

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 344 789**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2004 PCT/US2004/015597**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.12.2004 WO04104186**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2004 E 04752591 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **25.01.2017 EP 1623019**

54 Título: **Alimentación restringida de glucosa para el cultivo de células animales**

30 Prioridad:

15.05.2003 US 470937 P

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

14.06.2017

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**DRAPEAU, DENIS;
STANEK, TERRY, CARDOZA y
LUAN, YEN-TUNG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

DESCRIPCIÓN

Alimentación restringida de glucosa para el cultivo de células animales

Solicitudes anteriores relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/470.937, presentada el 15 de mayo de 2003, la cual se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 La invención se refiere a un procedimiento para mejorar la producción de proteínas mediante células animales en cultivo. De forma más concreta, la invención se refiere a un procedimiento para controlar la producción de ácido láctico por parte de células animales en cultivo (preferentemente células de mamífero) a niveles bajos en un cultivo celular semicontinuo. En algunas realizaciones, la invención proporciona procedimientos para mantener la producción de lactato por parte de células en cultivo a niveles bajos a través del uso de sistemas de suministro de glucosa que no dependen del muestreo de los cultivos a intervalos regulares. En particular, la invención se refiere al cultivo de células animales en condiciones en las que se alimenta glucosa a, o en el cultivo, de una manera restringida, por ejemplo a una tasa que es una función de una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa por parte de las células animales al exponerlas a un medio que contiene un nivel elevado de glucosa. Asociado a esta alimentación restringida, se controla la producción de ácido láctico por parte de células en cultivo a un nivel bajo durante el cultivo. Como resultado final, se aumenta la producción de proteínas recombinantes a partir de las células en cultivo, por ejemplo para facilitar la producción a escala comercial.

Técnica anterior relacionada

20 Una gran proporción de productos biotecnológicos, ya sea estén disponibles de forma comercial o sólo en desarrollo, son proteínas terapéuticas. Adicionalmente, en general es necesaria la maquinaria celular de una célula animal (frente a una célula bacteriana) para producir muchas formas de proteínas terapéuticas (tales como proteínas glucosiladas o anticuerpos monoclonales (Acm) producidos por hibridoma). En consecuencia, existe una demanda creciente de producción de estas proteínas en cultivos de células animales.

25 Sin embargo, en comparación con los cultivos de células bacterianas, los cultivos de células animales presentan tasas de producción más bajas y normalmente generan rendimientos de producción más bajos. El mantenimiento de las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo celular a concentraciones bajas (por ejemplo, entre 0,02 y 1,0 g/l (por ejemplo, entre 0,11 y 5,5 mM)) y el cultivo de células en una fase de producción a una osmolalidad de aproximadamente 400 a 600 mOsm, se ha encontrado que aumenta la producción de proteínas recombinantes por parte de cultivos de células animales, en particular tras un cultivo inicial a una osmolalidad de aproximadamente 280 a 330 mOsm (patente de Estados Unidos n.º 5.856.179; cada patente de Estados Unidos citada en el presente documento se incorpora como referencia en su totalidad) y en el que el cultivo en todas las fases también es a una concentración de glutamina seleccionada (preferentemente entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 2 mM; patente de Estados Unidos n.º 6.180.401).

30 Parte de este incremento de la producción de proteínas recombinantes puede ser el resultado de una reducción de la producción de lactato que se produce cuando se mantienen bajas las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo. Es conocido que el lactato es un fuerte inhibidor del crecimiento celular y de la producción de proteínas, y que mantener bajas las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo puede dar como resultado niveles bajos de la producción de lactato (Glacken y col. (1986) Biotechnol. Bioeng. 28:1376-89; Kurokawa y col. (1984) Biotechnol. Bioeng. 44:95-103; patente de Estados Unidos n.º 6.156.570). En consecuencia, dependiendo de otras condiciones de cultivo, el mantenimiento de las concentraciones de glucosa a niveles bajos respecto a la concentración celular es un factor que puede contribuir a niveles más bajos de producción de lactato y, por lo tanto, a concentraciones celulares más altas y a una producción aumentada de proteínas recombinantes en cultivos de células animales.

35 Cuando se exponen las células a una concentración baja de glucosa en el medio, su metabolismo se altera de forma que tanto la tasa de captación de glucosa como la tasa de producción de lactato son más bajas en comparación con células mantenidas en procedimientos semicontinuos que tienen medios con niveles altos de glucosa al inicio del procedimiento (patente de Estados Unidos n.º 6.156.570). Adicionalmente, la duración del cultivo semicontinuo puede extenderse. En consecuencia, tanto la tasa de crecimiento celular como la tasa de producción de proteínas pueden mantenerse durante un periodo más prolongado en comparación con los cultivos semicontinuos, en los que las células se cultivan en medios que conducen a niveles altos de producción de lactato (por ejemplo, medios que contienen niveles altos de glucosa al inicio del periodo de cultivo).

40 Una manera de controlar la producción de lactato por parte de las células en cultivo es a través de una alimentación invariante, de tasa constante, de glucosa en un procedimiento semicontinuo (Ljunggren y Häggstrom (1994) Biotechnol. Bioeng. 44:808-18; Haggstrom y col. (1996) Annals N.Y. Acad. Sci. 782:40-52). Aunque esta

alimentación de glucosa invariante, de tasa constante, en un procedimiento semicontinuo, puede ayudar a controlar la producción de ácido láctico por parte de células en cultivo en niveles bajos, no se consigue un máximo de concentraciones celulares, tasas de crecimiento, niveles de viabilidad celular y tasas de producción de proteínas máximas, debido a que este procedimiento de proporcionar glucosa normalmente de cómo resultado la privación de glucosa a medida que aumentan las concentraciones celulares.

Otra manera de controlar la producción de lactato por parte de las células en cultivo a niveles bajos es a través del uso de sistemas de suministro de glucosa que dependen del muestreo de los cultivos a intervalos regulares. Se toman muestras de un cultivo a intervalos regulares y, tras determinar la concentración de glucosa en las muestras (por ejemplo, a través del análisis de inyección en flujo, como en Male y col. (1997) *Biotechnol. Bioeng.* 55:497-504 o en Siegwarty col. (1999) *Biotechnol. Prog.* 15:608-16), o a través de cromatografía líquida de alta presión, como en Kurokaway col. (1994) *Biotechnol. Bioeng.* 44:95-103), se añaden cantidades medidas de glucosa a los cultivos para mantener en el medio las concentraciones de glucosa a un nivel bajo sostenido con respecto a la concentración celular. Sin embargo, las células pueden adaptarse a una concentración baja de glucosa mediante, por ejemplo, el aumento de su capacidad de incorporar glucosa y, de esta manera, producir cantidades excesivas de ácido láctico a pesar de la baja concentración de la glucosa.

El documento WO 2004/048556 A1, que es técnica anterior según el art. 54(3) de la EPC, desvela un procedimiento para el control de la producción de ácido láctico a niveles reducidos en un cultivo celular semicontinuo mediante la alimentación de glucosa al cultivo celular de una manera restringida.

Además, el riesgo de contaminación por microorganismos a través de dichos procedimientos de control por retroalimentación basado en muestreo es significativo. En consecuencia, no resulta sorprendente que el uso de tales procedimientos para la producción comercial de proteínas recombinantes en cultivos de células animales no haya resultado factible. Los procedimientos de control por retroalimentación basado en muestreo para el mantenimiento de bajos niveles de concentración de glucosa en el medio de cultivo celular se han limitado a los usos en investigación desde que se publicó el primer artículo sobre tales procedimientos (Glacken y col., citado anteriormente); el artículo informa que las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo se determinaban utilizando un autoanalizador en línea, en el que se mezclaba una muestra que contenía glucosa con o-toluidina, y un colorímetro, a través del cual se medía la absorbancia a 660 nm de la mezcla para determinar la concentración de glucosa.

Por los motivos anteriores, existe una necesidad de procedimientos alternativos para controlar la producción de lactato por parte de células en cultivo a niveles bajos en el medio de cultivo.

Sumario de la invención

La invención se refiere a la realización caracterizada por las reivindicaciones.

La presente invención proporciona un procedimiento para la alimentación restringida de glucosa a o en cultivos de células animales en procedimientos semicontinuos. En asociación con esta alimentación restringida, puede controlarse la producción de lactato por parte de las células en cultivo a niveles bajos sin requerir una tasa constante de alimentación de glucosa. En algunas realizaciones, puede controlarse la producción de lactato por parte de las células en cultivo en niveles bajos, sin requerir el muestreo de los cultivos a intervalos regulares para la determinación de la concentración de glucosa en un procedimiento de control por retroalimentación. En particular, la presente invención proporciona una solución a una antigua necesidad de un procedimiento para controlar de forma flexible la producción de lactato por parte de células en cultivo a niveles bajos, para estimular la producción aumentada de proteínas recombinantes en cultivos de células animales, en especial para la producción a escala comercial.

La presente invención se refiere a un procedimiento de cultivo de células animales en condiciones en las que se alimenta glucosa a los cultivos celulares de una manera restringida (es decir, alimentación restringida), lo que da como resultado niveles bajos del lactato que producen las células en cultivo. Esta alimentación restringida o lenta se lleva a cabo a través de la alimentación continua o intermitente de glucosa en el cultivo celular a tasas que son menores que (es decir, una función de) las tasas de consumo de glucosa esperadas o premodeladas por parte de las células animales expuestas a un medio que contiene un nivel alto de glucosa. En particular, la invención se refiere a un procedimiento para aumentar la producción de proteínas en cultivos de células animales mediante el control de la producción de lactato a niveles bajos a través de la alimentación restringida de glucosa.

A pesar de que algunas realizaciones de la invención pueden emplear un control por retroalimentación basado en muestreo, otras realizaciones de la invención no requieren el control por retroalimentación basado en muestreo. Por ejemplo, las estimaciones de las capacidades esperadas para las tasas de consumo de glucosa por parte de las células animales en cultivo pueden incrementarse por las mediciones de concentración celular, las cuales en algunas realizaciones se realizan sin muestreo (por ejemplo, se realizan fotométricamente). Basándose en las mediciones de concentración celular, pueden calcularse las tasas de suministro de glucosa a los cultivos celulares (si se desea en tiempo real) para la alimentación restringida de glucosa a los cultivos celulares, es decir a una tasa de no más del 45 % de una tasa de consumo de glucosa esperada o premodelada por parte de células animales en

un cultivo que corresponde con condiciones de cultivo muy similares, pero en el que la concentración de glucosa, en lugar de estar en un nivel restringido, es tal que cualquier aumento de la concentración del mismo no afectará a la tasa de consumo de glucosa por parte de las células. Como se demuestra en las realizaciones de la invención, la alimentación restringida de glucosa permite controlar la producción de ácido láctico por parte de las células en cultivo en niveles bajos.

Se incluye la supervisión del pH como procedimiento complementario para estimar el consumo de lactato y para la protección frente a la privación de glucosa de las células en cultivo. La supervisión del pH aprovecha el hecho de que las células consumirán lactato del cultivo si no hay glucosa disponible. A medida que las células consumen lactato se produce un incremento del pH del cultivo, por lo tanto un incremento del pH puede señalar que no hay disponible glucosa en el cultivo celular (es decir, que las células se encuentran privadas de glucosa). En consecuencia, en algunas realizaciones de la invención, una estrategia de alimentación que proporcione un bolo de alimentación de glucosa y/o aumente la tasa de alimentación restringida por glucosa a un cultivo celular, al producirse un incremento del pH, puede proteger a las células de la privación por falta de glucosa. En algunas realizaciones, las mediciones de pH se obtienen sin "muestreo" (por ejemplo, las mediciones de pH se realizan a través del uso *in situ* de un sensor de pH para el que no se extraen del cultivo alícuotas que contienen células para medir el pH).

En particular, la invención proporciona un procedimiento de cultivo celular para controlar la producción del ácido láctico en niveles bajos en un cultivo celular semicontinuo, que comprende: mezclar células animales y un medio para formar un cultivo celular y alimentar glucosa en el cultivo celular de una manera restringida. La alimentación restringida de glucosa se produce cuando se proporciona glucosa a una tasa que es una función de una tasa esperada de consumo de glucosa por parte de las células animales cuando se las expone a un medio que contiene un nivel alto de glucosa. La función es la multiplicación por un porcentaje de no más del 45 %, incluyendo, pero sin limitación, porcentajes tales como al menos el 33 %, de una tasa esperada. En realizaciones relacionadas adicionales, la alimentación restringida de glucosa en el cultivo celular se logra sin muestreo de control por retroalimentación durante el cultivo.

En algunas realizaciones de la invención, se utiliza un sensor de concentración celular para supervisar la concentración celular en el cultivo celular, y se utiliza adicionalmente una medición obtenida de un sensor de la concentración celular para el cálculo de la tasa a la que se alimentará glucosa de una manera restringida en el cultivo celular. Se utiliza un sensor de pH para supervisar el pH del cultivo celular y, en respuesta a un incremento del pH por encima de un valor predeterminado (por ejemplo de aproximadamente 7), se añade glucosa al cultivo celular (por ejemplo, en un bolo de alimentación de glucosa y/o a una nueva tasa de alimentación de glucosa de una manera restringida que es mayor que una tasa de adición de glucosa inmediatamente anterior; en algunas realizaciones, una nueva tasa puede ser al menos del 15 % o no más del 50 %, mayor que una tasa inmediatamente anterior, a condición de que tal nueva tasa no alcance o exceda el 45 % de la tasa esperada de consumo de glucosa por parte de células de control expuestas a un nivel alto de glucosa). En otras realizaciones, en la determinación de la tasa de alimentación de glucosa de manera restringida en el cultivo celular puede utilizarse un sistema basado en un sensor de concentración celular junto con un sistema basado en un sensor de pH. Puede utilizarse el sistema basado en un sensor de concentración celular o el sistema basado en un sensor de pH, o ambos, sin "muestreo" del cultivo celular.

Otra realización del procedimiento de la invención proporciona un procedimiento de cultivo celular para el control de la producción de ácido láctico a niveles bajos en un cultivo semicontinuo, que comprende: (a) mezclar células animales y un medio que contiene un nivel alto de glucosa para formar un primer cultivo celular, (b) determinar una tasa de consumo de glucosa (es decir, una tasa premodelada) para las células animales en cultivo en el primer cultivo celular, (c) mezclar células animales y un medio para formar un segundo cultivo celular, y (d) alimentar glucosa de una manera restringida al segundo cultivo celular a una tasa que es una función de la tasa de consumo de glucosa determinada de la etapa (b) (es decir, una función de la tasa premodelada de consumo de glucosa). La función es la multiplicación por un porcentaje de no más del 45 %, tal como al menos el 33 %, de la tasa de consumo de glucosa determinada (es decir, la tasa premodelada). En realizaciones relacionadas adicionales, la alimentación restringida de glucosa en el segundo cultivo celular se lleva a cabo sin muestreo de control por retroalimentación del segundo cultivo celular.

En algunas realizaciones de la invención, se utiliza un sensor de concentración celular para supervisar la concentración celular en el segundo cultivo celular, en el que, para el cálculo de la tasa de alimentación de glucosa de una manera restringida en el segundo cultivo celular, se utiliza adicionalmente una medición obtenida de un sensor de concentración celular. Se utiliza un sensor de pH para la supervisión del pH del segundo cultivo celular y, en respuesta a un incremento del pH por encima de un valor predeterminado (por ejemplo, de aproximadamente 7), se añade glucosa al segundo cultivo celular (por ejemplo, en un bolo de alimentación de glucosa y/o a una nueva tasa de alimentación de glucosa de una manera restringida que es mayor que una tasa inmediatamente anterior de adición de glucosa; en algunas realizaciones, una nueva tasa puede ser al menos del 15 %, o no más del 50 %, mayor que una tasa inmediatamente anterior). En otras realizaciones, para la determinación de la tasa de alimentación de glucosa de una manera restringida al segundo cultivo celular puede utilizarse un sistema basado en un sensor de concentración celular junto con un sistema basado en un sensor de pH. Puede utilizarse el sistema basado en un sensor de concentración celular o el sistema basado en un sensor de pH, o ambos, sin "muestreo" del

segundo cultivo celular.

En el procedimiento de la invención, las células se adaptan al crecimiento en condiciones de cultivo en las que se añade glucosa para probar cultivos celulares a tasas que son restringidas en comparación con las tasas de consumo de glucosa en condiciones de cultivo de control (por ejemplo, en las que la concentración de glucosa es tal que cualquier aumento de la concentración no afectará a la tasa de consumo de glucosa por parte de las células animales). En particular, las células procedentes de dos cultivos celulares alimentados de forma restringida ejemplificados (que difieren en las tasas a las que se alimentaba glucosa de una manera restringida en los cultivos) produjeron niveles más bajos de lactato que los producidos por los cultivos celulares de control. También presentaron tasas de crecimiento y tasas de producción de proteína recombinante distintas. Los cultivos de alimentación restringida de “rampa baja” presentaron niveles más bajos de producción de lactato que los cultivos de alimentación restringida de “rampa alta”. Los cultivos de alimentación restringida de “rampa baja” también presentaron tasas de crecimiento más altas y tasas más altas de producción de proteína recombinante que los cultivos de alimentación restringida de “rampa alta”. En general, los cultivos de alimentación restringida tanto de rampa baja como los cultivos de alimentación restringida de rampa alta presentaron tasas de producción de lactato más bajas, tasas de crecimiento más altas y tasas más altas de producción de proteína recombinante que los cultivos de control.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de realizaciones preferentes de la misma, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

- FIG. 1. Control frente a alimentaciones restringidas de glucosa: curva de mejor ajuste.
 FIG. 2. Glucosa acumulada: control frente a alimentación de aumento esperado.
 FIG. 3. Glucosa acumulada: control frente a alimentaciones premodeladas.
 FIG. 4. Concentración celular: control frente a alimentación de aumento esperado.
 FIG. 5. Título de BMP-2 (normalizado): control frente a alimentación de aumento esperado.
 FIG. 6. Concentraciones de glucosa y de lactato: control frente a alimentación de aumento esperado.
 FIG. 7. Concentración celular: control frente a alimentaciones premodeladas.
 FIG. 8. Título de BMP-2 (normalizado): control frente a alimentaciones premodeladas.
 FIG. 9. Concentraciones de glucosa y de lactato: control frente a alimentaciones premodeladas.

Descripción detallada de la invención

Definiciones: la expresión “células animales” abarca células de invertebrado, de vertebrado no mamífero (por ejemplo de ave, de reptil y de anfibio) y células de mamífero. Los ejemplos no limitativos de células de invertebrado incluyen las siguientes células de insecto: células de *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* (gusano de seda/polilla de la seda). Las células de mamífero preferentes incluyen células de riñón de hámster lactante (BHK), células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón humanas (293), diploides fetales normales de mono rhesus (FRhL-2) y de mieloma murino (por ejemplo, SP2/0 y NS0).

La expresión “medio de inoculación base” se refiere a una solución o sustancia que contiene nutrientes, pero no glucosa, en la que se inicia un cultivo celular. El “medio de alimentación base” contiene los mismos nutrientes que el medio de inoculación base, pero es una solución o sustancia con la que se alimenta el cultivo celular tras el inicio del mismo.

Un “cultivo discontinuo” se refiere a un cultivo celular por el cual las células reciben medio de inoculación base que contiene glucosa al inicio del cultivo y por el cual el cultivo celular suministra producto, por ejemplo proteína recombinante, solo al finalizar el cultivo. De manera similar, un “cultivo semicontinuo” de células suministra producto solo en su punto de finalización. Sin embargo, las células en un cultivo semicontinuo reciben medio de inoculación base que contiene glucosa al inicio del cultivo y se las alimenta con medio de alimentación base que contiene glucosa en uno o más puntos tras el inicio, pero antes de la finalización.

“Nivel alto de glucosa” significa una concentración de glucosa en cultivos de células animales por la cual cualquier aumento de la concentración de glucosa no afectará a la tasa de consumo de glucosa de las células.

Una “tasa de consumo de glucosa” refleja el consumo de glucosa de las células animales en cultivo en un punto del tiempo. Las tasas de consumo de glucosa pueden representarse de forma gráfica (como en la curva de “mejor ajuste” en la parte superior de la FIG. 1) o a través de una función matemática (como en la leyenda de la FIG. 1).

“Alimentación de glucosa de una manera restringida” y/o “alimentación restringida de glucosa” y/o “se alimenta glucosa de una manera restringida” y/o expresiones similares, se refieren a proporcionar una cantidad restringida de glucosa a un cultivo, de manera que la cantidad restringida proporcionada se determina o se calcula mediante una función, y es de no más del 45 % de la cantidad de glucosa esperada o determinada que consumirá un cultivo de control. Un “cultivo de control” significa un cultivo de las mismas células animales en condiciones de cultivo similares (por ejemplo, un cultivo de las mismas células en un medio de inoculación base y de alimentación similares, a la

misma temperatura, comenzando con la misma concentración celular inicial, etc.), excepto en que el cultivo tiene un nivel alto de glucosa. Por lo tanto, la función mediante la cual puede determinarse o calcularse la cantidad restringida de glucosa proporcionada puede ser una función de una tasa esperada de consumo de glucosa, o una función de una tasa de consumo de glucosa determinada, por parte de las células en un cultivo de control. Puede producirse la alimentación de glucosa de una manera restringida, mediante lo cual la glucosa se proporciona a una concentración o concentraciones determinadas durante un periodo de tiempo, es decir, a una tasa o tasas determinadas, y/o mediante lo cual la glucosa se proporciona mediante uno o más bolos de alimentación de glucosa.

Las expresiones “función de una tasa esperada de consumo de glucosa” o “función de una tasa de consumo de glucosa determinada” (en donde la tasa de consumo de glucosa determinada es una tasa premodelada) pueden incluir varias relaciones matemáticas entre una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa y una tasa de alimentación restringida de glucosa (o una tasa restringida de adición de glucosa), incluyendo relaciones en las que la tasa de alimentación de glucosa es el producto de (es decir, el resultado de la multiplicación de) (1) una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa en un punto del tiempo durante la duración del cultivo celular y (2) un valor porcentual de no más del 45 %. Las funciones cuadráticas, cúbicas y exponenciales también se encuentran entre las muchas relaciones matemáticas abarcadas por la invención. Sin embargo, las funciones aplicables dentro del ámbito de la invención no incluyen aquéllas en las que la tasa de alimentación restringida de glucosa es una adición invariante de tasa constante durante la duración del cultivo celular.

“Nivel bajo de ácido láctico” (o “nivel bajo de lactato”) en un cultivo celular se refiere a una concentración de ácido láctico (o de lactato) que es más baja que las concentraciones de ácido láctico (o de lactato) encontradas en células cultivadas con un nivel alto de glucosa.

“Muestreo” incluye la extracción de muestras que contienen células de cultivos de células animales (por ejemplo, en un biorreactor) con el fin de medir características del medio de cultivo. “Muestreo” no incluye mediciones de la concentración celular en las que no se retiran o se separan del cultivo muestras o alícuotas que contienen células con el fin de medir la concentración celular. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo estimaciones de la concentración celular de tipo fotométrico sin “muestro” de un cultivo mantenido en un recipiente transparente o translúcido. Además, “muestreo” no incluye la utilización *in situ* de un sensor de pH para medir el pH de un medio en el que se cultivan células animales, en el que no se retiran del cultivo muestras o alícuotas que contienen células con el fin de medir el pH. La utilización de una sonda para medir el pH de un medio de cultivo celular no es “muestreo” como se define en el presente documento, si no se retiran o se separan del cultivo muestras o alícuotas que contienen células.

Siguiendo una antigua convención, los términos “un” y “una” significan “uno o más” o “una o más” cuando se utilizan en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Aunque la invención se ha descrito con un determinado grado de particularidad, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia a la luz de la divulgación. Por consiguiente, se pretende que la totalidad de tales alternativas, modificaciones y variaciones, que están incluidas dentro del espíritu y alcance de la invención, estén abarcadas en las reivindicaciones definidas.

La presente invención se refiere a un procedimiento de cultivo de células animales, de manera que los cultivos que mantienen niveles bajos de ácido láctico tienen como resultado una viabilidad celular aumentada durante un periodo de tiempo más largo, y producen niveles aumentados de proteína recombinante. El experto en la materia reconocerá que el procedimiento desvelado en el presente documento puede utilizarse para cultivar muchas de las bien conocidas células animales utilizadas y cultivadas de forma rutinaria en la técnica, es decir, el procedimiento desvelado en el presente documento no se limita al uso solo con las células animales enumeradas dentro de la definición de células animales.

Los procedimientos de la invención se refieren a la alimentación de glucosa de una manera restringida a un cultivo de células animales. Como se detalla adicionalmente en el Ejemplo 2, la alimentación de glucosa de una manera restringida puede producirse proporcionando glucosa a una tasa que es una función de una tasa de consumo de glucosa esperada o determinada (por ejemplo, una tasa premodelada de consumo de glucosa) por parte de células animales en un cultivo de control, por ejemplo células cultivadas con un nivel alto de glucosa. La alimentación de glucosa de una manera restringida también puede incluir proporcionar uno o más bolos de glucosa.

El experto en la materia puede determinar las condiciones del cultivo de control sin necesidad de excesiva experimentación. Por ejemplo, el experto en la materia entenderá que las células animales normalmente se cultivan en un “medio”, el cual en general se refiere a una solución que comprende nutrientes, incluyendo glucosa. Como tal, el experto en la materia conocerá que la glucosa debería añadirse al medio de inoculación base y de alimentación antes de la inoculación y alimentación de las células animales, respectivamente. Se reconocerá que la cantidad de glucosa añadida al medio de inoculación base y al medio de alimentación base puede diferir. De forma adicional, el experto en la materia reconocerá qué medio es apropiado para el cultivo de una célula animal particular (por ejemplo, células CHO) y la cantidad de glucosa que el medio debería contener para generar cultivos de células animales, de forma que exista un nivel alto de glucosa (ver, por ejemplo, Mather, J.P. y col. (1999), “Culture media, animal cells, large scale production”, Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation vol. 2:777-785.). En otras palabras, el experto en la materia reconocerá la concentración de glucosa a

la que debe cultivarse una célula particular de forma que cualquier aumento de la concentración de glucosa del cultivo no afecte a la tasa de consumo de glucosa de la célula. Debe distinguirse un nivel alto de glucosa en un cultivo celular de un nivel alto de glucosa añadida al medio de inoculación base y de alimentación; la concentración de glucosa en éste último (por ejemplo, a 44, 200 o 280 g/l) normalmente se diluye durante la adición al cultivo celular.

Un experto en la materia reconocerá adicionalmente que la concentración óptima de otros nutrientes (por ejemplo, glutamina, hierro, oligoelementos D) o de agentes concebidos para el control de otras variables del cultivo (por ejemplo, la cantidad del espumado y la osmolalidad), variará dependiendo de la célula animal. Como tal, el ajuste de las concentraciones de tales nutrientes o agentes en los medios de inoculación base y de alimentación es rutinario en la técnica. Además, el experto en la materia reconocerá a qué temperatura y concentración debe cultivarse una célula particular.

En algunas realizaciones de la invención, se verifica la concentración celular y/o del pH del cultivo, y se utilizan para calcular la tasa de alimentación restringida de glucosa. Los procedimientos para la medición de la concentración celular y/o el pH de un cultivo son bien conocidos de la técnica; tales procedimientos se incluyen, pero sin limitación, el uso de un Cedex (Innovatis GmbH, Bielefeld, Alemania) y/o un instrumento CASY (Scharfe system GmbH, Reutlingen, Alemania) para determinar la concentración celular y/o un sensor de pH. Son particularmente útiles para la invención reivindicada los procedimientos para la determinación de la concentración celular y el pH que no requieran muestreo, es decir, la extracción de muestras que contienen células del cultivo animal, incluyendo, pero sin limitación, el uso de una sonda de capacitancia, una sonda de densidad óptica y/o una sonda de turbidez para medir la concentración celular, y/o una sonda potenciométrica o colorantes sensibles al pH para medir el pH.

En algunas realizaciones de la invención, una medición obtenida de la concentración celular y/o una medición obtenida de un sensor de pH, determina que la alimentación de glucosa de manera restringida debe continuar posteriormente a una nueva tasa que es mayor que a una tasa inmediatamente anterior. La nueva tasa a la cual se alimenta glucosa de una manera restringida es de no más del 45 % de una tasa de consumo de glucosa esperada o determinada. En otras realizaciones, la nueva tasa se aumenta en el 1-15 % de la tasa inmediatamente anterior. En algunas realizaciones de la invención, la nueva tasa se aumenta en al menos el 15 % de la tasa inmediatamente anterior. En otras realizaciones de la invención, la nueva tasa se aumenta en no más del 50 % de la tasa inmediatamente anterior.

Ejemplos

Ejemplo 1

Medios

Ejemplo 1.1: Medios de inoculación

Se formuló un medio de inoculación base para que incluyese los mismos componentes que el medio DMEM/F12, pero añadiéndose los siguientes componentes: sulfato de dextrano 200 mg/l (la patente de Estados Unidos n.º 5.318.898 describe el uso del sulfato de dextrano en medios de cultivo), Nucellin 10 mg/l (un análogo de la insulina humana de origen de ADN recombinante; Eli Lilly (Indianapolis, IN)) y alcohol polivinílico (PVA) 2,4 g/l. El medio de inoculación base fabricado para estos experimentos carecían de glucosa. Para el medio de inoculación de control, se añadieron aproximadamente 10 g/l de glucosa al medio de inoculación base antes de la inoculación. Para el medio de inoculación utilizado en los cultivos de alimentación restringida de glucosa, se añadieron al medio de inoculación base glucosa 0,8 g/l y NaCl 1,3 g/l; se añadió NaCl de manera que la osmolalidad inicial del medio de inoculación utilizado en los cultivos de alimentación restringida de glucosa fuese similar a la osmolalidad inicial del medio de inoculación de control.

Ejemplo 1.2: Medios de alimentación

Se formuló el medio de alimentación base para que consistiese en los mismos componentes que el medio DMEM/F12-medio de inoculación base; el medio de alimentación base formulado para estos experimentos carecían de glucosa. Para el medio de alimentación de control, se añadieron aproximadamente 44 g/l de glucosa al medio de alimentación base.

Ejemplo 2: Fijación de las tasas de adición de glucosa

Un enfoque para la fijación de tasas de adición de glucosa para los cultivos de alimentación de glucosa restringida implicó examinar las tasas de consumo de glucosa por parte de células CHO durante todo un cultivo discontinuo de control típico. La concentración de glucosa en un cultivo de control típico se inició a un nivel alto (por ejemplo, de aproximadamente 10 g/l) y se redujo de forma sostenida durante el crecimiento exponencial normal; se realizaron adiciones de glucosa tras el día 3. Para estos cultivos de control, es necesaria la complementación de glucosa para evitar el agotamiento de la glucosa (por ejemplo, véase el perfil de concentración de glucosa para el cultivo de control en la FIG. 9).

Se determinaron las concentraciones de glucosa para cultivos de control utilizando procedimientos basados en muestreo, en los que se tomaron muestras en diversos puntos de tiempo tras la inoculación, y se determinaron las concentraciones de glucosa de las muestras. Se tomaron muestras de forma diaria y se analizaron utilizando el analizador Bioprofile 100 (Nova Biomedical Corp., Waltham, MA), el cual mide las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio. También se estimaron las concentraciones de glucosa de algunas muestras utilizando un kit Glucose HK (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, n.º de cat. GAHK-20).

En este enfoque basado en muestreo, se representó la tasa de glucosa consumida durante la fase de crecimiento exponencial del medio de cultivos de control frente al tiempo en incrementos de horas y días. Después, se generó una curva de mejor ajuste exponencial (es decir, $y = a \cdot e^{bx}$) utilizando estos puntos de datos (para la curva de mejor ajuste de la FIG. 1, por ejemplo, $a = 2,058$ y $b = 0,0064$). A partir de esta curva, se extrapolaron las tasas de consumo de glucosa (g/l/h) para proporcionar cantidades de alimentación restringida de glucosa de rampa baja y de rampa alta en cualquier punto de tiempo dado. Para los cultivos de alimentación restringida de rampa baja, los valores de la representación de la curva de mejor ajuste de control se multiplicaron por 33 % para estimar las tasas a las que se proporcionaría glucosa a los cultivos de alimentación restringida de rampa baja (véanse los triángulos negros de "rampa baja" de la FIG. 1). De manera similar, se multiplicaron los valores de la representación de la curva de mejor ajuste de control por 45 % para estimar las tasas a las que se proporcionaría glucosa a los cultivos de alimentación restringida de rampa alta (véanse los cuadrados negros de "rampa alta" de la FIG. 1). Los multiplicadores 33 % y 45 % se eligieron de forma arbitraria. Todos los multiplicadores que tenían porcentajes inferiores a 100 %, o funciones que relacionaban la tasa de alimentación restringida de glucosa con una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa en las que una tasa de alimentación restringida de glucosa calculada es inferior a una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa, están dentro del ámbito de la invención (excepto que las funciones admisibles no incluyan las relaciones en las que la tasa resultante de adición de glucosa es una adición invariante, de tasa constante, durante la duración del cultivo celular).

Otro enfoque para la alimentación de glucosa de una manera restringida implica utilizar un sistema de respuesta controlado por el pH en un sistema programado de cultivo de alimentación de glucosa restringida. Cuando un cultivo de células de mamífero (tales como células CHO) ha agotado la glucosa, las células del cultivo inician el consumo de lactato como una fuente de energía de carbohidrato alternativa. La disminución de la concentración de lactato en el cultivo celular da como resultado un incremento del pH (al que reacciona el sistema de respuesta controlado por el pH).

Durante la implementación de este enfoque, se programa una bomba de jeringa de una solución de glucosa para que suministre glucosa a una tasa restringida (por ejemplo, 0,032 g/l/h; véase la tasa de adición "de rampa baja" inicial de la Tabla 2), excepto que, cuando el pH del medio de cultivo asciende en 0,02 unidades de pH por encima de un valor predeterminado de 7,00, se activa el suministro de un bolo de alimentación de glucosa (0,05 a 0,2 g de glucosa suministrados a partir del medio de alimentación por litro de cultivo) y, además, posteriormente se aumenta la tasa de suministro restringido por parte de la bomba de jeringa a un nivel del 15 % al 50 % superior que la tasa de suministro restringido previa. Por ejemplo, el suministro de un bolo de 0,25 y 1,0 ml de medio de alimentación que contiene 0,2 g/ml de glucosa proporciona a un cultivo celular de 1 l aproximadamente 0,05 a 0,2 g de glucosa.

En otro enfoque, se mide la concentración celular de un cultivo celular sin muestreo para ayudar en el cálculo de tasas para la alimentación restringida de glucosa. Al iniciar los ensayos de este enfoque, se alimentó glucosa en el cultivo de manera que la concentración de glucosa permaneciese a un nivel considerado como adecuado para la concentración celular del cultivo. Se utilizó un espectrofotómetro Wedgewood (653 Absorbance Monitor con sensor de inserción modelo BT65 Series, Wedgewood Technology Inc., San Carlos, CA) para estimar la concentración celular en cultivos en tiempo real. Para estimar la concentración celular puede utilizarse de forma alternativa una sonda láser de turbidez (por ejemplo, modelo LA-300LT, ASR Co., Ltd., Tokio). Se emitió un haz de láser desde la sonda láser de turbidez a través del cultivo celular desde la fuente de luz de la sonda, y se utilizó una curva de calibración para convertir los valores de densidad óptica en concentraciones celulares. Aunque las propiedades de absorción lumínica de las células no son constantes y la distribución de tamaños de las células cambia durante el cultivo Zhou y Hu ((1994), Biotechnol. Bioeng. 44:170-77) han encontrado que la concentración celular total de una línea celular de hibridoma de ratón-ratón, MAK, se correlaciona de forma lineal con la señal procedente de una sonda láser de turbidez a concentraciones celulares por debajo de $3,0 \times 10^9$ células/litro. En consecuencia, para ayudar en el cálculo de las tasas para la alimentación restringida de glucosa pueden llevarse a cabo mediciones espectrofotométricas de la concentración celular (sin muestreo).

Otro enfoque combina un sistema de respuesta basado en un sensor de pH y un sistema obtenido de la concentración celular con el uso de un programa de arranque de la alimentación (configurado para aproximarse a las demandas esperadas de glucosa de un cultivo celular durante el tiempo). Puede utilizarse el sistema de respuesta basado en un sensor de pH o el sistema obtenido de la concentración celular, o ambos, sin muestreo del cultivo celular.

No es necesaria para la práctica de la invención el uso de una sonda sensora de glucosa para medir la concentración de glucosa directamente (y no simplemente según reflejan las mediciones de pH o de concentración celular) en tiempo real (y de una manera que no requiera el muestreo de un cultivo), en particular debido a que la invención proporciona tasas restringidas de suministro de glucosa a cultivos de células animales, en lugar de

simplemente mantener una concentración de glucosa baja en el cultivo, para superar la capacidad de las células de adaptarse a una concentración de glucosa baja. Sin embargo, el uso de un sensor de glucosa en la práctica de los procedimientos desvelado puede estar dentro del ámbito de la presente invención.

Ejemplo 3: Producción de BMP-2 en células CHO

5 El fin de estos experimentos fue implementar estrategias de alimentación restringida de glucosa para controlar la producción de lactato a niveles bajos en cultivos celulares semicontinuos (de forma concreta en cultivos de un litro (1 l)) que utilizaban células CHO (de forma concreta células EMC5) para la producción de proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2, siglas del inglés *bone morphogenetic protein-2*) recombinante (patente de Estados Unidos n.º 5.318.898; patente de Estados Unidos n.º 5.618.924 y patente de Estados Unidos n.º 5.631.142, describen adicionalmente las proteínas BMP-2 y su producción). Se supervisaron los efectos de las estrategias de alimentación restringida de glucosa sobre la concentración y viabilidad celulares, la producción de lactato, la productividad de proteína y la duración extendida del lote.

15 Se alimentó en un biorreactor solución estéril de glucosa de una manera restringida, utilizando una bomba de jeringa programada para aumentar la glucosa proporcionada a través de todo el cultivo celular semicontinuo. En un conjunto de ensayos se añadió glucosa al cultivo como función de (por ejemplo, como porcentaje de) una tasa previamente determinada de consumo de glucosa por parte de las células animales expuestas a un nivel alto de glucosa (es decir, como función de una tasa premodelada).

20 Además se supervisaron los episodios de privación de glucosa utilizando un sensor de pH (Bradley-James Corp.) que no requirió muestreo. Por consiguiente, un incremento de 0,02 unidades de pH por encima de un valor predeterminado de 7,00 se consideró que indicaba que se había agotado por completo la glucosa del medio de cultivo y que las células habían comenzado a consumir ácido láctico. La disminución de los niveles de ácido láctico en los cultivos provoca un aumento del pH del medio de cultivo celular; esta relación permite que un sistema basado en un sensor de pH anticipe los episodios de privación de glucosa.

25 Para evaluar la eficacia de un sistema basado en un sensor de pH para la prevención de la privación de glucosa en experimentos de alimentación restringida de glucosa, se programó una bomba de jeringa para suministrar un bolo de alimentación de glucosa en el biorreactor si el pH ascendía por encima de un valor predeterminado de 7,00. Un incremento de 0,02 unidades de pH por encima de 7,00 activaba el suministro de un bolo de alimentación de glucosa, aumentando la tasa restringida posterior de suministro continuo de glucosa en el 15 % en algunos ensayos, en el 50 % en otros.

30 En estos experimentos, se utilizaron biorreactores Applikon® de 2 l con un volumen de trabajo de 1 l (Applikon Biotechnology, Foster City, CA). Se proporcionó aire por chorro a demanda para mantener el oxígeno disuelto al 23 % de saturación de aire y se utilizó emulsión C antiespumante de calidad médica (Dow Coming Corporation, Midland, MI) para evitar el espumado. Durante todo el cultivo semicontinuo se mantuvo la temperatura a 37 °C. Se llenaron de forma aséptica jeringas Becton Dickinson® (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) con solución de glucosa de control o experimental para suministrar glucosa a los cultivos de control o de alimentación restringida, respectivamente, en los biorreactores.

35 En un primer experimento (es decir, un experimento de aumento esperado de la alimentación), un cultivo de control representativo utilizó cantidades crecientes de glucosa cada día, y se utilizó una curva de mejor ajuste exponencial para aproximar la cantidad de glucosa consumida por el cultivo de control cada día. Utilizando la curva de mejor ajuste como base, se configuró una bomba de jeringa (Yale Apparatus, Wantagh, NY) para alimentar glucosa al cultivo experimental a una tasa de alimentación restringida, es decir, aproximadamente al 50-70 % de la cantidad consumida por el cultivo de control. La tasa de alimentación restringida se cambió cada día para responder a la concentración celular creciente. La concentración de la alimentación de glucosa era de 200 g/l.

40 La concentración inicial de glucosa en el cultivo de control (1 l) era de 10,38 g/l. Después de poco más de tres días se añadió glucosa (2,2 g) al cultivo de control a intervalos de 24 h (es decir, a las 75,5, 99,5 y 123,5 h de cultivo) (Tabla 1, FIG. 2 y FIG. 6). La concentración inicial de glucosa en el cultivo de alimentación restringida (1 l) era de 1,1 g/l. Se aumentó en cuatro veces la tasa de alimentación restringida continua de glucosa en el cultivo de alimentación restringida (tras 27,5, 51,5, 75,5 y 99,5 h de cultivo) a partir de una tasa de alimentación restringida continua inicial de 0,046 g/l/h (la cual se mantuvo en el periodo de cultivo de de 20 a 27,5 horas) (Tabla 1).

50 Tabla 1. Experimento de alimentación de aumento esperado: adición de glucosa

Adición de glucosa al cultivo de control de 1 l (concentración inicial de glucosa: 10,38 g/l)		Tasas de adición al cultivo de alimentación restringida (concentración inicial de glucosa: 1,1 g/l)	
Punto (h)	Cantidad (g)	Periodo (h)	Tasa (g/l/h)
--	--	0 - 20	0
--	--	20 - 27,5	0,046

(continuación)

Adición de glucosa al cultivo de control de 1 l (concentración inicial de glucosa: 10,38 g/l)		Tasas de adición al cultivo de alimentación restringida (concentración inicial de glucosa: 1,1 g/l)	
Punto (h)	Cantidad (g)	Periodo (h)	Tasa (g/l/h)
--	--	27,5 - 51,5	0,068
75,5	2,2	51,5 - 75,5	0,088
99,5	2,2	75,5 - 99,5	0,104
123,5	2,2	99,5 - 147,5	0,12

La tasa de consumo de glucosa en el cultivo de alimentación restringida se aproximaba a la tasa restringida de suministro de glucosa a lo largo de toda la duración de la alimentación restringida continua de glucosa en el cultivo de alimentación restringida. Esto se pone de manifiesto en que la concentración de glucosa en el cultivo de alimentación restringida permanece próxima a cero tras comenzar la alimentación continua de glucosa de una manera restringida tras 20 h de cultivo (FIG. 6). Por otro lado, las tasas de consumo de glucosa en los cultivos de control no estaban limitadas por una tasa restringida de suministro de glucosa. En consecuencia, las tasas de consumo de glucosa en los cultivos de control continuaron durante varios días a niveles más altos que en los cultivos de alimentación restringida (Tabla 6). Las concentraciones de lactato (FIG. 6) y las tasas de producción de lactato (Tabla 7) también permanecieron más bajas para los cultivos de alimentación restringida que para los cultivos de control a lo largo de todo este experimento de alimentación de aumento esperado.

En un segundo experimento (es decir, un experimento de alimentaciones premodeladas), se utilizó la programación de arranque de la alimentación de una bomba de jeringa doble (KD Scientific, Holliston, MA). Para este experimento de alimentaciones premodeladas, la concentración de glucosa era de 0,28 g/ml para la alimentación de glucosa de rampa alta y de 0,20 g/ml para la alimentación de glucosa de rampa baja. En contraste con el experimento de alimentación de aumento esperado, por el cual la bomba de jeringa suministró glucosa de forma continua a una tasa prefijada de alimentación restringida durante un periodo de tiempo, por ejemplo 0,046 g/h entre las 20-20,7 horas y 0,068 g/h entre 27,5 y 51,5 las horas, etc., la programación de arranque de la bomba de jeringa en el experimento de alimentaciones premodeladas permitió que la tasa de alimentación restringida de glucosa aumentase de forma gradual hasta asemejarse al 33 % y el 45 % de la curva de mejor ajuste exponencial de glucosa consumida por el cultivo de control cada día. La programación de arranque permitió programar las tasas restringidas inicial y final para cada periodo de tiempo, por ejemplo 12 h, y la bomba cambiaría la tasa de forma continua de modo lineal durante ese periodo de tiempo. La Tabla 2 proporciona datos representativos sobre la adición de glucosa para este experimento de alimentaciones premodeladas.

Tabla 2. Experimento de alimentaciones premodeladas: adición de glucosa

Adición de glucosa al cultivo de control de 1 l (concentración inicial de glucosa: 8,4 g/l)	
Punto (h)	Cantidad (g)
--	--
--	--
--	--
67,5	2,2
94,75	2,2
119,75	2,2
143,75	2,2
167,75	2,2
191	2,2

(continuación)

Alimentación restringida			
		Tasas de adición a cultivos de alimentación restringida (concentración inicial de glucosa: 0,88 g/l)	
Periodo (h)	Tasa de la jeringa (ml/h)	Rampa baja (alimentación de 0,2 g/ml) g/hora añadidos a 1 l	Rampa alta (alimentación de 0,28 g/ml) g/hora añadidos a 1 l
0 - 19,75	0	0	0
19,75 - 43,75	0,160 - 0,184	0,0320 - 0,0368	0,0448 - 0,0515
43,75 - 67,75	0,184 - 0,224	0,0368 - 0,0448	0,0515 - 0,0627
67,75 - 91,75	0,224 - 0,264	0,0448 - 0,0528	0,0627 - 0,0739
91,75 - 115,75	0,264 - 0,304	0,0528 - 0,0608	0,0739 - 0,0851
115,75 - 139,75	0,304 - 0,344	0,0608 - 0,0688	0,0851 - 0,0963
139,75 - 140,25	0,344 - 0,346	0,0688 - 0,0692	0,0963 - 0,0969
140,25 - 164,25	0,400 - 0,450	0,0800 - 0,0900	0,1120 - 0,1260
164,25 - 191	0,450	0,0900	0,1260

La FIG. 2 representa la cantidad acumulada de glucosa suministrada a lo largo del tiempo para el experimento de alimentación de incremento esperada, y la FIG. 3 representa la cantidad acumulada de glucosa suministrada a lo largo del tiempo para el experimento de alimentaciones premodeladas. Las FIG. 2 y 3 incluyen, cada una, las cantidades iniciales de glucosa proporcionadas en los reactores tanto de control como de alimentación restringida (y no simplemente las cantidades de glucosa total suministrada por jeringa). En ambos experimentos, un lote de control tenía un nivel inicialmente alto de glucosa, y se añadió glucosa (2,2 g) de forma diaria tras aproximadamente 72 h. Para los cultivos de alimentación restringida, los biorreactores tenían en el día 0 aproximadamente 1 g/l de glucosa, y el suministro de glucosa por jeringa comenzó tras aproximadamente después de 20 horas.

El experimento de alimentación de aumento esperado demostró que el crecimiento celular en el cultivo de alimentación restringida inicialmente se encontraba retardado en comparación con el crecimiento celular en el cultivo de control, pero que el crecimiento celular en el cultivo de alimentación restringida finalmente alcanzó en el día 6 una concentración celular final más alta (FIG. 4). En el cultivo de control, la concentración celular alcanzó un máximo mucho antes y la viabilidad comenzó a descender rápidamente tras el día 4 (FIG. 4). En contraste con el cultivo de control, la tasa de crecimiento celular en el cultivo de alimentación restringida permaneció positiva hasta el día 6 (Tabla 3).

Aunque el cultivo de alimentación restringida alcanzó una concentración celular final más alta en comparación con el cultivo de control en el día 6, el día 5 los cultivos tenían concentraciones similares (figura 4). Estos datos demuestran que la viabilidad disminuida de las células en el cultivo de control en comparación con la viabilidad de las células en el cultivo de alimentación restringida no era una función de las células que alcanzan la capacidad máxima del biorreactor. En cambio, los datos de la Figura 4 en combinación con la demostración de un nivel bajo de lactato en los cultivos de alimentación restringida en comparación con el nivel de lactato en los cultivos de control (Figura 6) sugieren que la viabilidad aumentada de las células cultivadas en los cultivos de alimentación restringida era una función del nivel bajo de lactato alcanzado mediante la alimentación de glucosa de una manera restringida a las células.

Tabla 3. Experimento de alimentación de aumento esperado: tasas de crecimiento celular (valores μ de Cedex por h; valores μ de Cedex = concentración celular en unidades de 10^5 células por ml)

Día	Tasas de crecimiento de control ($\mu \cdot h^{-1}$)	Tasas de crecimiento de alimentación restringida ($\mu \cdot h^{-1}$)
1	0,027	0,027
2	0,032	0,026
4	0,016	0,017
5	0,001	0,007
6	-0,014	0,005

La FIG. 5 presenta gráficos de los títulos de BMP-2 normalizados. Los valores de los títulos de BMP-2 se normalizaron como una fracción del valor del título de BMP-2 en el día 6 del experimento de alimentación de aumento esperado. La Tabla 4 presenta los valores para las tasas de producción de BMP-2 correspondientes. Las tasas de producción de BMP-2 se normalizan como una fracción de la tasa de producción de BMP-2 del cultivo de control en el día 1. Tras el día 4, los títulos de BMP-2 se estabilizaron en el cultivo de control, pero continuaron

5 aumentando en el cultivo de alimentación restringida (FIG. 5). En contraste con el cultivo de control, las tasas de producción de BMP-2 del cultivo de alimentación restringida permanecieron positivas hasta el día 6 (Tabla 4). Debe indicarse que, aunque la FIG. 5 sugiere que los cultivos de control demostraron el día 5 un título ligeramente disminuido de BMP-2, es probable que las pequeñas disminuciones observadas sean un reflejo de la variabilidad experimental y no una disminución real del título de BMP-2 del cultivo.

Tabla 4. Experimento de alimentación de aumento esperado: tasa de producción de BMP-2 (normalizada)

Día	Tasa de producción de control	Tasa de producción en alimentación restringida
1	1,00	0,84
2	0,71	0,77
4	0,40	0,65
5	-0,07	0,21
6	0,08	0,40

10 El mantenimiento de un nivel bajo de ácido láctico utilizando una estrategia de alimentación de glucosa de una manera restringida potenció el crecimiento celular y la productividad de proteína. El título final de BMP2 era aproximadamente el 70 % más alto en el cultivo de alimentación restringida (FIG. 5) y la tasa de producción de BMP-2 no se hizo negativa como lo hizo en el cultivo de control (Tabla 4).

15 La FIG. 6 presenta perfiles de concentración de glucosa (g/l) y de concentración de lactato (g/l) del experimento de alimentación de aumento esperado, y la Tabla 5 presenta los datos representativos correspondientes de concentración de glucosa (g/l) y de concentración de lactato (g/l) de este experimento. La Tabla 6 presenta valores para las tasas de consumo de glucosa correspondientes, y la Tabla 7 presenta valores para las tasas de producción de lactato correspondientes.

Tabla 5. Experimento de alimentación de aumento esperado: concentraciones de glucosa y de lactato

Hora	Concentración de glucosa (g/l)	
	Control	Alimentación restringida
0	10,38	1,10
20,75	8,96	0,22
51,25	5,20	0,06
75,5	7,40	--
92,5	0,78	0,07
99,5	2,98	--
115,25	0,10	0,08
123,5	2,30	--
142,5	0,10	0,07
Horas	Concentración de lactato (g/l)	
	Control	Alimentación restringida
0	0,12	0,16
20,75	1,40	1,14
51,25	3,40	2,26
75,5	--	--
92,5	5,78	3,82
99,5	--	--
115,25	6,50	4,20
123,5	--	--
142,5	6,96	4,60

Tabla 6. Experimento de alimentación de aumento esperado: tasa de consumo de glucosa

Día	Q _{glucosa} de control (mg/10 ⁶ células/día)	Q _{glucosa} de alimentación restringida (mg/10 ⁶ células/día)
1	1,90	1,32
2	1,54	1,02
4	0,90	0,66
5	0,51	0,53
6	0,39	0,48

Tabla 7. Experimento de alimentación de aumento esperado: tasa de producción de lactato

Día	Q _{lactato} de control (mg/10 ⁶ células/día)	Q _{lactato} de alimentación restringida (mg/10 ⁶ células/día)
1	1,71	1,41
2	0,82	0,55
4	0,32	0,26
5	0,13	0,08
6	0,08	0,06

- 5 Para el cultivo de alimentación restringida en el experimento de alimentación de aumento esperado, las tasas de consumo de glucosa eran más bajas en el cultivo de alimentación restringida que en el cultivo de control del día 1 al día 3 (Tabla 6), y las tasas de producción de lactato durante todo el periodo de cultivo eran más bajas en el cultivo de alimentación restringida que en el cultivo de control (Tabla 7), lo que dio como resultado concentraciones de lactato más bajas para el cultivo de alimentación restringida, durante todo el periodo de cultivo (FIG. 6).
- 10 También se midieron los perfiles de osmolalidad y la cantidad de titulador (una mezcla de carbonato sódico y bicarbonato sódico) utilizado por día en cada uno de los biorreactores. La Tabla 8 presenta los perfiles de osmolalidad, y la Tabla 9 presenta la cantidad de titulador utilizado por día (por cada 1 l de volumen de trabajo) en cada una de las dos condiciones de cultivo.

Tabla 8. Experimento de alimentación de aumento esperado: osmolalidad

Día	Osmolalidad de control (mOsm/l)	Osmolalidad de glucosa restringida (mOsm/l)
0	286	289
1	295	312
2	340	324
4	382	371
5	394	362
6	413	375

15

Tabla 9. Experimento de alimentación de aumento esperado: uso de titulador

Día	Uso de titulador de control (ml/día)	Uso de titulador en glucosa restringida (ml/día)
0-1	3	1
1-2	16	3
2-4	25	20
4-5	10	1
5-6	6	9

20

El nivel de osmolalidad en general más bajo (Tabla 8) y el uso más bajo de titulador (Tabla 9) en el cultivo de alimentación restringida (frente al cultivo de control) pueden atribuirse a las cantidades más bajas de lactato producidas (que requieren menor neutralización con titulador).

En el experimento de alimentaciones premodeladas, se estableció como control un biorreactor; se mantuvo en él un cultivo semicontinuo convencional. Además, se prepararon dos biorreactores de ensayo con cultivos de alimentación restringida - uno para el suministro restringido de glucosa de "rampa baja" y otro para el suministro restringido de glucosa de "rampa alta". Para cada biorreactor de ensayo se utilizó una bomba de jeringa para aumentar de forma

continua la tasa de alimentación restringida de glucosa. La concentración de la solución de glucosa administrada en el biorreactor de rampa baja era de 0,2 g/ml; la concentración en el biorreactor de rampa alta era de 0,28 g/ml.

La FIG. 7 presenta de forma gráfica los datos de concentración celular (líneas continuas) y de viabilidad celular (líneas discontinuas) a lo largo de los periodos de cultivo en biorreactores de control y de ensayo; la Tabla 10 presenta los datos de tasas de crecimiento celular para los biorreactores de control y de ensayo.

Tabla 10. Experimento de alimentaciones premodeladas: tasas de crecimiento celular (valores μ de Cedex por h; valores μ de Cedex = concentración celular en unidades de 10^5 células por ml)

Día	Tasas de control ($\mu \cdot h^{-1}$)	Tasas de rampa baja ($\mu \cdot h^{-1}$)	Tasas de rampa alta ($\mu \cdot h^{-1}$)
1	0,030	0,026	0,024
2	0,035	0,029	0,030
3	0,029	0,026	0,025
4	0,009	0,016	0,017
5	0,005	0,011	0,010
6	-0,004	0,012	0,009
7	-0,013	0,006	0,005
8	-0,012	0,002	0,003

En ambos cultivos de alimentación restringida, la concentración celular continuó aumentando hasta el día 8 (192 h); además, la viabilidad celular se mantuvo en niveles altos a lo largo de este mismo periodo (FIG. 7). Por el contrario, aproximadamente el día 5 (120 horas) la concentración celular en el cultivo de control alcanzó un máximo, seguido de una bajada brusca de la concentración celular, y una bajada todavía más brusca de la viabilidad celular (FIG. 7). El cultivo de rampa baja alcanzó una concentración celular de más de 12×10^6 células/ml el día 8, y la viabilidad celular se mantuvo superior al 90 % (FIG. 7).

Los niveles del título de BMP-2 observados en los cultivos de alimentación restringida respaldan la utilidad de los procedimientos de la invención para mejorar la producción de proteínas a partir de células animales en cultivo (en particular para el cultivo en rampa baja). La FIG. 8 presenta los niveles del título de BMP-2 para los biorreactores de control y de ensayo normalizados como una fracción del título de BMP-2 máximo (día 5) para el cultivo de control. La Tabla 11 presenta las tasas de producción de BMP-2 para los biorreactores de control y de ensayo normalizados como una fracción de la tasa de producción de BMP-2 del cultivo de control el día 1 (como también se ha normalizado en la Tabla 4).

Tabla 11. Experimento de alimentaciones premodeladas: tasa de producción de BMP-2 (normalizada)

Día	Tasa de producción de control	Tasa de producción de rampa baja	Tasa de producción de rampa alta
1	1,00	1,19	1,17
2	1,01	0,75	0,77
3	0,94	0,94	1,02
4	0,67	0,86	1,02
5	0,16	1,06	0,56
6	-0,19	1,15	0,59
7	-0,39	0,52	-0,02
8	-0,02	0,43	-0,03

El título final más alto se consiguió en el cultivo de alimentación restringida de rampa baja; este nivel del título es más de tres veces más alto que el título máximo de BMP-2 alcanzado en el cultivo de control (FIG. 8). La tasa de producción de BMP-2 se mantuvo alta durante seis días en el cultivo de rampa baja (Tabla 11). La tasa de producción de BMP-2 en el cultivo de alimentación restringida de rampa alta descendió más rápidamente que la tasa de producción de BMP-2 en el cultivo de alimentación restringida de rampa baja (Tabla 11). Este descenso más rápido de la tasa de producción de BMP-2 se debe con probabilidad a la presencia de un nivel más alto de inhibidores, tales como el lactato, en el cultivo de rampa alta que en el cultivo de rampa baja.

La FIG. 9 presenta perfiles de concentraciones (g/l) de glucosa (líneas continuas) y de lactato (líneas discontinuas) del experimento de las alimentaciones premodeladas para los biorreactores de control y de ensayo, y la Tabla 12 presenta los datos representativos correspondientes para las concentraciones (g/l) de glucosa y de lactato

procedentes de este experimento. La Tabla 13 presenta datos de la tasa de consumo de glucosa, y la Tabla 14 presenta datos de la tasa de producción de lactato, para los biorreactores de control y de ensayo.

Tabla 12. Experimento de alimentaciones premodeladas: concentraciones de glucosa y de lactato

	Concentración de glucosa (g/l)		
		Alimentación restringida	
Horas	Control	Rampa baja	Rampa alta
0	10,46	1,09	1,09
18,75	8,68	0,01	0,00
42,75	6,38	0,12	0,08
66,25	3,07	0,05	0,05
67,75	5,82	--	--
92,25	1,61	0,16	0,11
94,75	4,36	--	--
115,75	0,44	0,06	0,05
119,75	3,19	--	--
139,75	0	0	0
143,75	2,75	--	--
164,5	0,54	0,07	0,22
167,75	3,29	--	--
187,25	0,87	0,06	0,39
191	3,62	--	--
	Concentración de lactato (g/l)		
		Alimentación restringida	
Hora	Control	Rampa baja	Rampa alta
0	0,01	0,02	0,01
18,75	1,20	1,06	1,08
42,75	2,90	1,58	1,88
66,25	4,68	2,06	2,77
67,75	--	--	--
92,25	5,92	2,20	3,43
94,75	--	--	--
115,75	7,76	1,86	3,68
119,75	--	--	--
139,75	8,04	1,24	4,08
143,75	--	--	--
164,5	7,60	1,18	4,36
167,75	--	--	--
187,25	7,72	1,09	4,76
191	--	--	--

Tabla 13. Experimento de alimentaciones premodeladas: tasa de consumo de glucosa

Día	Q_{glucosa} de control (mg/10 ⁶ células/día)	Q_{glucosa} de rampa baja (mg/10 ⁶ células/día)	Q_{glucosa} de rampa alta (mg/10 ⁶ células/día)
1	2,90	1,67	1,69
2	1,43	0,45	0,68
3	0,99	0,36	0,48
4	0,73	0,22	0,33
5	0,63	0,22	0,29
6	0,49	0,18	0,26
7	0,40	0,18	0,27
8	0,65	0,18	0,26

Tabla 14. Experimento de alimentaciones premodeladas: tasa de producción de lactato

Día	Q_{lactato} de control (mg/10 ⁶ células/día)	Q_{lactato} de rampa baja (mg/10 ⁶ células/día)	Q_{lactato} de rampa alta (mg/10 ⁶ células/día)
1	1, 94	1,61	1,66
2	1, 06	0,35	0,53
3	0,53	0,17	0,31
4	0,22	0,03	0,13
5	0,30	-0,05	0,04
6	0,04	-0,07	0,05
7	-0,08	-0,01	0,03
8	0,03	-0,01	0,04

- 5 Los perfiles de líneas discontinuas de la FIG. 9 ponen de manifiesto las diferencias de producción de lactato entre los tres cultivos. La comparación de estos perfiles de la FIG. 9 revela que los niveles de lactato más bajos aparecen cuando la alimentación de glucosa restringida se estableció a una tasa de "gradiente bajo". La muy baja tasa de producción de lactato en el cultivo con alimentación restringida de glucosa de rampa baja (FIG. 9 y Tabla 14) probablemente es responsable de la capacidad de las células en ese cultivo de mantener tal productividad alta. La
- 10 tasa de consumo de glucosa se estabilizó en aproximadamente 0,2 mg/10⁶ células/día en el cultivo de rampa baja (Tabla 13).

La Tabla 15 presenta los perfiles de osmolalidad para los cultivos de control y de alimentación restringida, y la Tabla 16 presenta los datos de uso de titulador para estos cultivos (nuevamente, por volumen de trabajo de 1 l).

Tabla 15. Experimento de alimentaciones premodeladas: osmolalidad

Día	Osmo. de control (mOsm/l)	Osmo. de rampa baja (mOsm/l)	Osmo. de rampa alta (mOsm/l)
0	290	288	271
1	299	290	293
2	320	298	304
3	349	306	324
4	n.e.	n.e.	n.e.
5	408	296	334
6	427	287	353
7	437	221	308
8	413	237	366

Tabla 16. Experimento de alimentaciones premodeladas: uso de titulador

Día	Titulador de control (ml/día)	Titulador de rampa baja (ml/día)	Gradiente alto de titulador (ml/día)
1	1	0	5
2	8	2	3
3	10	2	4
4	13	2	6
5	10	1	4
6	8	3	8
7	5	1	2
8	5	0	7

La osmolalidad en el cultivo de alimentación restringida de rampa baja aumentó de forma ligera desde un nivel de partida de 288 mOsm/l hasta solo 306 mOsm/l el día 3, antes de estabilizarse en un nivel de 237 mOsm/l el día 8 (Tabla 15). El cultivo de rampa baja también requirió relativamente poco titulador del día 1 al día 8 (Tabla 16). Por otra parte, la osmolalidad en el cultivo de control aumentó en casi el 50 % hasta el día 7 (Tabla 15), y el uso de titulador para el cultivo de control en todo momento sobrepasó el uso de titulador para el cultivo de rampa baja (Tabla 16). De manera similar, excepto en el día 1 y el día 8, el uso de titulador para el cultivo de control también sobrepasó el uso de titulador para el cultivo de alimentación restringida de rampa alta (Tabla 16). Como en el experimento de alimentación de aumento esperado, el nivel más bajo de osmolalidad (Tabla 15) y el uso en general más bajo de titulador (Tabla 9) en los cultivos de alimentación restringida (cultivos de alimentación restringida tanto de rampa baja como alta) frente al cultivo de control, se pueden atribuir a las menores cantidades de lactato producidas (que requieren menos neutralización con titulador) en el experimento de alimentación premodelada.

La alimentación de glucosa de una manera restringida en los medios de cultivo celular (y de esta manera el mantenimiento de la producción de lactato baja en el medio) tenía varios efectos positivos en estos experimentos (en particular sobre la productividad de proteína; FIG. 5 y Tabla 4, y FIG. 8 y Tabla 11). Estos efectos positivos se obtuvieron programando los suministros de glucosa para que aumentasen en todos estos cultivos semicontinuos, para anticipar las necesidades de glucosa estimadas para los aumentos esperados o premodelados de las necesidades de glucosa (por ejemplo, como resultado de los aumentos de la concentración celular), aunque en todo momento alimentando la glucosa de una manera restringida.

Esta estrategia de alimentación restringida dio como resultado reducciones significativas de las tasas de producción de lactato (en todo el experimento de alimentación de aumento esperado - Tabla 7; véase también la FIG. 6 - y en la mayor parte del experimento de alimentaciones premodeladas - Tabla 14; véase también la FIG. 9) en comparación con los cultivos de control, en los cuales el medio de cultivo celular inicialmente contenía un nivel elevado de glucosa (por ejemplo, de aproximadamente 10 g/l). La concentración celular (ver las Tablas 3 y 10) y los niveles de producción de proteína (véanse las Tablas 4 y 11) en los cultivos de ensayo de alimentación restringida continuaron aumentando después de que estos determinantes alcanzaran un máximo en los cultivos de control. En particular, en el experimento de alimentaciones premodeladas, el cultivo de alimentación restringida de rampa baja logró un título final de proteína recombinante que era más de tres veces más alto que el título máximo del cultivo de control (FIG. 8).

En vista de los niveles de títulos de BMP2 normalizados logrados (FIG. 8), puede observarse que una ventaja clave de la alimentación restringida de glucosa para el control de la producción del ácido láctico a niveles bajos es la mejora de la productividad del procedimiento (en particular cuando se mide en términos de tasas de producción de proteína). La alimentación de glucosa de una manera restringida para el control de la producción del ácido láctico en niveles bajos también puede facilitar la productividad del procedimiento al medir ésta última en términos de concentración celular (FIG. 7).

Resulta importante que los beneficios de la invención se logran mediante tasas restringidas de suministro de glucosa a los cultivos de ensayo, en lugar de simplemente mediante el mantenimiento de las concentraciones de glucosa bajas en los cultivos de ensayo. Por ejemplo, los perfiles de concentración de glucosa en los cultivos tanto de rampa baja como de rampa alta del experimento de alimentaciones premodeladas eran, de manera similar, bajos, pero el perfil de producción de lactato del cultivo de rampa baja permaneció claramente por debajo del perfil de producción de lactato del cultivo de rampa alta (FIG. 9 y Tabla 12). Por consiguiente, los perfiles metabólicos beneficiosos son el resultado de la adaptación de las células animales en cultivo para crecer en condiciones de cultivo en las que la disponibilidad de glucosa está limitada por el suministro restringido de glucosa al cultivo, en particular cuando el suministro restringido se basa en tasas esperadas o premodeladas de las capacidades de consumo de glucosa por parte de las células animales en cultivo. Con independencia de cuántos transportadores de glucosa expresan las células en cultivo, las células tienen la capacidad de obtener suficiente glucosa para producir solo niveles bajos de ácido láctico al alimentar la glucosa a los cultivos sólo a una tasa restringida.

Ejemplo 4:

Sistema basado en un sensor de concentración celular

5 Para facilitar el suministro de glucosa a tasas restringidas en tiempo real puede utilizarse un sensor de la concentración celular que no se basa en muestreo. Un sistema de verificación por ordenador mediante el cual pueden determinarse las concentraciones celulares sin muestreo (por ejemplo, a través del uso de un sistema en el que la concentración celular de un cultivo de células animales se estima a través de mediciones fotométricas de la turbidez del cultivo) se programa para que registre las concentraciones celulares cada cinco minutos, y para enviar esos datos a un sistema informático conectado que controla el suministro de glucosa al cultivo de células animales. Este sistema informático conectado está programado, a su vez, tanto para calcular una tasa de suministro restringido de glucosa como para suministrar glucosa al cultivo de células animales a esa tasa restringida. Esta tasa restringida de suministro de glucosa es una función de una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa para las células a la concentración celular estimada.

15 Se prepara un sistema de suministro de glucosa basado en una jeringa al igual que para el cultivo de alimentación restringida de glucosa de rampa baja (es decir, con una solución de alimentación de glucosa 0,2 g/ml) del ejemplo anterior. Para las concentraciones celulares entre $1,4 \times 10^6$ células/ml y $1,6 \times 10^6$ células/ml en un sistema de cultivo de células animales de 1 l, se determina que una tasa restringida de suministro de glucosa a un cultivo es (como función de una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa) de 8,4 mg de glucosa/h, mientras que para concentraciones celulares entre $1,9 \times 10^6$ células/ml y $2,1 \times 10^6$ células/ml en un sistema de cultivo de células animales de 1 l, se determina que una tasa restringida de suministro de glucosa a un cultivo es (nuevamente como función de una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa) de 11 mg de glucosa/hora. Por consiguiente, cuando el sistema informático de verificación mide que la concentración celular es aproximadamente de $1,5 \times 10^6$ células/ml, el sistema informático conectado que controla el suministro de glucosa al cultivo de células animales ajusta en tiempo real la tasa de suministro de glucosa al cultivo, de manera que la jeringa suministra 0,042 ml/h de la solución de alimentación de glucosa 0,2 g/ml (es decir, se suministra glucosa al sistema de cultivo celular a una tasa de 8,4 mg/h). Más tarde, cuando el que el sistema informático de verificación mide que la concentración celular es aproximadamente de $2,0 \times 10^6$ células/ml, el sistema informático conectado que controla el suministro de glucosa al cultivo de células animales ajusta en tiempo real la tasa de suministro de glucosa al cultivo, de manera que la jeringa suministra 0,055 ml/h de la solución de alimentación de glucosa 0,2 g/ml (es decir, se suministra glucosa al sistema de cultivo celular a una tasa de 11 mg/h).

30 La invención anteriormente descrita para la alimentación restringida de glucosa en cultivos celulares proporciona un procedimiento práctico para mejorar el rendimiento del cultivo de células animales. Este procedimiento práctico proporciona una opción sencilla para la mejora del cultivo celular a escala industrial.

35 La descripción y ejemplos detallados anteriores se han proporcionado solo para ofrecer una mejor comprensión. No deben interpretarse limitaciones innecesarias de los mismos. La invención no se limita a los detalles exactos mostrados y descritos, debido a que las variaciones que puede determinar un experto en la materia se encuentran comprendidas dentro de la invención definida en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de cultivo celular para controlar la producción de ácido láctico a niveles bajos en un cultivo celular semicontinuo que comprende:
- 5 mezclar células animales y un medio para formar un cultivo celular; y
 alimentar glucosa de una manera restringida al cultivo celular,
- en el que la alimentación de glucosa de una manera restringida comprende proporcionar glucosa al cultivo celular a una tasa que es una función de una tasa esperada o una premodelada de consumo de glucosa por parte de las células animales cultivadas en medio que contiene un alto nivel de glucosa,
- 10 en el que la función es la multiplicación de la tasa esperada o la tasa premodelada por un porcentaje menor del 100 %, y,
 en el que el porcentaje no es más del 45 %, y
 en el que se utiliza un sensor de pH para supervisar el pH del cultivo celular, y, en respuesta a un incremento por encima de un valor de pH predeterminado, se alimenta glucosa adicional de una manera restringida al cultivo celular.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el porcentaje es al menos del 33 %.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la alimentación de glucosa de una manera restringida comprende la adición de uno o más bolos de alimentación de glucosa.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la alimentación de glucosa de una manera restringida se lleva a cabo sin muestreo de control por retroalimentación durante el cultivo.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se utiliza un sensor para supervisar la concentración celular en el cultivo celular, y se utiliza de forma adicional una medición obtenida del sensor de concentración celular en el cálculo de la tasa de alimentación de glucosa de una manera restringida al cultivo celular.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la glucosa adicional alimentada de una manera restringida comprende uno o más bolos de alimentación de glucosa.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el valor de pH predeterminado es aproximadamente de 7.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se utiliza un sensor de pH para supervisar el pH del cultivo celular, y, en respuesta a un incremento por encima de un valor de pH predeterminado, la alimentación de glucosa de una manera restringida continúa posteriormente a una tasa nueva que es mayor que una tasa inmediatamente anterior.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la tasa nueva es mayor en al menos el 15 % superior a la tasa inmediatamente anterior.
- 30 10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la tasa nueva es mayor en no más del 50 % superior a la tasa inmediatamente anterior.
11. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la respuesta a un incremento por encima de un valor de pH predeterminado comprende adicionalmente la adición de uno o más bolos de alimentación de glucosa al cultivo celular.
- 35 12. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el valor de pH predeterminado es aproximadamente de 7.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que
- 40 (i) se utiliza un sensor de concentración celular para supervisar la concentración celular en el cultivo celular sin muestreo, y se utiliza de forma adicional una medición obtenida del sensor de concentración celular en el cálculo de la tasa de alimentación de glucosa de una manera restringida al cultivo celular;
- (ii) se utiliza un sensor de pH para supervisar el pH del cultivo celular sin muestreo, y, en respuesta a un incremento por encima de un valor de pH predeterminado, la alimentación de glucosa de una manera restringida continúa posteriormente a una tasa nueva que es mayor que una tasa inmediatamente anterior; o
- 45 (iii) se utilizan tanto el sensor de concentración celular como el sensor de pH, como se describe en (i) y (ii), respectivamente.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la respuesta a un incremento por encima de un valor de pH predeterminado en (ii) y/o (iii) comprende adicionalmente la adición de uno o más bolos de alimentación de glucosa al cultivo celular.
15. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el valor de pH predeterminado es aproximadamente de 7.
- 50 16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la tasa premodelada se determina mezclando

- células animales y un medio que contiene un alto nivel de glucosa para formar un primer cultivo celular; y determinando una tasa de consumo de glucosa para las células animales cultivadas en el primer cultivo celular.
- 5 17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que se utiliza un sensor de pH para supervisar el pH del segundo cultivo celular, y, en respuesta a un incremento por encima de un valor de pH predeterminado, la alimentación de glucosa de una manera restringida comprende adicionalmente la adición de uno o más bolos de aporte de glucosa al segundo cultivo celular.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que la alimentación de glucosa de una manera restringida al segundo cultivo celular comprende adicionalmente continuar posteriormente la alimentación a una tasa nueva que es mayor que una tasa inmediatamente anterior.
- 10 19. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el valor de pH predeterminado es aproximadamente de 7.
20. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la tasa nueva es mayor en al menos el 15 % superior a la tasa inmediatamente anterior.
21. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la tasa nueva es mayor en no más del 50 % superior a la tasa inmediatamente anterior.
- 15 22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la tasa premodelada se determina mezclando células animales y un medio que contiene un alto nivel de glucosa para formar un primer cultivo celular; determinando una tasa de consumo de glucosa para las células animales cultivadas en el primer cultivo celular; mezclando células animales y un medio para formar un segundo cultivo celular; y alimentando glucosa de una manera restringida al segundo cultivo celular a una tasa que es una función de la tasa de consumo de glucosa
- 20 determinada; en el que
- (i) se utiliza un sensor de concentración celular para supervisar la concentración celular en el segundo cultivo celular sin muestreo, y se utiliza adicionalmente una medición obtenida del sensor de concentración celular en el cálculo de la tasa de alimentación de glucosa de una manera restringida al segundo cultivo celular;
- 25 (ii) se utiliza un sensor de pH para supervisar el pH del segundo cultivo celular sin muestreo, y, en respuesta a un incremento por encima de un valor predeterminado de pH, la alimentación de glucosa de una manera restringida continúa posteriormente a una tasa nueva que es mayor que una tasa inmediatamente anterior; o
- (iii) se utilizan tanto el sensor de concentraciones celulares como el sensor de pH, como se describe en (i) y (ii), respectivamente.
- 30 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que la respuesta a un incremento por encima de un valor de pH predeterminado en (ii) y/o (iii) comprende adicionalmente la adición de uno o más bolos de alimentación de glucosa al segundo cultivo celular.

















