquierdas de 180º

Fase: Tiempo de paro

Fase: Giro a izquierdas de 180º

Fase: Tiempo de paro.

Como resultado de un ciclo de rotación, la caldera ha concluido una revolución completa en una dirección y una revolución completa en la dirección contraria y se encuentra nuevamente en la posición de partida original. El cambio de la dirección de giro permite el flujo de medio y de gas a través de lumbreras fijamente integradas en la caldera, en las cuales están inmovilizados unos tubos flexibles de plástico. Por tanto, a diferencia de la mayoría de los biorreactores para células de mamífero, el sistema prescinde de componentes de construcción móviles que se introduzcan en la zona estéril de suministro o de cultivo, tales como ejes de rodetes o tubos de alimentación de medio y de gas. Por consiguiente, no se presenta el riesgo de contaminación ligado a esto y no se originan gastos para el aseguramiento de superficie de fricción correspondientes por medio de, por ejemplo, juntas dobles de anillos deslizantes.

La constitución del sistema y el modo de funcionamiento aseguran al mismo tiempo que, con independencia del número de membranas de hilos huecos contenidas en el sistema, cada una de éstas esté sometida durante todo el tiempo de funcionamiento del biorreactor a condiciones de exposición idénticas en ambas fases. La exposición en la fase gaseosa sirve sobre todo para el suministro de oxígeno, mientras que la exposición en la fase líquida sirve sobre todo para la recogida de materias nutrientes disueltas y la evacuación de productos de metabolismo. Tanto el medio nutriente como la mezcla gaseosa se pueden alimentar de forma más continua.

Ventajas/Novedades

Caldera con sistema integrado de retención de células en forma de un artículo de un solo uso.

La membrana es permeable para la proteína de cada cosecha exenta de células.

Iguales condiciones de exposición para cada membrana de hilos huecos individual en el sistema.

Corto recorrido de difusión para oxígeno durante la exposición en la fase gaseosa.

Ausencia de formación de gradiente en la fase gaseosa del reactor de exposición en toda la longitud de este reactor.

Varias lumbreras de gas distribuidas de manera correspondiente por las tapas extremas y que posibilitan un flujo continuo de gas incluso durante la rotación.

Definiciones

Células de alta densidad: Se consigue un cultivo con alta densidad celular a densidades celulares de más de 1E7 células por milímetro de compartimiento de cultivo.

Células de pequeña densidad: Se consiguen cuando la densidad celular en el compartimiento de cultivo está comprendida entre 1E4 y 1E7 células por milímetro de compartimiento de cultivo.

Células de densidad muy pequeña: Se consigue un cultivo con una densidad celular muy pequeña a densidades inferiores a 1E4 células por milímetro de compartimiento de cultivo.

Medio nutriente: El medio nutriente es una solución acuosa en la que están contenidas materias nutrientes esenciales para las células, como, por ejemplo, glucosa, aminoácidos y elementos traza.

Mezcla gaseosa: Una mezcla gaseosa en el sentido aquí empleado describe de manera ventajosa una mezcla de aire y dióxido de carbono con proporciones de mezclado variables. Asimismo, el término mezcla gaseosa incluye también en el presente significado proporciones de mezclado variables de nitrógeno, oxígeno y CO_2.

Lista de símbolos de referencia

1	Placa extrema de alimentación
2	Placa de extrema de evacuación
3, 4	Lumbreras para suministro y desechado de gas
5	Fase de gas

6	Fase de líquido
7	Superficie límite de fases
8	Acceso para medio (lumbrera central)
9	Lumbrera central para la evacuación de producto
10	Lumbreras para el compartimiento de cultivo
11	Compartimientos distribuidores de células
12	Compartimiento de suministro cilíndrico
13	Estación mezcladora de gas
14	Humectador de gas
15	Trampa de medio
16	Trampa de contaminación
17, 19, 21	Bombas
22	Módulo de ultrafiltración
23	Dispositivo de giro.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la cría y cultivo de células en un biorreactor de exposición a fases líquida y gaseosa que comprende un compartimiento de suministro en el que se encuentran membranas de hilos huecos con un diámetro interior de no más de 5 mm y cuyo volumen interior está formado por cámaras de cultivo, **caracterizado** por los pasos siguientes:

- introducción de las células en las cámaras de cultivo,

- llenado de aproximadamente la mitad del compartimiento de suministro con medio nutriente y la otra mitad con una mezcla gaseosa,

- inclusión simultánea o decalada de la perfusión de medio y de gas,

- exposición cíclica de las membranas de hilos huecos y de las células contenidas en ellas en la fase gaseosa y en la fase líquida.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las membranas de hilos huecos están dispuestas en posición horizontal, después de llenado del reactor la mitad de las membranas están cubiertas con medio nutriente y la exposición cíclica de las membranas de hilos huecos se consigue por giro de 360º del reactor en una dirección y a continuación en la otra dirección.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la rotación se efectúa en dos pasos de 180º que se separan uno de otro por tiempos de espera ajustables de forma variable, de modo que cada membrana individual de hilos huecos se encuentra el mismo tiempo en la fase líquida que en la fase gaseosa.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la exposición cíclica se consigue por inmersión de las membranas de hilos huecos en el medio nutriente y extracción subsiguiente hasta el interior de la fase gaseosa.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se introducen células de pequeña densidad en el compartimiento de cultivo y éstas van creciendo hasta obtener células de alta densidad.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque se introducen en el compartimiento de cultivo células de densidad celular muy pequeña junto con geles de polipéptidos reticulados que presentan una alta proporción de glutamina y/o con medios semisólidos derivados de líquidos viscosos o de líquidos que comprenden trozos de gel microscópicamente pequeños.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las células consisten en protozoos, bacterias, levaduras, hongos, células vegetales o células de mamíferos.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la introducción de las células en las cámaras se efectúa a través de un sistema de carga central dispuesto por fuera del compartimiento de suministro y porque es posible la aportación simultánea (homogénea) de las células a todas las cámaras a través de una acometida.

9. Dispositivo para la cría y cultivo de células en un compartimiento de suministro de dos fases (que puede cargarse con gas y con un medio) de forma cilíndrica o esférica, en el que - paralelamente al eje longitudinal de la envolvente del cilindro - están inmovilizadas en las placas extremas unas membranas poliméras de hilos huecos de microfiltración para retención de células con un diámetro interior de no más de 5 mm, cuyo volumen interior está formado por cámaras de cultivo en las que se encuentran las células que se han de cultivar, **caracterizado** porque

- el compartimiento de suministro contiene una fase de gas por la que puede circular una mezcla gaseosa y una fase de líquido por la que puede circular un medio de cultivo,

- cada membrana de hilos huecos tiene en toda la longitud del cilindro una distancia de al menos 0,5 mm a la membrana de hilos huecos inmediata siguiente,

- las membranas de hilos huecos están dispuestas simétricamente con respecto a una sección transversal imaginaria a lo largo del eje longitudinal del cilindro,

- no se encuentran membranas sobre el plano de la sección transversal imaginaria a lo largo del eje longitudinal del cilindro.

10. Dispositivo según la reivindicación 9, **caracterizado** porque cada placa extrema del cilindro presenta al menos dos acometidas para la aportación y la descarga de gas, las cuales se encuentran respectivamente por encima y por debajo del plano de la sección transversal imaginaria y el compartimiento de suministro con las membranas de hilos huecos puede ser hecho girar así alrededor de su eje longitudinal durante el suministro de medio y de gas.

11. Dispositivo según las reivindicaciones 9 y 10, **caracterizado** porque las acometidas para el suministro de gas no están dispuestas en las superficies de cabeza, sino en la envolvente del cilindro, por encima y por debajo del plano de la sección transversal imaginaria.

12. Dispositivo según la reivindicación 9, **caracterizado** porque las membranas de hilos huecos presentan un espesor de pared de menos de 300 μm, alcanzan una permeabilidad al agua de más de 6 m^3/m^2*h*bar y tienen un diámetro de poro de 0,1 a 1 μm.

13. Dispositivo según la reivindicación 9, **caracterizado** porque las membranas están dispuestas en forma hexagonal dentro del compartimiento de suministro.

14. Dispositivo según la reivindicación 9, **caracterizado** porque en las superficies de cabeza se encuentran al menos una respectiva acometida de tubo flexible para la perfusión del medio y al menos un respectivo acceso al compartimiento de cultivo.

15. Dispositivo según al menos una de las reivindicaciones 10 a 14, **caracterizado** porque contiene, además, tubos flexibles, humectadores de gas, una trampa de medio en el trayecto del gas, una unidad de ultrafiltración en un trayecto de cosechado de producto, una unidad de equipamiento físico, bombas, compresores, unidades de medida y regulación, así como un motor de accionamiento y un bastidor que permite el montaje y la rotación del dispositivo.

16. Uso del dispositivo según las reivindicaciones 9 a 15 para el cultivo de células en altas densidades y para la obtención de productos celulares, constituyentes celulares, virus, proteínas o sustancias de bajo peso molecular.

17. Uso según la reivindicación 16 para la obtención de medicamentos.

18. Uso según las reivindicaciones 16 y 17 para la fabricación de agentes de diagnóstico.

Figura 1

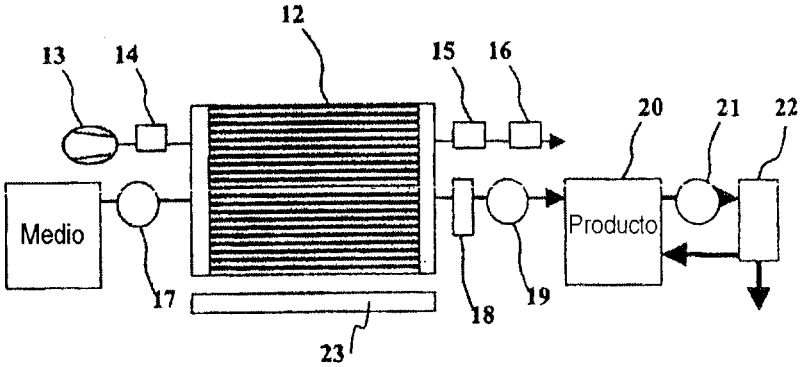

Figura 2

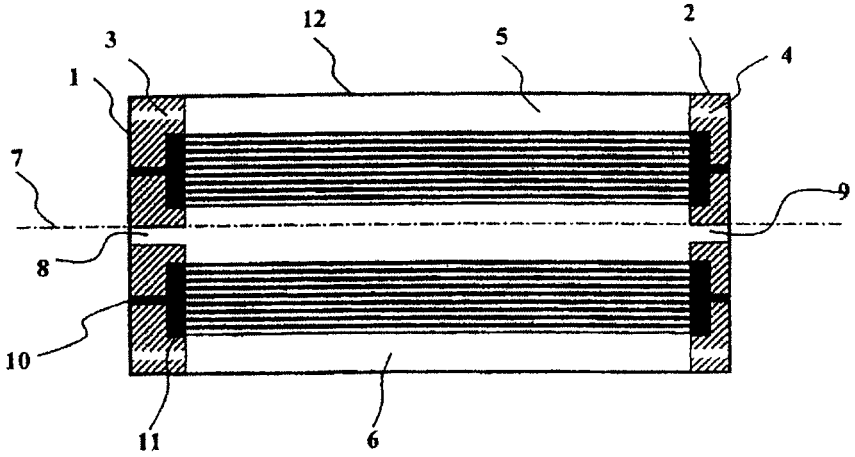
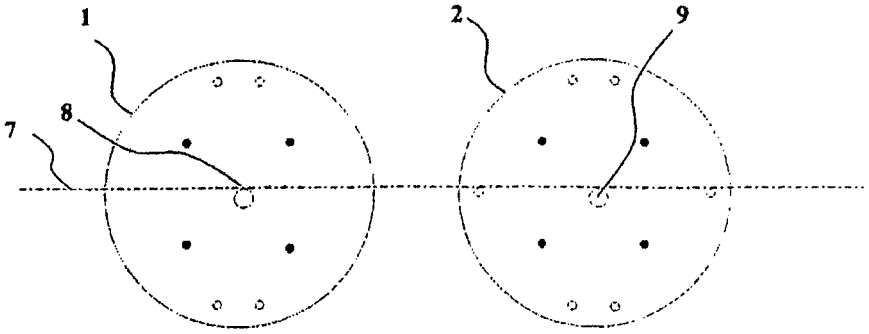
Figura 3