(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 T3

(96) Número de solicitud europea: **04752591 .0**
(96) Fecha de presentación : **17.05.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1623019**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2006**

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

(30) Prioridad: **15.05.2003 US 470937 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.09.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.09.2010

(73) Titular/es: **Wyeth L.L.C.**
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US

(72) Inventor/es: **Drapeau, Denis;**
Stanek, Terry, Cardoza y
Luan, Yen-Tung

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Alimentación restringida de glucosa para el cultivo de células animales.

Campo de la invención

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de patente US nº de serie 60/470.937, presentada el 15 de mayo de 2003, que se incorpora como referencia en la presente memoria en su totalidad.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La invención se refiere a un método para mejorar la producción de proteínas mediante el cultivo de células animales. Más específicamente, la invención se refiere a un método para controlar la producción de ácido láctico mediante el cultivo de células animales (preferentemente células de mamífero) a niveles reducidos en un cultivo celular alimentado por lotes. En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para mantener la producción de lactato por parte de células en cultivo a niveles reducidos mediante la utilización de sistemas de administración de glucosa que no se basan en el muestreo de cultivos a intervalos regulares. En particular, la invención se refiere al cultivo de células animales bajo condiciones en las que se alimenta glucosa al cultivo o se introduce en el mismo, 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 dicha alimentación restringida, se controla la producción por parte de células en cultivo a un nivel reducido durante el cultivo. Como resultado final, se incrementa la producción de proteínas recombinantes a partir de las células en cultivo, por ejemplo con el fin de facilitar la producción a escala comercial.

Antecedentes de la técnica relacionada

Una gran proporción de productos biotecnológicos, se encuentran disponibles comercialmente o sólo en desarrollo, son proteínas terapéuticas. Además, la maquinaria celular de una célula animal (en comparación con una célula bacteria) generalmente resulta necesaria para producir muchas formas de proteínas terapéuticas (por ejemplo proteínas glucosiladas o anticuerpos monoclonales (MAbs) producidos por un hibridoma). En consecuencia, existe una demanda creciente de producción de estas proteínas en cultivos de células animales.

Sin embargo, en comparación con los cultivos de células bacterianas, los cultivos de células animales presentan tasas de producción más bajas y típicamente generan rendimientos de producción más bajos. El mantenimiento de concentraciones de glucosa en medios de cultivo celular a concentraciones bajas (por ejemplo de entre 0,02 y 1,0 g/l (por ejemplo de entre 0,11 y 5,5 mM)) y el cultivo de células en una fase de producción a una osmolalidad de entre aproximadamente 400 y 600 mOsm se ha encontrado que incrementa la producción de proteínas recombinantes por parte de cultivos de células animales, particularmente tras un cultivo inicial a una osmolalidad de entre aproximadamente 280 y 330 mOsm (patente US nº 5.856.179; cada patente US citada en el presente documento se incorpora como referencia en su totalidad) y en el que el cultivo en todas las fases también se realiza a una concentración de glutamina seleccionada (preferentemente de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 2 mM; patente US nº 6.180.401).

Parte de dicho incremento de la producción de proteínas recombinantes puede resultar de una reducción de la producción de lactato que se produce al mantener las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo a niveles reducidos. Es conocido que el lactato es un fuerte inhibidor del crecimiento celular y de la producción de proteínas, y el mantenimiento de concentraciones reducidas de glucosa en el medio de cultivo puede resultar en niveles reducidos de producción de lactato (Glacken *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 28:1376-89, 1986; Kurokawa *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 44:95-103, 1994; patente US nº 6.156.50). En consecuencia, dependiendo de otras condiciones de cultivo, el mantenimiento de concentraciones de glucosa a niveles reducidos respecto a la densidad celular es un factor que puede contribuir a niveles más bajos de producción de lactato, y de esta manera a densidades celulares más altas y a una producción incrementada de proteínas recombinantes en cultivos de células animales.

Al exponer células a una concentración baja de glucosa en un medio, se altera su metabolismo de manera que tanto la tasa de incorporación de glucosa como la tasa de producción de lactato son más bajas en comparación con células mantenidas en procedimiento de alimentación por lotes que presentan medios con niveles altos de glucosa al inicio del procedimiento (patente US nº 6.156.570). Además, la duración del cultivo alimentado por lotes puede extenderse. En consecuencia, tanto la tasa de crecimiento celular como la tasa de producción de proteínas pueden mantenerse durante un periodo más largo en comparación con los cultivos alimentados por lotes, en los que las células se cultivan en un medio que conduce a niveles elevados de producción de lactato (por ejemplo en medio que contiene niveles elevados de glucosa al inicio del periodo de cultivo).

Una manera de controlar la producción de lactato por parte de las células en cultivo es mediante una alimentación invariante, de tasa constante, de glucosa en un procedimiento de alimentación por lotes (Ljunggren y Häggström, Biotechnol. Bioeng. 44:808-18, 1994; Häggström *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 782:40-52, 1996). Aunque dicha alimentación invariante de tasa constante de glucosa en un procedimiento de alimentación por lotes puede ayudar a controlar la producción de ácido láctico por parte de células en cultivo en niveles bajos, no se alcanzan las densidades

celulares, tasas de crecimiento, niveles de viabilidad celular y tasas de producción de proteínas máximas, debido a que este método de proporcionar glucosa típicamente resulta en el agotamiento de la glucosa a medida que se incrementan las densidades celulares.

Otra manera de controlar la producción de lactato por parte de las células en cultivo a niveles reducidos es mediante la utilización de sistemas de administración de glucosa que se basan en el muestreo de cultivos a intervalos regulares. Se extraen muestras de un cultivo a intervalos regulares, y, tras determinar la concentración de glucosa en las muestras (por ejemplo mediante análisis de inyección de flujo, tal como en Male *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 55:497-504, 1997, o en Siegwart *et al.*, Biotechnol. Prog. 15:608-16, 1999; o mediante cromatografía líquida de alta presión, tal como en Kurokawa *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 44:95-103, 1994), se añaden cantidades medidas de glucosa a los cultivos con el fin de mantener las concentraciones de glucosa en el medio a un nivel reducido sostenidamente respecto a la densidad celular. Sin embargo, las células pueden adaptarse a una concentración reducida de glucosa mediante, por ejemplo, el incremento de su capacidad de incorporar la glucosa, y producir de esta manera cantidades excesivas de ácido láctico a pesar de la baja concentración de la glucosa.

La patente WO nº 2004/048556 A1, que es técnica anterior según el art. 54(3) de EPC, da a conocer un método para el control de la producción de ácido láctico a niveles reducidos en un cultivo celular alimentado por lotes mediante la alimentación de glucosa de una manera restringida en el cultivo celular.

Además, el riesgo de contaminación por microorganismos mediante dichos métodos de control por retroalimentación basados en muestreos es significativa. En consecuencia, no resulta inesperado que la utilización de dichos métodos para la producción comercial de proteínas recombinantes en cultivos de células animales no haya demostrado ser factible. Los métodos de control por retroalimentación basados en muestreos para el mantenimiento de concentraciones bajas de glucosa en el medio de cultivo celular se han limitado a usos de investigación desde que se publicó el primer artículo sobre dichos métodos (Glacken *et al., supra*); el artículo informa de que las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo se determinaban mediante la utilización de un autoanalizador en línea, en el que se mezclaba una muestra que contenía glucosa con o-toluidina, y un colorímetro, con el que se medía la absorbancia a 660 nm de la mezcla para determinar la concentración de glucosa.

Por los motivos anteriormente indicados, existe una necesidad de métodos alternativos para controlar la producción de lactato por parte de células en cultivo a niveles reducidos en el medio de cultivo.

Descripción resumida de la invención

La presente invención proporciona un método para la alimentación restringida de glucosa a cultivos de células animales, o la introducción de glucosa en los mismos, en procedimientos de alimentación por lotes. Asociadamente a 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 método de control por retroalimentación. En particular, la presente invención proporciona una solución a una necesidad antigua de n método para controlar flexiblemente la producción de lactato por parte de células en cultivo a niveles bajos con el fin de estimular la producción incrementada de proteínas recombinantes en cultivos de células animales, especialmente para la producción a escala comercial.

La presente invención se refiere a un método de cultivo de células animales bajo condiciones en las que se alimenta glucosa a los cultivos celulares de una manera restringida (es decir, alimentación restringida), lo que resulta en niveles reducidos de producción de lactato por parte de las células en cultivo. Esta alimentación restringida o lenta se consigue mediante la alimentación continua o intermitente de glucosa al cultivo celular a tasas que son inferiores (es decir, una función de) tasas esperadas o premodeladas de consumo de glucosa por parte de las células animales expuestas a un medio que contiene un nivel elevado de glucosa. En particular, la invención se refiere a un método para incrementar la producción de proteínas en cultivos de células animales mediante el control de la producción de lactato a niveles bajos mediante la alimentación restringida de glucosa.

Aunque algunas realizaciones de la invención pueden utilizar un control por retroalimentación basado en muestreos, otras realizaciones de la invención no requieren el control por retroalimentación basado en muestreos. Por ejemplo, las estimaciones de las capacidades esperadas de tasas de consumo de glucosa por parte de las células animales en cultivo pueden sobreestimarse con las mediciones de densidad celular, que en algunas realizaciones se realizan sin muestreo (por ejemplo fotométricamente). Basándose en las mediciones de densidad celular, pueden calcularse las tasas de administración de glucosa a los cultivos celulares (en tiempo real si se desea) para la alimentación restringida de glucosa a cultivos celulares, es decir a una tasa inferior al 100% de una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa por parte de células animales en un cultivo correspondiente bajo condiciones de cultivo muy similares, pero en el que la concentración de glucosa, en lugar de encontrarse a un nivel restringido, se encuentra a un nivel al que cualquier incremento de la concentración respecto a dicho nivel no afectará a la tasa de consumo de glucosa por parte de las células. Tal como se demuestra en 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.

En algunas realizaciones de la invención, se incluye el seguimiento del pH como método suplementario para estimar el consumo de lactato y como protección frente al agotamiento de la glucosa de las células en cultivo. El

seguimiento del pH aprovecha el hecho de que las células consumirán lactato del cultivo en el caso de que no se encuentre disponible glucosa. Se produce un incremento del pH del cultivo a medida que las células consumen lactato, de esta manera un incremento del pH puede señalar que la glucosa no se encuentra disponible en el cultivo celular (es decir, que las células han agotado la glucosa). En consecuencia, en algunas realizaciones de la invención, una estrategia de alimentación que proporcione un bolo de alimentación de glucosa y/o incrementos de la tasa de alimentación restringida de glucosa a un cultivo celular al producirse un incremento del pH puede proteger a las células frente al ayuno por agotamiento de glucosa. En algunas realizaciones, las mediciones del pH se obtienen sin "muestreo" (por ejemplo, las mediciones del pH se realizan mediante la utilización *in situ* de un sensor de pH para el que no extraen alícuotas que contienen células del cultivo con el fin de medir el pH).

En particular, la invención proporciona un método de cultivo celular para controlar la producción del ácido láctico en niveles bajos en un cultivo celular alimentado por lotes, que comprende: mezclar células animales y un medio para formar un cultivo celular, y alimentar glucosa de una manera restringida al cultivo celular. La alimentación restringida de glucosa se produce al proporcionar glucosa a una tasa que es una función de una tasa esperada de consumo de glucosa por parte de las células animales al exponerlas a un medio que contiene un nivel elevado de glucosa. La función es de multiplicación por un porcentaje inferior a 100%, incluyendo, aunque sin limitación, porcentajes tales como por lo menos 33%, o no más de 45%, de una tasa esperada. En realizaciones relacionadas adicionales, la alimentación restringida de glucosa al cultivo celular se consigue sin muestreo de control por retroalimentación durante el cultivo.

En algunas realizaciones de la invención, se utiliza un sensor de densidad celular para realizar un seguimiento de la densidad celular en el cultivo celular, y una medición de densidad celular derivada de un sensor se utiliza adicionalmente para calcular la tasa a la que se alimentará glucosa de una manera restringida al cultivo celular. En otras realizaciones, se utiliza un sensor de pH para realizar un seguimiento del 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 no sea superior a una tasa inmediatamente anterior de adición de glucosa; en algunas realizaciones, una nueva tasa puede ser por lo menos 15% o no más de 50% superior a una tasa inmediatamente anterior, con la condición de que dicha nueva tasa no alcance o exceda 100% de la tasa esperada de consumo de glucosa por parte de células de control expuestas a un nivel elevado de glucosa). En otras realizaciones, puede utilizarse un sistema basado en un sensor de densidad celular conjuntamente con un sistema basado en un sensor de pH para determinar la tasa de alimentación de glucosa de manera restringida al cultivo celular. Puede utilizarse el sistema basado en un sensor de densidad celular o el sistema basado en un sensor de pH o ambos sin "muestreo" del cultivo celular.

Otra realización del método de la invención proporciona un método de cultivo celular para el control de la producción de ácido láctico a niveles bajos en un cultivo alimentado por lotes, que comprende: (a) mezclar células animales y un medio que contiene un nivel elevado 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 cultivadas 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). En realizaciones relacionadas, la función es de multiplicación por un porcentaje inferior a 100%, tal como por lo menos 33%, o no más de 45%, de la tasa de consumo de glucosa determinada (es decir, la tasa premodelada). En realizaciones relacionadas adicionales, la alimentación restringida de glucosa al 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 densidad celular para realizar un seguimiento de la densidad celular en el segundo cultivo celular, en el que se utiliza además una medición derivada de un sensor de densidad celular para calcular la tasa de alimentación de glucosa de una manera restringida al segundo cultivo celular. En otras realizaciones se utiliza un sensor de pH para realizar el seguimiento del pH al segundo cultivo celular y, en respuesta a un incremento del pH por encima de un valor predeterminado (por ejemplo 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 superior a una tasa inmediatamente anterior de adición de glucosa; en algunas realizaciones, una nueva tasa puede ser por lo menos 15%, o no más de 50% superior a una tasa inmediatamente anterior). En otras realizaciones, puede utilizarse un sistema basado en un sensor de densidad celular conjuntamente con un sistema basado en un sensor de pH para determinar la tasa de alimentación de glucosa de una manera restringida al segundo cultivo celular. Puede utilizarse el sistema basado en un sensor de densidad celular o el sistema basado en un sensor de pH o ambos, sin "muestreo" del segundo cultivo celular.

En el método de la invención, las células se encuentran adaptadas al crecimiento bajo condiciones de cultivo en las que se añade glucosa a cultivos celulares de ensayo a tasas restringidas en comparación con las tasas de consumo de glucosa bajo condiciones de cultivo de control (por ejemplo en las que la concentración de glucosa permite que cualquier incremento de la densidad no afecte a la tasa de consumo de glucosa por parte de las células animales). En particular, células procedentes de dos cultivos celulares alimentados restringidamente ejemplificados (diferentes respecto a las tasas a la que se alimentaba glucosa de una manera restringida a los cultivos) produjeron niveles más bajos de lactato que los producidos por cultivos celulares de control. También mostraron tasas de crecimiento y tasas de producción de proteínas recombinantes diferentes. Los cultivos de alimentación restringida "de gradiente bajo" mostraron niveles más bajos de producción de lactato que los cultivos de alimentación restringida "de gradiente alto".

Los cultivos de alimentación restringida "de gradiente bajo" también mostraron tasas de crecimiento más altas y tasas más altas de producción de proteínas recombinantes que los cultivos de alimentación restringida "de gradiente alto". En general, los cultivos de alimentación restringida tanto de gradiente bajo como alto mostraron tasas de producción de lactato más bajas, tasas de crecimiento más altas y tasas de producción de proteínas recombinantes más altas, que los cultivos de control.

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

Breve descripción del dibujo

Fig. 1 Alimentaciones de glucosa de control frente a restringida: curva de ajuste óptimo.

Fig. 2 Curva acumulativa de glucosa: alimentación creciente de control frente a esperada.

Fig. 3 Curva acumulativa de glucosa: alimentación de control frente a premodelada.

Fig. 4 Densidad celular: alimentación creciente de control frente a esperada.

Fig. 5 Título de BMP-2 (normalizado): alimentación creciente de control frente a esperada.

Fig. 6 Concentraciones de glucosa y de lactato: alimentación creciente de control frente a esperada.

Fig. 7 Densidad celular: alimentación de control frente a premodelada.

Fig. 8 Título de BMP-2 (normalizado): alimentación de control frente a premodelada.

Fig. 9 Concentración de glucosa y de lactato: alimentación de control frente a premodelada.

Descripción detallada de la invención

Definiciones: la expresión "células animales" comprende células de invertebrado, de vertebrado no mamífero (por ejemplo de ave, de reptil y de anfibio) y células de mamífero. Entre los ejemplos no limitativos de células de invertebrado se incluyen las siguientes células de insecto: células de *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegy*pti (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* (gusano de la seda/polilla de la seda). Entre las células de mamífero preferentes se incluyen las células renales de hámster neonato (BHK), las células ováricas de hámster chino (CHO), las células renales humanas (293), las células diploides fetales normales de mono rhesus (FRhL-2) y las células de mieloma murino (por ejemplo SP2/0 y NS0).

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

Un "cultivo por lotes" se refiere a un cultivo celular en el que las células reciben medio base de inoculación que contiene glucosa al inicio del cultivo, y en el que el cultivo celular proporciona producto, por ejemplo proteína recombinante, únicamente al terminar el cultivo. De manera similar, un "cultivo de alimentación por lotes" de células proporciona producto únicamente en su punto de terminación. Sin embargo, las células en un cultivo de alimentación por lotes reciben medio base de inoculación que contiene glucosa al inicio del cultivo y reciben alimentación con medio base de alimentación que contiene glucosa en uno o más puntos tras el inicio, aunque antes de la terminación.

La expresión "nivel elevado de glucosa" se refiere a una concentración de glucosa en cultivos de células animales a la que cualquier incremento 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 gráficamente (tal como en la curva de "ajuste óptimo" en la parte superior de la fig. 1) o mediante una función matemática (tal como en la leyenda de la fig. 1).

La expresión "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 inferior al 100% de la cantidad de glucosa que se espera o se determina que será consumida por un cultivo de control. La expresión "cultivo de control" se refiere a un cultivo de las mismas células animales bajo condiciones de cultivo similares (por ejemplo un cultivo de las mismas células en un medio base de inoculación y de alimentación similar, a la misma temperatura, partiendo de la misma densidad celular inicial, etc.), excepto en que el cultivo presenta un nivel elevado de glucosa. De esta manera, la función con la que 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 la células en un cultivo de control. Puede

producirse la alimentación de glucosa de una manera restringida de manera que la glucosa se proporcione a una concentración o concentraciones determinadas durante un periodo de tiempo, es decir, a una tasa o tasas determinadas, y/o a las que 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 la que 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 de porcentaje inferior al 100%. Las funciones cuadráticas, cúbicas y exponenciales también se encuentran entre las muchas relaciones matemáticas comprendidas en la invención. Sin embargo, entre las funciones aplicables comprendidas dentro del alcance de la invención no se 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.

La expresión "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 inferior a las concentraciones de ácido láctico (o de lactato) presentes en células cultivadas con un nivel elevado de glucosa.

El término "muestreo" incluye extraer muestras que contienen células de cultivos de células animales (por ejemplo en un biorreactor) con el fin de medir características del medio de cultivo. El término "muestreo" no incluye mediciones de densidad celular, en las que se extraen o se separan del cultivo muestras o alícuotas que contienen células con el fin de medir la densidad celular. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo estimaciones de densidad celular de tipo fotométrico sin "muestrear" un cultivo mantenido en un recipiente transparente o translúcido. Además, El "muestreo" no incluye la utilización *in situ* de un sensor de pH para medir el pH de un medio en el que se cultivaron células animales, en el que no se extraen 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 "muestrear" tal como se define en la presente memoria en el caso de que no se extraigan o se separen del cultivo muestras o alícuotas que contienen células.

Siguiendo una antigua convención, los términos "un" y "una" se refieren a "uno o más", o "una o más", tal como se utilizan en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Aunque la invención ha sido descrita con un cierto grado de particularidad, evidentemente muchas alternativas, modificaciones y variaciones resultarán evidentes para el experto en la materia a la luz de la exposición. Por consiguiente, se pretende que la totalidad de dichas alternativas, modificaciones y variaciones, que se encuentran comprendidas dentro del espíritu y alcance de la invención, se encuentran comprendidas en el alcance según las reivindicaciones definidas.

La presente invención se refiere a un método de cultivo de células animales, de manera que los cultivos mantiene niveles bajos de ácido láctico, resultan en una viabilidad celular incrementada durante un periodo de tiempo prolongado, y producen niveles incrementados de proteínas recombinantes. El experto en la materia reconocerá que el método dado a conocer en la presente memoria puede utilizarse para cultivar muchas de las bien conocidas células animales utilizadas y cultivadas rutinariamente en la técnica, es decir, el método dado a conocer en la presente memoria no se encuentra limitado a la utilización con únicamente las células animales listadas dentro de la definición de células animales.

Los métodos de la invención se refieren a la alimentación de glucosa de una manera restringida a un cultivo de células animales. Tal como se detalla adicionalmente en el Ejemplo 2, la alimentación de glucosa de una manera restringida puede realizarse 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 elevado de glucosa. La alimentación de glucosa de una manera restringida también puede incluir proporcionar uno o más bolos de glucosa.

Las condiciones del cultivo de control puede ser determinadas por el experto en la materia sin necesidad de experimentación indebida. Por ejemplo, el experto en la materia entenderá que las células animales típicamente se cultivan en un "medio", que generalmente se refiere a una solución que comprende nutrientes, incluyendo glucosa. Como experto, el experto en la materia conocerá que la glucosa debería añadirse al medio base de inoculación y de alimentación antes de la inoculación y alimentación de las células animales, respectivamente. Se reconocerá que la cantidad e glucosa añadida al medio base de inoculación y al medio base de alimentación puede ser diferente. Además, el experto en la materia reconocerá qué medio resulta 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 en los que exista un nivel elevado de glucosa (ver, por ejemplo, Mather J.P. *et al.*, "Culture media, animal cells, large scale production", Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation 2:777-785, 1999). En otras palabras, el experto en la materia reconocerá la concentración de glucosa a la que debe cultivarse una célula particular para que cualquier incremento de la concentración de glucosa del cultivo no afecte a la tasa de consumo de glucosa de la célula. Debe distinguirse un nivel elevado de glucosa en un cultivo celular de un nivel elevado de glucosa añadido al medio base de inoculación y de alimentación; la concentración de glucosa en éste último (por ejemplo 44, 200 ó 280 g/l) típicamente se diluye con la adición al cultivo celular.

Un experto en la materia reconocerá además que la concentración óptima de otros nutrientes (por ejemplo glutamina, hierro, elementos D traza) o agentes diseñados para el control de otras variables de cultivo (por ejemplo la magnitud del espumado y la osmolalidad) variarán dependiendo de la célula animal. De esta manera, el ajuste de las concentraciones de dichos nutrientes o agentes en los medios base de inoculación y de alimentación son rutinarios de 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 realiza un seguimiento de la densidad celular y/o del pH del cultivo y se utilizan para calcular la tasa de alimentación restringida de glucosa. Los métodos para medir la densidad celular y/o el pH de un cultivo son bien conocidos de la técnica; entre dichos métodos se incluyen, aunque sin limitación, la utilización de un Cedex (Innovatis GmbH, Bielefeld, Alemania) y/o un instrumento CASY (Scharfe system GmbH, Reutlingen, Alemania) para determinar la densidad celular y/o un sensor de pH. Resultan particularmente útiles para la invención reivindicada los métodos para determinar la densidad celular y el pH que no requieran muestreo, es decir, la extracción de muestras que contienen células del cultivo animal, incluyendo, aunque sin limitación, la utilización de una sonda de capacitancia, una sonda de densidad óptica y/o una sonda de turbidez para medir la densidad celular y/o una sonda potenciométrica o pigmentos sensibles al pH para medir el pH.

En algunas realizaciones de la invención, una medición derivada de un sensor de la densidad celular y/o una medición derivada de un sensor del pH sirve para determinar si la alimentación de glucosa de manera restringida debe continuar seguidamente a una nueva tasa que es superior a una tasa inmediatamente anterior. Un experto en la materia reconocerá que la nueva tasa a la que se alimenta glucosa de una manera restringida todavía debería ser inferior al 100% de una tasa de consumo de glucosa esperada o determinada. De esta manera, en el caso de que la tasa inmediatamente anterior sea, por ejemplo, 99% de una tasa de consumo de glucosa esperada o determinada, la nueva tasa no debería incrementarse en más de 1% de la tasa inmediatamente anterior. En otras realizaciones, la nueva tasa se incrementa en 1% a 15% de la tasa inmediatamente anterior. En algunas realizaciones de la invención, la nueva tasa se incrementa en por lo menos 15% de la tasa inmediatamente anterior. En otras realizaciones de la invención, la nueva tasa se incrementa en no más de 50% de la tasa inmediatamente anterior.

Ejemplos

Ejemplo 1

Medios

Ejemplo 1.1

Medios de inoculación

Se formuló un medio base de inoculación para que incluyese los mismos componentes que el medio DMEM/F12, aunque se añadieron los componentes siguientes: dextrán sulfato 200 mg/l (la patente US nº 5.318.898 describe la utilización del dextrán sulfato en medios de cultivo), nucelina 10 mg/l (un análogo de la insulina humana de origen en ADN recombinante; Eli Lilly (Indianapolis, IN)) y alcohol polivinílico (PVA) 2,4 g/l. El medio base de inoculación preparado para estos experimentos no incluía glucosa. Para el medio de inoculación de control, se añadieron aproximadamente 10 g/l de glucosa al medio base de inoculación antes de la inoculación. Como medio de inoculación utilizado en los cultivos de alimentación restringida de glucosa, se añadió glucosa 0,8 g/l y NaCl 1,3 g/l al medio base de inoculación; se añadió NaCl de manera que la osmolalidad de partida del medio de inoculación utilizado en los cultivos de alimentación restringida de glucosa fuese similar a la osmolalidad de partida del medio de inoculación de control.

Ejemplo 1.2

Medios de alimentación

Se formuló el medio base de alimentación para que consistiese de los mismos componentes que el medio DMEM/F12-medio base de inoculación; el medio base de alimentación formulado para estos experimentos no presentaba glucosa. Para el medio de alimentación de control, se añadieron aproximadamente 44 g/l de glucosa al medio base de alimentación.

Ejemplo 2

Fijación de las tasas de adición de glucosa

Un enfoque de la fijación de tasas de adición de glucosa para los cultivos de alimentación restringida de glucosa implicaba examinar las tasas de consumo de glucosa por parte de las células CHO durante un cultivo típico de control de alimentación por lo tes. La concentración de glucosa en un cultivo de control típico se inició a un nivel elevado (por ejemplo aproximadamente 10 g/l) y se redujo constantemente durante el crecimiento exponencial normal; se realizaron

adiciones de glucosa tras el día 3. Para estos cultivos de control, resulta necesaria la suplementación de glucosa para evitar el agotamiento de la glucosa (por ejemplo ver 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 métodos basados en el muestreo, en los que se extrajeron muestras en diversos puntos del tiempo tras la inoculación, y se determinaron las concentraciones de glucosa de las muestras. Se extrajeron muestras diariamente y se analizaron utilizando el analizador Bioprofile 100 (Nova Biomedical Corp., Waltham, MA), que 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, nº de cat. GAHK-20).

En este enfoque basado en el muestreo, se dibujó la tasa de glucosa consumida durante la etapa de crecimiento exponencial del medio de cultivos de control frente al tiempo en incrementos de horas y días. A continuación, se generó una curva de ajuste óptimo exponencial (es decir, $y=a\cdot e^{bx}$) utilizando dichos puntos de datos (para la curva de ajuste óptimo 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/hora) para proporcionar cantidades de alimentación restringida de glucosa en gradiente bajo y en gradiente alto en cualquier punto temporal dado. Para los cultivos de alimentación restringida de gradiente bajo, los valores del gráfico de curva de ajuste óptimo de control se multiplicaron por 33% para estimar las tasas a las que la glucosa se suministraría a los cultivos de alimentación restringida de gradiente bajo (ver los triángulos negros "gradiente bajo" de la fig. 1). De manera similar, se multiplicaron los valores del gráfico de curva de ajuste óptimo de control por 45% para estimar las tasas a las que se suministraría glucosa a los cultivos de alimentación restringida de gradiente alto (ver los cuadrados negros "gradiente alto" de la fig. 1). Los multiplicadores 33% y 45% se seleccionaron arbitrariamente. Todos los multiplicadores que presentaban 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, se encuentran comprendidas dentro del alcance de la invención (excepto que las funciones permisibles no incluyen aquellas 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 de 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 restringida de glucosa. En el caso de que un cultivo de células de mamífero (tales como las células CHO) haya agotado la glucosa, las células en el cultivo inician el consumo de lactato como fuente energética de carbohidrato alternativa. La reducción de la concentración de lactato en el cultivo celular resulta en un incremento del pH (al que reacciona el sistema de respuesta controlado por el pH).

Durante la implementación de dicho enfoque, se programa una bomba de jeringa de una solución de glucosa para que administre glucosa a una tasa restringida (por ejemplo 0,032 g/l/hora; ver la tasa de adición "en gradiente bajo" inicial de la Tabla 2), excepto en que, al incrementarse el pH del medio de cultivo 0,02 unidades de pH por encima de un valor predeterminado de 7,00, se activa la administración de un bolo de alimentación de glucosa (0,05 a 0,2 gramos de glucosa administrados a partir del medio de alimentación por cada litro de cultivo) y, además, la tasa de administración restringida por parte de la bomba de jeringa se incrementa seguidamente a un nivel 15% a 50% superior a la tasa de administración previamente restringida. Por ejemplo, la administración de un bolo de entre 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 litro aproximadamente 0,05 a 0,2 g de glucosa.

En otro enfoque, se mide la densidad celular de un cultivo celular sin muestreo con el fin de asistir en el cálculo de tasas para la alimentación restringida de glucosa. Al iniciar los ensayos en este enfoque, se alimentó glucosa al cultivo de manera que la concentración de la misma permaneciese a un nivel considerado adecuado para la densidad 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 densidad celular en cultivos en tiempo real. Puede utilizarse alternativamente una sonda láser de turbidez (por ejemplo modelo LA-300LT, ASR Co., Ltd., Tokyo) para estimar la densidad celular. Se emitió un haz 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 densidades celular. 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, Biotechnol. Bioeng. 44:170-77, 1994, han encontrado que la densidad celular total de una línea celular de hibridoma ratón-ratón, MAK, se correlaciona linealmente con la señal procedente de una sonda láser de turbidez a densidades celular inferiores a $3{,}0\times10^{9}$ células/litro. En consecuencia, pueden realizarse mediciones espectrofotométricas de densidad celular (sin muestreo) con el fin de asistir en el cálculo de las tasas de alimentación restringida de glucosa.

Otro enfoque combina un sistema de respuesta basada en un sensor con la utilización de un programa de aceleración en gradiente de la alimentación (configurado para aproximar 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 derivado de la densidad celular, o ambos, sin muestreo del cultivo celular.

La utilización de una sonda sensora de glucosa para medir la concentración de glucosa directamente (y no simplemente según reflejan las mediciones de pH o de densidad celular) en tiempo real (y de una manera que no requiera el

muestreo de un cultivo) no resulta necesaria para la práctica de la invención, particularmente debido a que la invención proporciona tasas restringidas de administración de glucosa a cultivos de células animales, y no simplemente el mantenimiento de 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, la utilización de un sensor de glucosa en la práctica de los métodos dados a conocer puede encontrarse comprendida dentro del alcance de la presente invención.

Ejemplo 3

Producción de BMP-2 en células CHO

El propósito de estos experimentos fue implementar estrategias de alimentación restringida de glucosa con el fin de controlar la producción de lactato a niveles bajos en cultivos celulares alimentados por lotes (específicamente cultivos de un litro (1 l)) que utilizaban células CHO (específicamente células EMCG5) para la producción de proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) recombinante (patente US nº 5.318.898; patente US nº 5.618.924, y patente US nº 5.631.142, describen adicionalmente proteínas BMP-2 y la producción de las mismas). Se realizó un seguimiento de los efectos de las estrategias de alimentación restringida de glucosa sobre la densidad y viabilidad celulares, la producción de lactato, la productividad de proteínas y la duración prolongada de un lote.

Se alimentó solución estéril de glucosa de una manera restringida a un biorreactor utilizando una bomba de jeringa programada para incrementar la glucosa proporcionada a través del cultivo celular alimentado por lotes. 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 al exponerlas a un nivel elevado de glucosa (es decir, como función de una tasa premodelada).

También se realizó un seguimiento de los incidentes de ayuno 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 iniciado el consumo de ácido láctico. La reducción de los niveles de ácido láctico en los cultivos provoca un incremento del pH del medio de cultivo celular; esta relación permite utilizar un sistema basado en un sensor de pH para anticipar los incidentes de ayuno de glucosa.

Con el fin de evaluar la efectividad de un sistema basado en un sensor de pH para prevenir el ayuno de glucosa en experimentos de alimentación restringida de glucosa, se programó una bomba de jeringa para administrar un bolo de alimentación de glucosa en el biorreactor en el caso de que se incrementase el pH por encima de un valor predeterminado de 7,00. Un incremento de 0,02 unidades de pH por encima de 7,00 inducía la administración de un bolo de alimentación de glucosa, incrementando la tasa restringida posterior de administración continua de glucosa en 15% en algunos ensayos, en 50% en otros.

En estos experimentos, se utilizaron biorreactores Applikon® de 2 litros con un volumen de trabajo de 1 litro (Applikon Biotechnology, Foster City, CA). Se proporcionó aireación a demanda para mantener el nivel de oxígeno disuelto al 23% de saturación de aire, y se utilizó emulsión C antiespumante de grado médico (Dow Coming Corporation, Midland, MI) para evitar el la formación de espuma. Se mantuvo la temperatura a 37ºC durante el cultivo de alimentación por lo tes. Se llenaron asépticamente jeringas Becton Dickinson® (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) con solución de glucosa de control o experimental para administrar glucosa a cultivos de control o de alimentación restringida, respectivamente, en los biorreactores.

En un primer experimento (un experimento de incremento esperado de la alimentación), un cultivo de control representativo utilizó cantidades crecientes de glucosa cada día, y se utilizó una curva de ajuste óptimo exponencial para aproximar la cantidad de glucosa consumida por el cultivo de control cada día. Utilizando la curva de ajuste óptimo 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 50% a 70% de la cantidad consumida por el cultivo de control. Cada día, se modificó la tasa de alimentación restringida para adaptarla a la densidad celular creciente. La concentración de alimentación de glucosa era de 200 g/l.

La concentración inicial de glucosa en el cultivo de control (1 litro) era de 10,38 g/l. Tras ligeramente más de tres días, se añadió glucosa (2,2 g) a intervalos de 24 horas al cultivo de control (es decir, a las 75,5, 99,5 y 123,5 horas de cultivo) (Tabla 1, figs. 2 y 6). La concentración inicial de glucosa en el cultivo de alimentación restringida (1 litro) era de 1,1 g/l. Se incrementó 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 horas de cultivo) desde una tasa de alimentación restringida continua inicial de 0,046 g/l/hora (que se mantuvo en el periodo de cultivo de entre 20 y 27,5 horas) (Tabla 1).

TABLA 1

Experimento de incremento esperado de la alimentación: adición de glucosa

Adición de glucosa a cultivo de control de 1 litro (concentración inicial de glucosa: 10,38 g/l)		Tasas de adición a cultivo de alimentación restringida (concentración inicial de glucosa: 1,1 g/l)	
Punto (hora)	Cantidad (gramos)	Periodo (horas)	Tasa (g/l/hora)
--	--	0 a 20	0
--	--	20 a 27,5	0,046
--	--	27,5 a 51,5	0,068
75,5	2,2	51,5 a 75,5	0,088
99,5	2,2	75,5 a 99,5	0,104
123,5	2,2	99,5 a 147,5	0,12

La tasa de consumo de glucosa en el cultivo de alimentación restringida era aproximadamente igual a la tasa restringida de administración de glucosa durante la duración de la alimentación restringida continua de glucosa al 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 iniciar la alimentación continua de glucosa de manera restringida tras 20 horas de cultivo (fig. 6). Por otra parte, las tasas de consumo de glucosa en los cultivos de control no se encontraban limitadas por una tasa restringida de administración 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 de producción de lactato (Tabla 7) también permanecieron en niveles más bajos en los cultivos de alimentación restringida que en los cultivos de control durante este experimento de incremento esperado de la alimentación.

En un segundo experimento (es decir, un experimento de alimentación premodelada), se utilizó la programación de aceleración de la alimentación de una bomba doble de jeringa (KD Scientific, Holliston, MA). Para este experimento de alimentación premodelada, la concentración de glucosa era 0,28 g/ml para la alimentación de gradiente alto de glucosa, y de 0,20 g/ml para la alimentación de gradiente bajo de glucosa. En contraste con el experimento de incremento esperado de alimentación, en el que la bomba de jeringa administró continuamente glucosa a una tasa prefijada de alimentación restringida durante un periodo de tiempo, por ejemplo 0,046 g/hora entre las horas 20 y 20,7, y 0,068 g/hora entre las horas 27,5 y 51,5, etc., la programación de aceleración de la alimentación de la bomba de jeringa en el experimento de alimentación premodelada permitió que la tasa de alimentación restringida de glucosa se incrementase gradualmente hasta aproximarse al 33% y 45% de la curva de ajuste óptimo exponencial de glucosa consumida por el cultivo de control cada día. La programación de aceleración de la alimentación permitió programar las tasas restringidas inicial y final para cada periodo de tiempo, por ejemplo 12 horas, siendo modificada la tasa continuamente de modo lineal por la bomba durante ese periodo de tiempo. La Tabla 2 proporciona datos representativos de adición de glucosa para este experimento de alimentación premodelada.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Experimento de alimentación premodelada: adición de glucosa

Adición de glucosa a un cultivo de control de 1 litro (concentración inicial de glucosa: 8,4 g/l)			
Punto (hora)	Cantidad (gramos)		
--	--		
--	--		
--	--		
67,5	2,2		
94,75	2,2		
119,75	2,2		
143,75	2,2		
167,75	2,2		
191	2,2		
Alimentación restringida			
		Tasas de adición a cultivos de alimentación restringida (concentración inicial de glucosa: 0,88 g/l)	
Periodo (horas)	Tasa de la jeringa (ml/hora)	Gradiente bajo(0,2 g/ml de alimentación) g/hora añadidos a 1 litro	Gradiente alto (0,28 g/ml de alimentación) g/hora añadidos a 1 litro
0 a 19,75	0	0	0
19,75 a 43,75	0,160 a 0,184	0,0320 a 0,0368	0,0448 a 0,0515
43,75 a 67,75	0,184 a 0,224	0,0368 a 0,0448	0,0515 a 0,0627
67,75 a 91,75	0,224 a 0,264	0,0448 a 0,0528	0,0627 a 0,0739
91,75 a 115,75	0,264 a 0,304	0,0528 a 0,0608	0,0739 a 0,0851
115,75 a 139,75	0,304 a 0,344	0,0608 a 0,0688	0,0851 a 0,0963
139,75 a 140,25	0,344 a 0,346	0,0688 a 0,0692	0,0963 a 0,0969
140,25 a 164,25	0,400 a 0,450	0,0800 a 0,0900	0,1120 a 0,1260
164,25 a 191	0,450	0,0900	0,1260

La fig. 2 ilustra la cantidad acumulada de glucosa administrada durante el tiempo para el experimento de incremento esperado de la alimentación, y la fig. 3 ilustra la cantidad acumulada de glucosa administrada durante el tiempo para el experimento de alimentación premodelada. Las figs. 2 y 3 incluyen, cada una, las cantidades iniciales de glucosa proporcionadas en reactores tanto de control como de alimentación restringida (y no simplemente las cantidades de glucosa total administrada con jeringa). En ambos experimentos, un lote de control presentan un nivel inicialmente elevado de glucosa, y se añadió glucosa (2,2 g) diariamente tras aproximadamente 72 horas. Para los cultivos de alimentación restringida, los biorreactores presentaban el día 0 aproximadamente 1 g/l de glucosa, y la administración con jeringa de glucosa se inició tras aproximadamente 20 horas.

El experimento de incremento esperado de la alimentación 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 una densidad celular final más alta el día 6 (fig. 4). En el cultivo de control, la densidad celular alcanzó un pico mucho antes y la viabilidad empezó a caer 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 siguió positiva hasta el día 6 (Tabla 3).

Aunque el cultivo de alimentación restringida alcanzó una densidad celular final más alta en comparación con el cultivo de control alcanzado el día 6, los cultivos presentaban concentraciones similares el día 5 (figura 4). Estos datos demuestran que la viabilidad reducida 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 que las células alcanzasen la capacidad máxima del biorreactor. Por el contrario, los datos en la figura 4, en combinación con la demostración de que un nivel bajo de lactato en los cultivos de alimentación restringida en comparación con el nivel de lactato en cultivos de control (figura 6) sugiere que la viabilidad incrementada 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 incremento esperado de la alimentación

Día	Tasas de crecimiento de control ($\mu \cdot (h^{-1})$)	Tasas de crecimiento con 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 normalizados de BMP-2. Los valores del título de BMP-2 se normalizaron como fracción del valor del título de BMP-2 el día 6 del experimento de incremento esperado de la alimentación. La Tabla 4 presenta los valores para las tasas de producción de BMP-2 correspondientes. Las tasas de producción de BMP-2 se normalizaron como fracción de la tasa de producción de BMP-2 del cultivo de control el día 1. Tras el día 4, los títulos de BMP-2 alcanzaron un nivel máximo constante en el cultivo de control, pero continuaron incrementándose 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 en valores positivos hasta el día 6 (Tabla 4). Debe indicarse que, aunque la fig. 5 sugiere que los cultivos de control demostraron un título ligeramente reducido de BMP-2 el día 5, es probable que las pequeñas reducciones observadas sean un reflejo de la variabilidad experimental y no una reducción real del título de BMP-2 del cultivo.

TABLA 4

Experimento de incremento esperado de la alimentación: tasa de producción de BMP-2 (normalizada)

Día	Tasa de producción de control	Tasa de producción en alimentación controlada
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

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

La fig. 6 presenta perfiles de concentración de glucosa (g/l) y de concentración de lactato (g/l) del experimento de incremento esperado de la concentración, y la Tabla 5 presenta datos representativos correspondientes de concentración de glucosa (g/l) y de concentración de lactato (g/l) de dicho 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 incremento esperado de la alimentación: concentraciones de glucosa y de lactato

	Concentración de glucosa (g/l)	
Hora	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
	Concentración de lactato (g/l)	
Hora	Control	Alimentación restringida
20,75	0,12	0,16
51,25	1,40	1,14
75,	3,40	2,26
92,5	--	--
99,5	5,78	3,82
115,25	--	--
123,5	6,50	4,20
142,5	--	--
	6,96	4,60

TABLA 6

Experimento de incremento esperado de la alimentación: 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 incremento esperado de la alimentación: 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

Para el cultivo de alimentación restringida en el experimento de incremento esperado de la alimentación, las tasas de consumo de glucosa eran más bajas en el cultivo de alimentación restringida que en el cultivo de control los días 1 a 3 (Tabla 6), y las tasas de producción de lactato durante el periodo de cultivo eran más bajas en el cultivo de alimentación restringida que en el cultivo de control (Tabla 7), resultando en concentraciones de lactato más bajas en el cultivo de alimentación restringida durante la totalidad del periodo de cultivo (fig. 6).

También se midieron los perfiles de osmolalidad y la cantidad de titulador (una mezcla de carbonato sódico y bicarbonato sódico) utilizado cada 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 cada día (por cada litro de volumen de trabajo) bajo cada una de las dos condiciones de cultivo.

TABLA 8

Experimento de incremento esperado de la alimentación: osmolalidad

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

TABLA 9

Experimento de incremento esperado de la alimentación: uso de titulador

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

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

En el experimento de alimentación premodelada, se fijo que un biorreactor fuese el control; se mantuvo en él un cultivo estándar de alimentación por lotes. Además, se prepararon dos biorreactores de ensayo con cultivos en alimentación restringida: uno para la administración restringida de glucosa "de gradiente bajo", y uno para la administración restringida de glucosa "de gradiente alto". Para cada biorreactor de ensayo, se utilizó una bomba de jeringa para incrementar continuamente la tasa de alimentación restringida de glucosa. La concentración de la solución de glucosa administrada en el biorreactor de gradiente bajo era de 0,2 g/ml; la concentración en el biorreactor de gradiente alto era de 0,28 g/ml.

La fig. 7 presenta gráficamente los datos de densidad celular (líneas continuas) y de viabilidad celular (líneas discontinuas) durante 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 alimentación premodelada: tasas de crecimiento celular (valores μ Cedex por hora; valores μ Cedex=densidad celular en unidades de 10^5 células por ml)

Día	Tasas de control ($\mu \cdot (h^{-1})$)	Tasas en gradiente bajo ($\mu \cdot (h^{-1})$)	Tasas en gradiente alto ($\mu \cdot (h^{-1})$)
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 densidad celular continuó incrementándose hasta el día 8 (192 horas); además, la viabilidad celular se mantuvo en niveles altos durante este mismo periodo (fig. 7). Por el contrario, la densidad celular en el cultivo de control alcanzó un máximo aproximadamente el día 5 (120 horas), seguido de una caída acusada de la densidad celular, y una caída todavía más acusada de la viabilidad celular (fig. 7). El cultivo en gradiente bajo alcanzó una densidad celular superior a $12x10^6$ células/ml el día 8, y la viabilidad celular se mantuvo en valores superiores al 90% (fig. 7).

Los niveles del título de BMP-2 observados en los cultivos de alimentación restringida demuestran la utilidad de los métodos de la invención para mejorar la producción de proteínas a partir de células animales en cultivo (particularmente para el cultivo en gradiente bajo). La fig. 8 presenta niveles del título de BMP-2 para biorreactores de control y de ensayo normalizados como fracción del título máximo de BMP-2 (día 5) para el cultivo de control. La Tabla 11 presenta las tasas de producción de BMP-2 para biorreactores de control y de ensayo normalizados como fracción de la tasa de producción de BMP-2 del cultivo de control el día 1 (tal como también se ha normalizado en la Tabla 4).

TABLA 11

Experimento de alimentación premodelada: tasa de producción de BMP-2 (normalizada)

Día	Tasas de producción de control	Tasas en gradiente bajo	Tasas en gradiente alto
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 gradiente bajo; este nivel del título era 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 en niveles altos durante seis días en el cultivo de gradiente bajo (Tabla 11). La tasa de producción de BMP-2 en el cultivo de alimentación restringida de gradiente alto cayó más rápidamente que la tasa de producción de BMP-2 en el cultivo de alimentación restringida de gradiente bajo (Tabla 11). Esta caída más rápida de la tasa de producción de BMP-2 probablemente se debe a la presencia de un nivel más alto de inhibidores, tales como el lactato, en el cultivo de gradiente alto que en el cultivo de gradiente bajo.

La fig. 9 presenta perfiles de concentración (g/l) de glucosa (líneas continuas) y de lactato (líneas discontinuas) del experimento de alimentación premodelada para biorreactores de control y de ensayo, y la Tabla 12 presenta los datos representativos correspondientes para las concentraciones de glucosa y de lactato (g/l) de este experimento. La Tabla 13 presenta datos de tasa de consumo de glucosa, y la Tabla 14 presenta datos de tasa de producción de lactato, para biorreactores de control y de ensayo.

TABLA 12

Experimento de alimentación premodelada: concentraciones de glucosa y de lactato

	Concentración de glucosa (g/l)		
		Alimentación restringida	
Hora	Control	Gradiente bajo	Gradiente alto
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	Gradiente bajo	Gradiente alto
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 alimentación premodelada: tasa de consumo de glucosa

Día	$Q_{glucosa}$ de control (mg/10^6 células/día)	$Q_{glucosa}$ en gradiente bajo (mg/10^6 células/día)	$Q_{glucosa}$ en gradiente alto (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 alimentación premodelada: tasa de producción de lactato

Día	$Q_{lactato}$ de control (mg/10^6 células/día)	$Q_{lactato}$ en gradiente bajo (mg/10^6 células/día)	$Q_{lactato}$ en gradiente alto (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

Los perfiles de líneas discontinuas de la fig. 9 subrayan 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 resultan de fijar la alimentación de glucosa restringida en una tasa de "gradiente bajo". La muy baja tasa de producción de lactato en el cultivo con alimentación restringida de glucosa de gradiente bajo (fig. 9 y Tabla 14) probablemente es responsable de la capacidad de las células en ese cultivo de mantener dicha elevada productividad. La tasa de consumo de glucosa se estabilizó en aproximadamente 0,2 mg/10^6 células/día en el cultivo de gradiente bajo (Tabla 13).

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

TABLA 15

Experimento de alimentación premodelada: osmolalidad

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

TABLA 16

Experimento de alimentación premodelada: uso de titulador

Día	Titulador de control (ml/día)	Gradiente bajo de titulador (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 gradiente bajo se incrementó marginalmente desde un nivel de partida de 288 mOsm/l hasta únicamente 306 mOsm/l el día 3, antes de estabilizarse en un nivel de 237 mOsm/l el día 8 (Tabla 15). El cultivo de gradiente bajo también requirió relativamente poco titulador entre los días 1 y 8 (Tabla 16). Por otra parte, la osmolalidad en el cultivo de control se incrementó en prácticamente el 50% hasta el día 7 (Tabla 15), y el uso de titulador para el cultivo de control en todo momento excedió el uso de titulador para el cultivo de gradiente bajo (Tabla 16). De manera similar, excepto en los días 1 y 8, el uso de titulador para el cultivo de control también excedió el uso de titulador para el cultivo de alimentación restringida de gradiente alto (Tabla 16). Tal como en el experimento de incremento esperado de alimentación, el nivel más bajo de osmolalidad (Tabla 15) y el uso generalmente más bajo de titulador (Tabla 9) en los cultivos de alimentación restringida (cultivos de alimentación restringida tanto de gradiente bajo como alto) frente al cultivo de control son atribuibles 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 el medio de cultivo celular (y de esta manera el mantenimiento de una producción baja de lactato en el medio) presentó varios efectos positivos en estos experimentos (particularmente sobre la productividad de proteínas; fig. 5 y Tabla 4, y fig. 8 y Tabla 11). Estos efectos positivos se obtuvieron mediante la programación de las administraciones de glucosa para que se incrementasen en todos dichos cultivos alimentados por lotes con el fin de anticipar las necesidades de glucosa estimadas para los incrementos esperados o premodelados de necesidad de glucosa (por ejemplo como resultado de los incrementos de la densidad celular), aunque en todo momento alimentando la glucosa de una manera restringida.

Dicha estrategia de alimentación restringida resultó en reducciones significativas de las tasas de producción de lactato (en todo el experimento de incremento esperado de alimentación, Tabla 7; ver también la fig. 6, y en la mayor parte del experimento de alimentaciones premodeladas, Tabla 14; ver también la fig. 9) en comparación con los cultivos de control, en los que el medio de cultivo celular inicialmente contenía un nivel elevado de glucosa (por ejemplo aproximadamente 10 g/l). La densidad celular (ver las Tablas 3 y 10) y los niveles de producción de proteínas (ver las Tablas 4 y 11) en los cultivos de ensayo de alimentación restringida continuaron incrementándose tras alcanzar un máximo estos determinantes en los cultivos de control. En particular, en el experimento de alimentaciones premodeladas, el cultivo de alimentación restringida de gradiente bajo alcanzó 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 títulos normalizados de BMP2 alcanzados (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 (particularmente medido en términos de tasas de producción de proteínas). La alimentación de la 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 densidad celular (fig. 7).

Resulta importante que los beneficios de la invención se consiguen mediante tasas restringidas de administración de glucosa en los cultivos de ensayo, y no simplemente mediante el mantenimiento de concentraciones bajas de glucosa en los cultivos de ensayo. Por ejemplo, los perfiles de concentración de glucosa en los cultivos tanto de gradiente bajo como alto del experimento de alimentación premodelada eran, de manera similar, bajos, aunque el perfil de producción de lactato del cultivo de gradiente bajo siguió encontrándose marcadamente por debajo del perfil de producción de lactato del cultivo de gradiente alto (fig. 9 y Tabla 12). Por consiguiente, los perfiles metabólicos beneficiosos son el resultado de la adaptación de las células animales cultivadas para el crecimiento bajo condiciones de cultivo en las que la disponibilidad de glucosa se encuentra limitada por la administración restringida de la misma en el cultivo, particularmente en donde la administración restringida se basa en tasas esperadas o premodeladas de las capacidades de consumo de la glucosa por parte de las células animales en el cultivo. Con independencia del número de transportadores de glucosa expresados por las células, éstas únicamente son capaces de obtener suficiente glucosa para producir únicamente niveles bajos de ácido láctico al alimentar la glucosa a los cultivos sólo a una tasa restringida.

Ejemplo 4

Sistema sensor basado en la densidad celular

Un sensor de la densidad celular que no se basa en el muestreo puede utilizarse para facilitar la administración de la glucosa a tasas restringidas en tiempo real. Un sistema de monitorización por ordenador por el que pueden determinarse las densidades celulares sin muestreo (por ejemplo mediante la utilización de un sistema en el que la densidad celular de un cultivo de células animales se estima mediante mediciones fotométricas de la turbidez del cultivo) se programa para que registre las densidades celulares cada cinco minutos, y para enviar esos datos a un sistema informático conectado que controla la administración de la glucosa en el cultivo de células animales. Este sistema informático conectado se ha programado, a su vez, tanto para calcular una tasa de administración restringida de glucosa como para administrar glucosa en el cultivo de células animales a esa tasa restringida. Esta tasa restringida de administración de glucosa es una función de una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa para las células a la densidad celular estimada.

Se prepara un sistema de administración de glucosa basado en una jeringa al igual que para el cultivo de alimentación restringida de glucosa de gradiente bajo (es decir, con una solución de alimentación de glucosa 0,2 g/ml) del ejemplo anterior. Para las densidades celulares comprendidas entre $1{,}4x10^6$ células/ml y $1{,}6x10^6$ células/ml en un sistema de cultivo de células animales de 1 litro, se determina que una tasa restringida de administración de glucosa en un cultivo es (como función de una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa) 8,4 mg de glucosa/hora, mientras que para densidades celulares comprendidas entre $1{,}9x10^6$ células/ml y $2{,}1x10^6$ células/ml en un sistema de cultivo de células animales de 1 litro, se determina que una tasa restringida de administración de glucosa en un cultivo es de (nuevamente como función de una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa) 11 mg de glucosa/hora. Por consiguiente, en el momento en el que el sistema informático de seguimiento mide que la densidad celular es aproximadamente $1{,}5x10^6$ células/ml, el sistema informático conectado que controla la administración de glucosa en el cultivo de células animales ajusta en tiempo real la tasa de administración de glucosa en el cultivo, de manera que la jeringa administra 0,042 ml/hora de la solución de alimentación de glucosa 0,2 g/ml (es decir, se administra glucosa en el sistema de cultivo celular a una tasa de 8,4 mg/hora). Posteriormente, en el momento en el que el sistema informático de seguimiento mide que la densidad celular es aproximadamente $2{,}0x10^6$ células/ml, el sistema informático conectado que controla la administración de glucosa en el cultivo de células animales ajusta en tiempo real la tasa de administración de glucosa en el cultivo, de manera que la jeringa administra 0,055 ml/hora de la solución de alimentación de glucosa 0,2 g/ml (es decir, se administra glucosa en el sistema de cultivo celular a una tasa de 11 mg/hora).

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

La descripción detallada y ejemplos anteriores se han proporcionado únicamente en aras de una más clara comprensión. No deben interpretarse limitaciones innecesarias de los mismos. La invención no se encuentra limitada a los detalles exactos mostrados y descritos, debido a que variaciones determinables por el experto en la materia se encuentran comprendidas dentro de la invención según se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Método de cultivo celular para el control de la producción de ácido láctico a niveles reducidos en un cultivo celular alimentado por lotes, que comprende:

la mezcla de células animales y un medio con el fin de formar un cultivo celular, y

la alimentación de glucosa de una manera restringida al cultivo celular a una tasa que es una función de una tasa esperada o premodelada de consumo de glucosa por parte de las células animales cultivadas en un medio que contiene un nivel elevado de glucosa,

en el que la función es la multiplicación de la tasa esperada por un porcentaje inferior a 100%.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el porcentaje es por lo menos 33%.

3. Método según la reivindicación 1, en el que el porcentaje no es superior a 45%.

4. Método según 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.

5. Método según 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.

6. Método según la reivindicación 1, en el que se utiliza un sensor para el seguimiento de la densidad celular en el cultivo celular, y además se utiliza una medición derivada de un sensor de la densidad celular para calcular la tasa de alimentación de glucosa de una manera restringida en el cultivo celular.

7. Método según la reivindicación 1, en el que se utiliza un sensor de pH para realizar un seguimiento del pH del cultivo celular y, en respuesta a un incremento por encima de un valor predeterminado de pH, se alimenta glucosa adicional de una manera restringida al cultivo celular.

8. Método según la reivindicación 7, en el que la glucosa adicional alimentada de una manera restringida comprende uno o más bolos de alimentación de glucosa.

9. Método según la reivindicación 7, en el que el valor predeterminado de pH es aproximadamente 7.

10. Método según la reivindicación 1, en el que se utiliza un sensor de pH para realizar un seguimiento del pH del cultivo celular y, en respuesta a un incremento por encima de un valor predeterminado de pH, la alimentación de glucosa de una manera restringida seguidamente continúa a una nueva tasa que es mayor que una tasa inmediatamente anterior.

11. Método según la reivindicación 10, en el que la nueva tasa es superior en por lo menos 15% a la tasa inmediatamente anterior.

12. Método según la reivindicación 10, en el que la nueva tasa es superior en no más de 50% a la tasa inmediatamente anterior.

13. Método según la reivindicación 10, en el que la respuesta a un incremento por encima de un valor predeterminado de pH comprende además la adición de uno o más bolos de alimentación de glucosa al cultivo celular.

14. Método según la reivindicación 10, en el que el valor predeterminado de pH es aproximadamente 7.

15. Método según la reivindicación 1, en el que:

(i) se utiliza un sensor de la densidad celular para realizar un seguimiento de la densidad celular en el cultivo celular sin muestreo, y se utiliza además una medición derivada de un sensor de densidad celular para calcular la tasa de alimentación de glucosa de una manera restringida al cultivo celular,

(ii) se utiliza un sensor de pH para realizar un seguimiento del pH del 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 seguidamente continúa a una nueva tasa que es superior a una tasa inmediatamente anterior, o

(iii) se utiliza tanto el sensor de densidad celular como el sensor de pH tal como se describe en (i) e (ii), respectivamente.

16. Método según la reivindicación 15, en el que la respuesta a un incremento por encima de un valor predeterminado de pH en (ii) y/o en (iii) comprende además la adición de uno o más bolos de alimentación de glucosa al cultivo celular.

17. Método según la reivindicación 15, en el que el valor predeterminado de pH es aproximadamente 7.

18. Método según la reivindicación 1, en el que la tasa premodelada se determina mediante:

la mezcla de células animales y un medio que contiene un nivel elevado de glucosa, para formar un primer cultivo celular, y

la determinación de una tasa de consumo de glucosa para las células animales cultivadas en el primer cultivo celular.

19. Método según la reivindicación 18, en el que se utiliza un sensor de pH para realizar un seguimiento del pH del segundo cultivo celular y, en respuesta a un incremento por encima de un valor predeterminado de pH, la alimentación de glucosa de una manera restringida comprende además la adición de uno o más bolos de alimentación de glucosa al segundo cultivo celular.

20. Método según la reivindicación 19, en el que la alimentación de glucosa de una manera restringida al segundo cultivo comprende además continuar seguidamente la alimentación a una nueva tasa que es superior a una tasa inmediatamente anterior.

21. Método según la reivindicación 19, en el que el valor predeterminado de pH es aproximadamente 7.

22. Método según la reivindicación 20, en el que la nueva tasa es superior en por lo menos 15% a la tasa inmediatamente anterior.

23. Método según la reivindicación 20, en el que la nueva tasa es superior en no más de 50% a la tasa inmediatamente anterior.

24. Método según la reivindicación 1, en el que la tasa premodelada se determina mediante:

la mezcla de células animales y un medio que contiene un nivel elevado de glucosa, para formar un primer cultivo celular,

la determinación de una tasa de consumo de glucosa par alas células animales cultivadas en el primer cultivo celular,

la mezcla de células animales y un medio con el fin de formar un segundo cultivo celular,

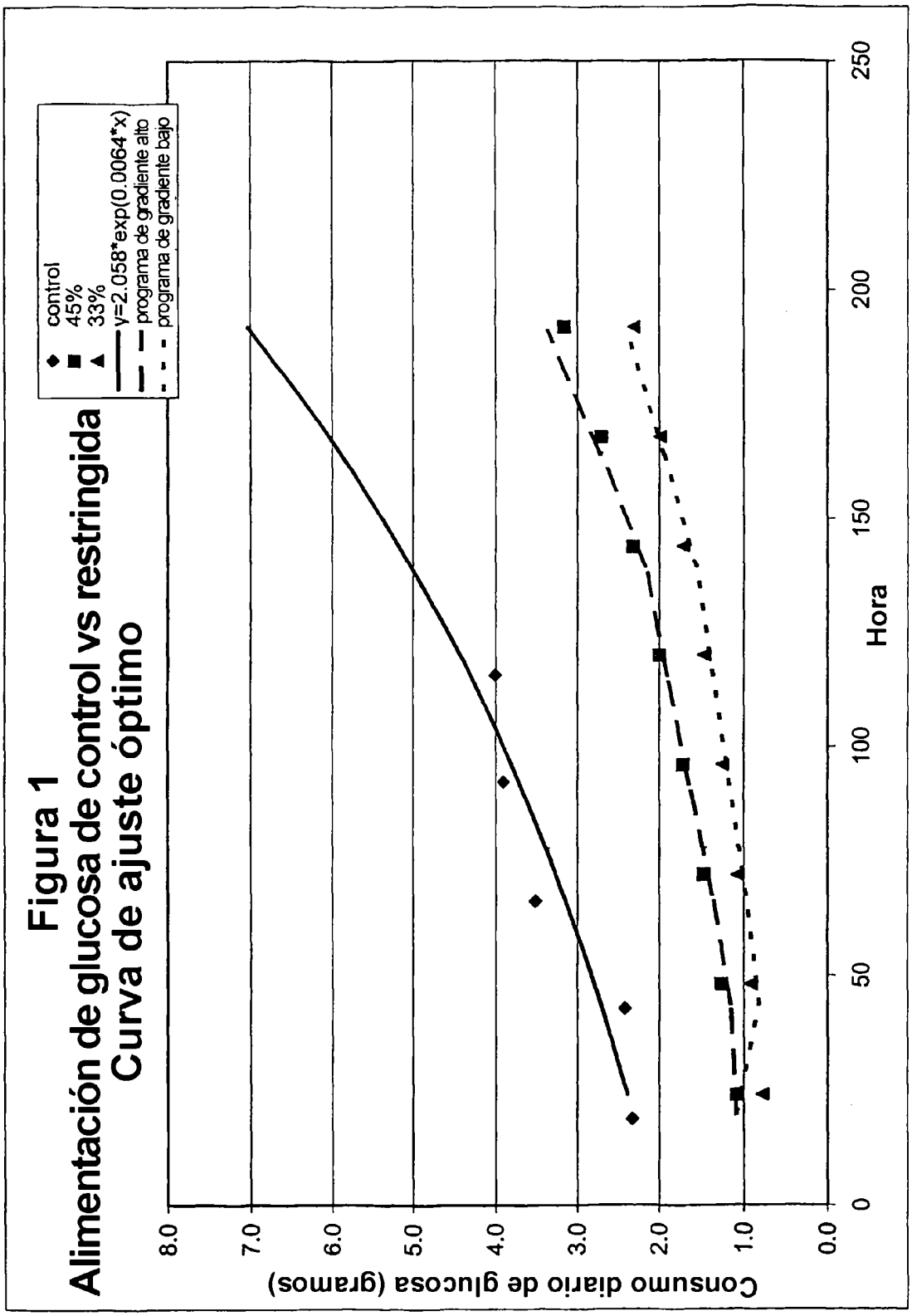
y la alimentación de glucosa de una manera restringida al segundo cultivo celular a una tasa que es una función de la tasa de consumo determinada de glucosa, en el que:

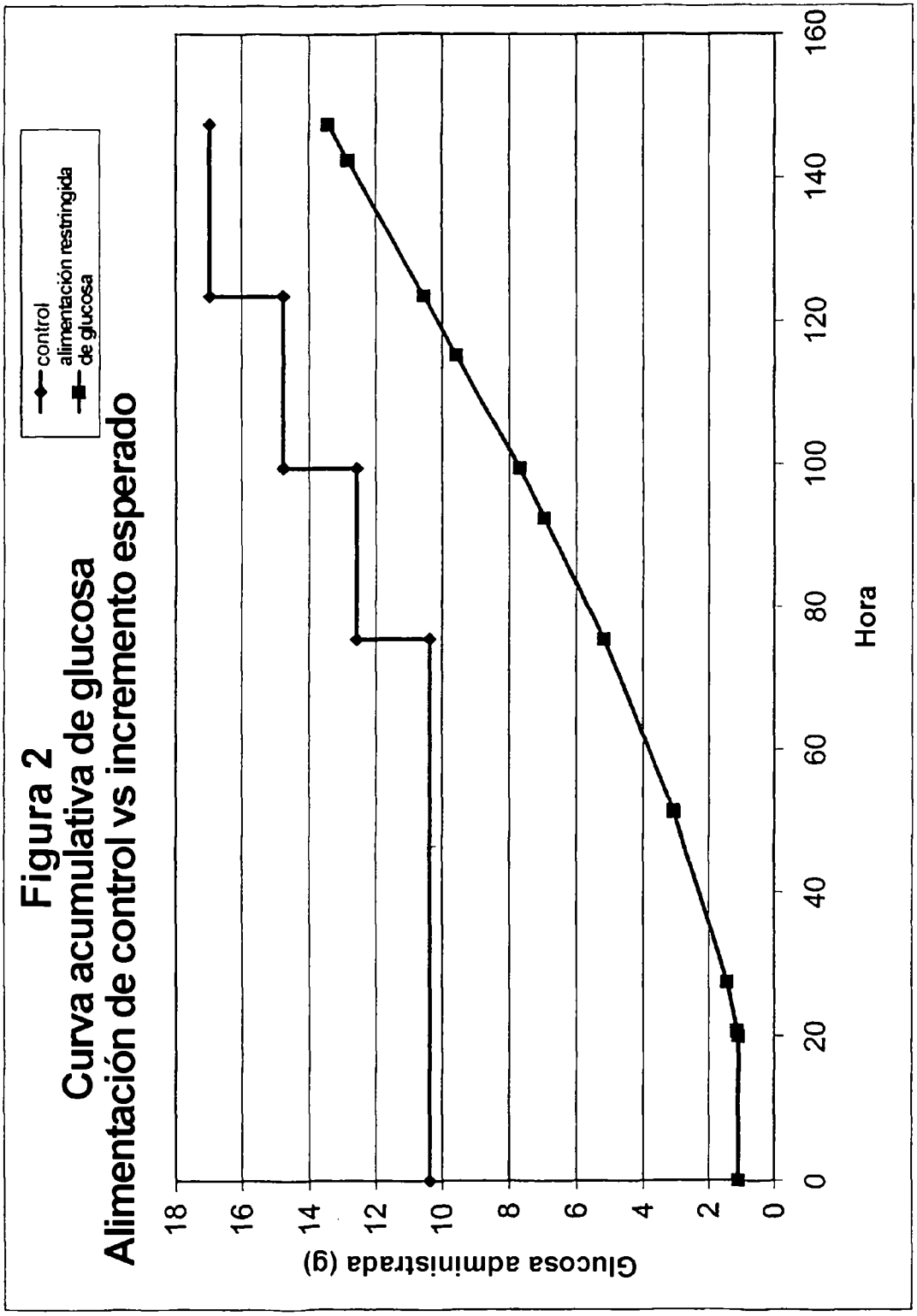
(i) se utiliza un sensor de densidad celular para realizar un seguimiento de la densidad celular en el segundo cultivo celular sin muestreo, y se utiliza además una medición derivada de un sensor de densidad celular para calcular la tasa de alimentación de glucosa de una manera restringida al segundo cultivo celular,

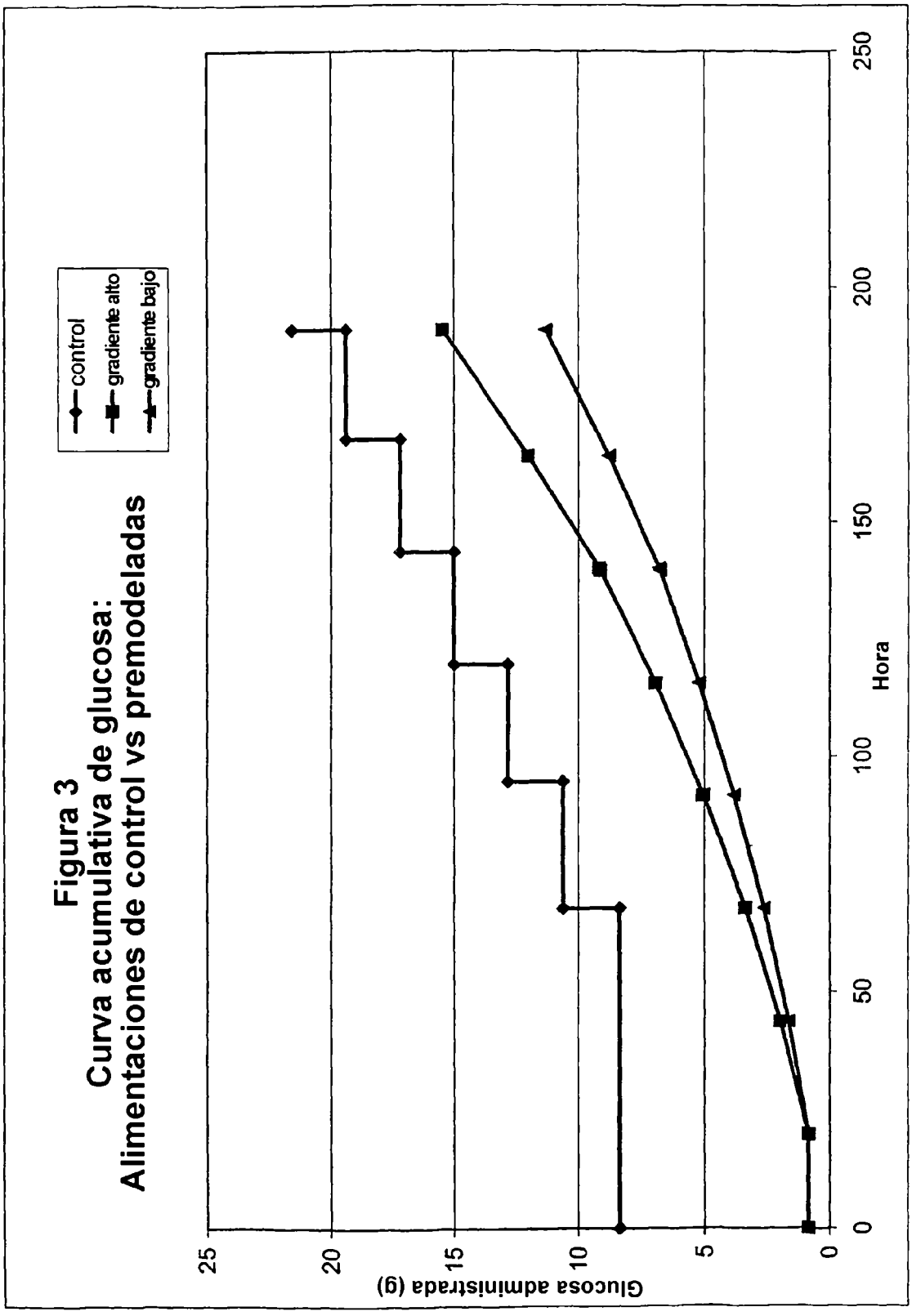
(ii) se utiliza un sensor de pH para realizar un seguimiento del pH del segundo cultivo celular sin muestreo y, en respuesta a un incremento por encima de un valor predeterminado de pH, la alimentación de glucosa de una manera restringida seguidamente continúa a una nueva tasa que es superior a una tasa inmediatamente anterior, o

(iii) se utilizan los sensores tanto de densidad celular como de pH tal como se describe en (i) e (ii), respectivamente.

25. Método según la reivindicación 24, en el que la respuesta a un incremento por encima de un valor predeterminado de pH en (ii) y/o en (iii) comprende además la adición de uno o más bolos de alimentación de glucosa al segundo cultivo celular.


Figura 1
Alimentación de glucosa de control vs restringida
Curva de ajuste óptimo
control
45%
33%
y=2.058*exp(0.0064*x)
programa de gradiente alto
programa de gradiente bajo
Consumo diario de glucosa (gramos)
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
50
100
150
200
250
Hora


Figura 2
Curva acumulativa de glucosa
Alimentación de control vs incremento esperado
control
alimentación restringida de glucosa
Glucosa administrada (g)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Hora
0
20
40
60
80
100
120
140
160


Figura 3
Curva acumulativa de glucosa:
Alimentaciones de control vs premodeladas
control
gradiente alto
gradiente bajo
Glucosa administrada (g)
0
5
10
15
20
25
0
50
100
150
200
250
Hora

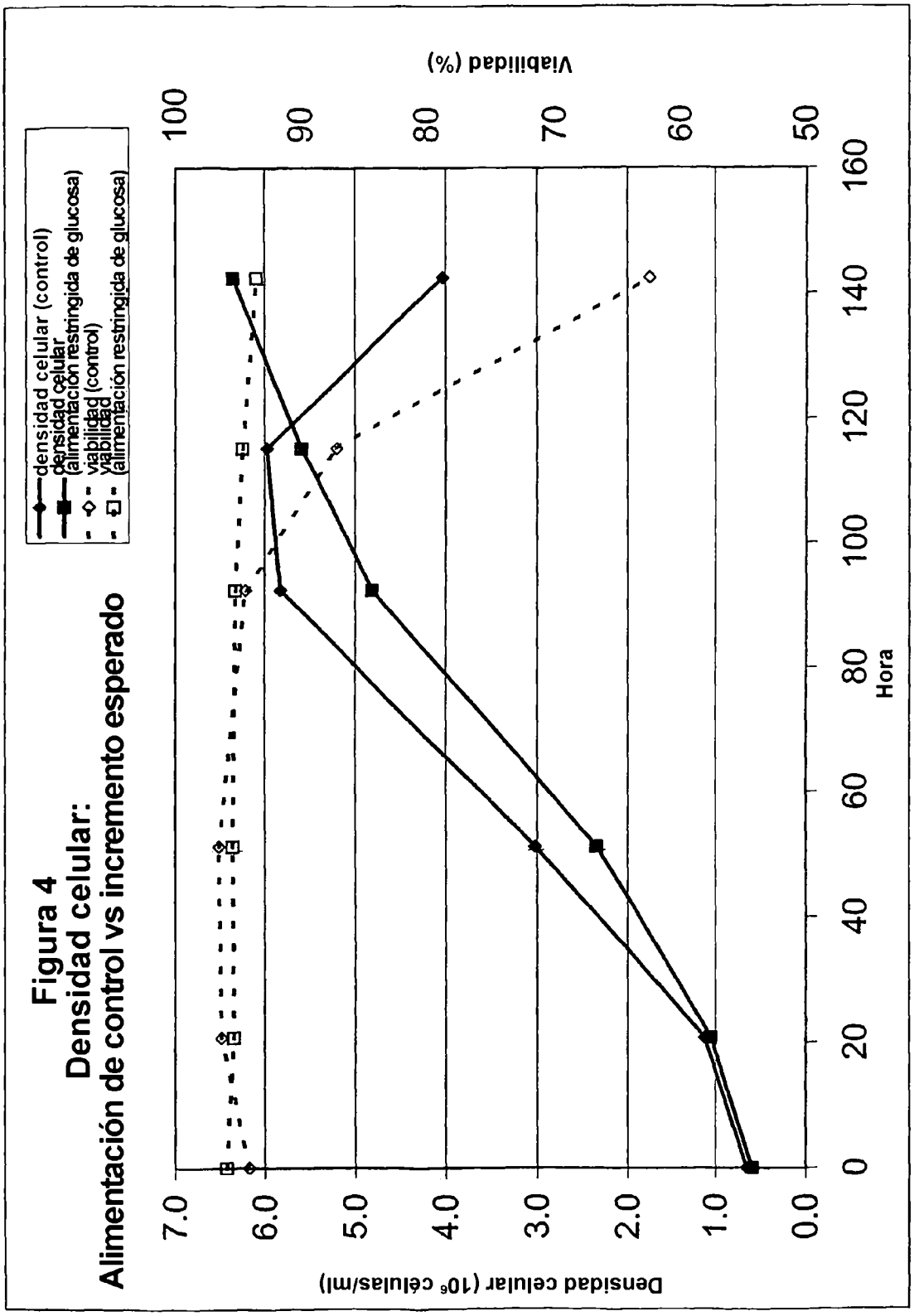
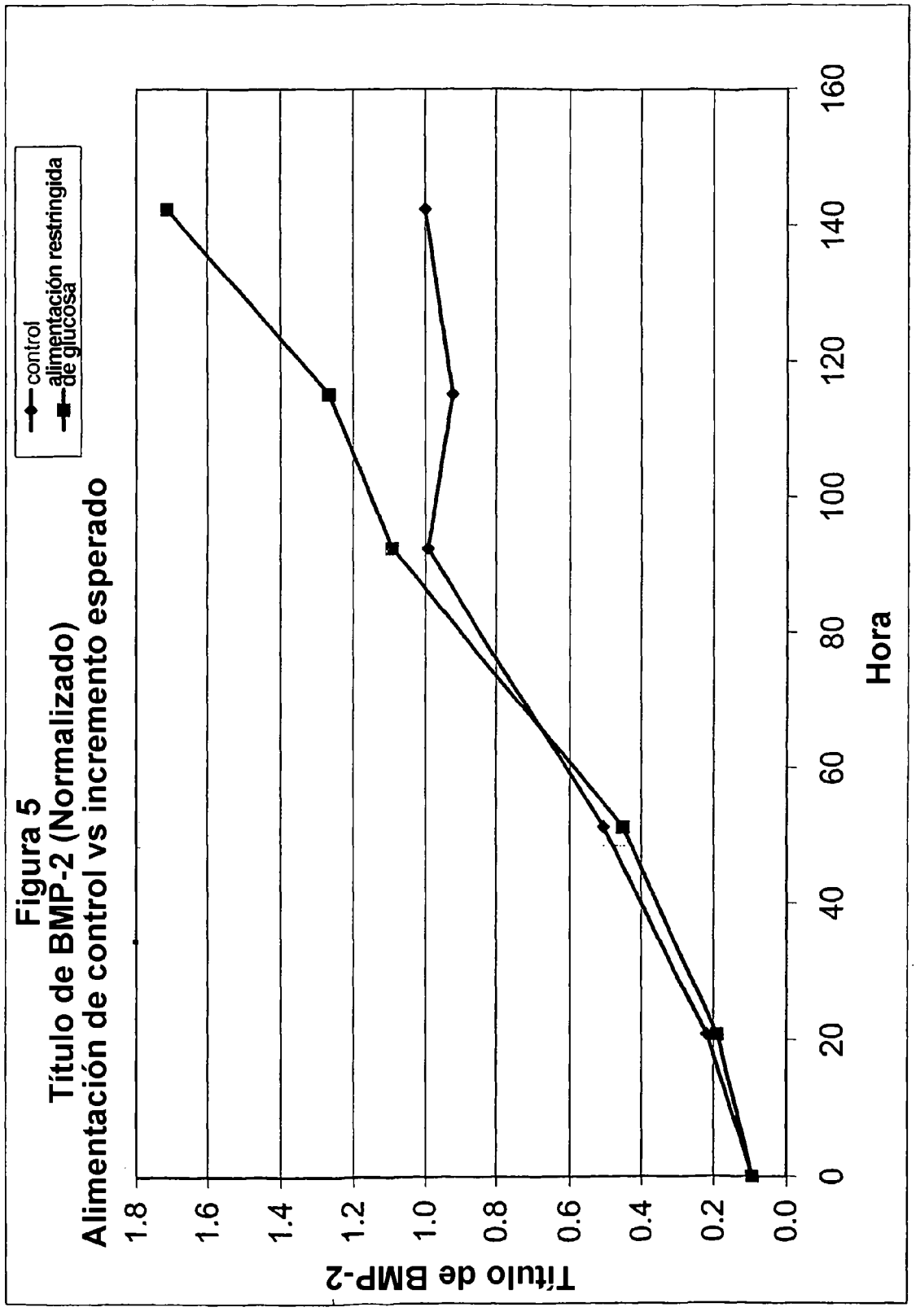
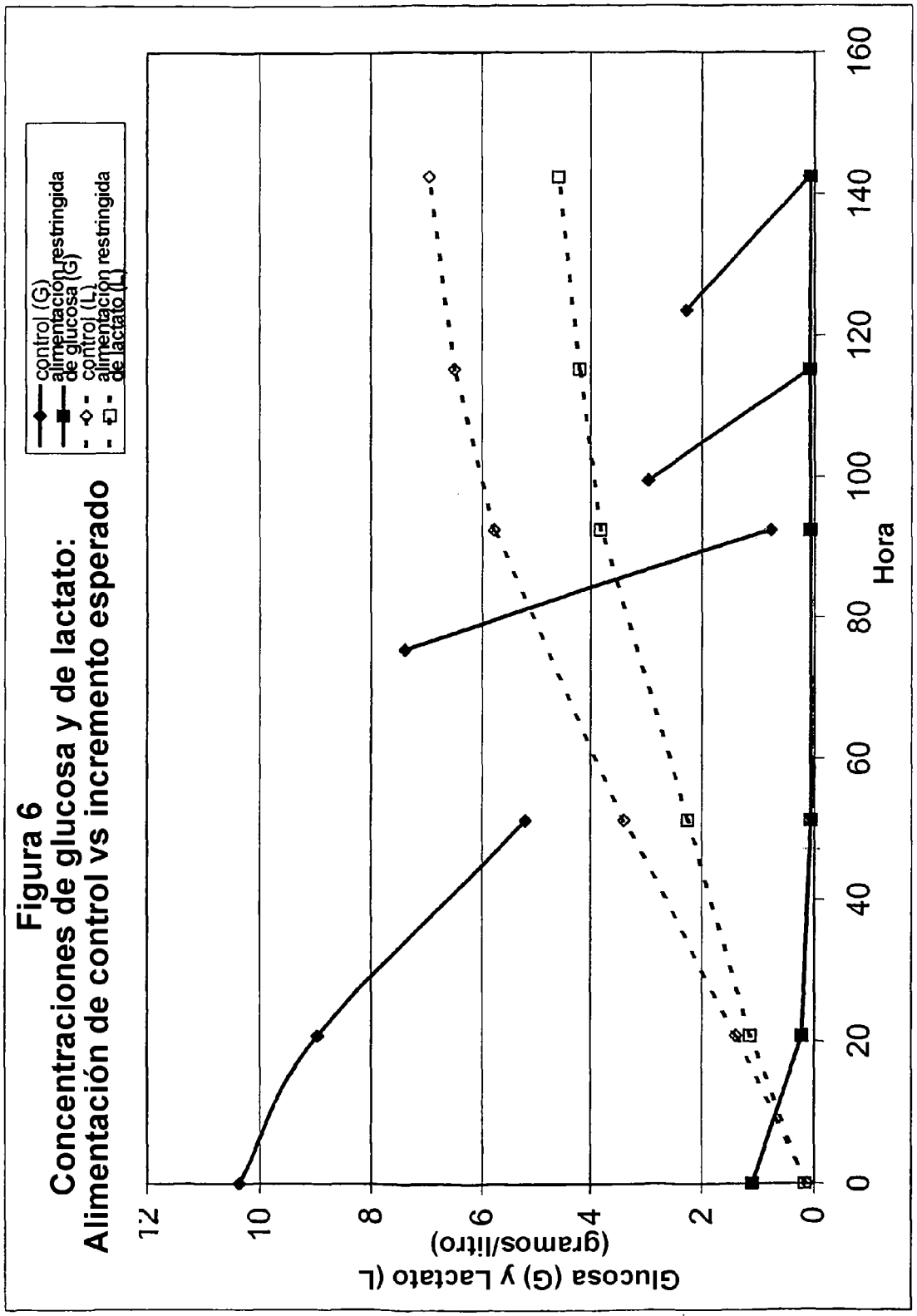


Figura 4
Densidad celular:
Alimentación de control vs incremento esperado


Figura 5
Título de BMP-2 (Normalizado)
Alimentación de control vs incremento esperado
control
alimentación restringida de glucosa
Título de BMP-2
Hora
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
0
20
40
60
80
100
120
140
160


Figura 6
Concentraciones de glucosa y de lactato:
Alimentación de control vs incremento esperado
control (G)
alimentación restringida de glucosa (G)
control (L)
alimentación restringida de lactato (L)
Glucosa (G) y Lactato (L (gramos/litro)
Hora
0
2
4
6
8
10
12
0
20
40
60
80
100
120
140
160

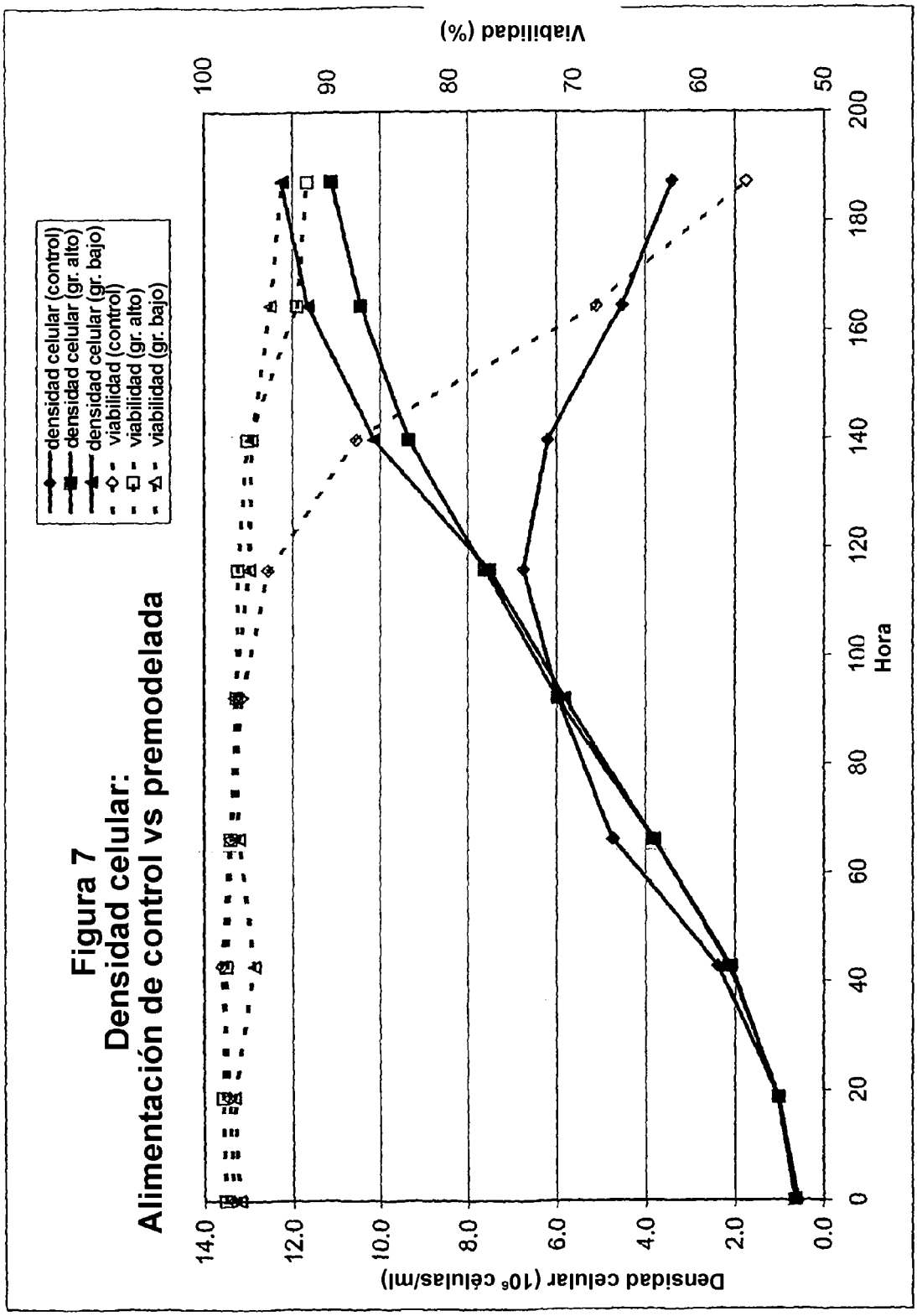
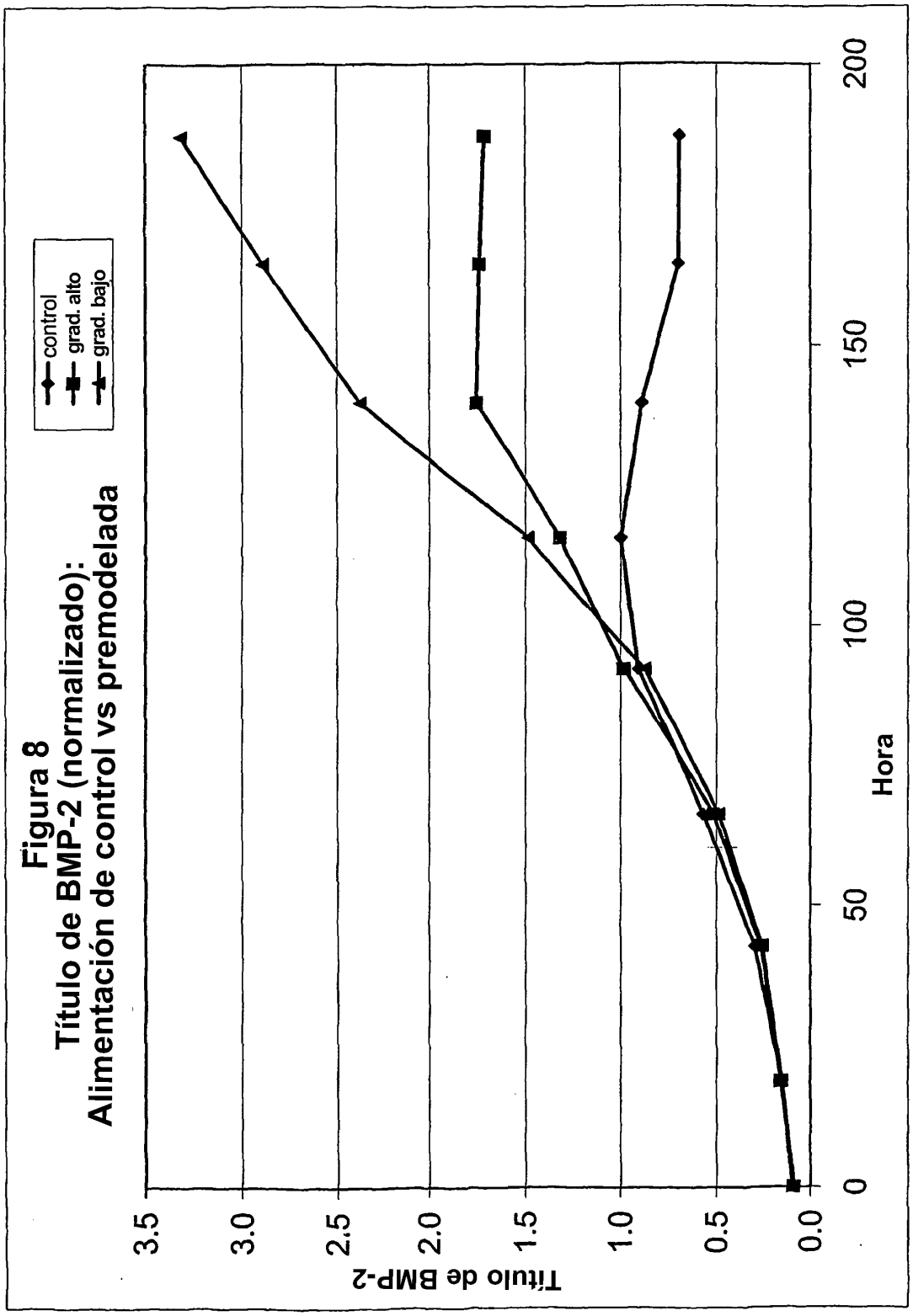
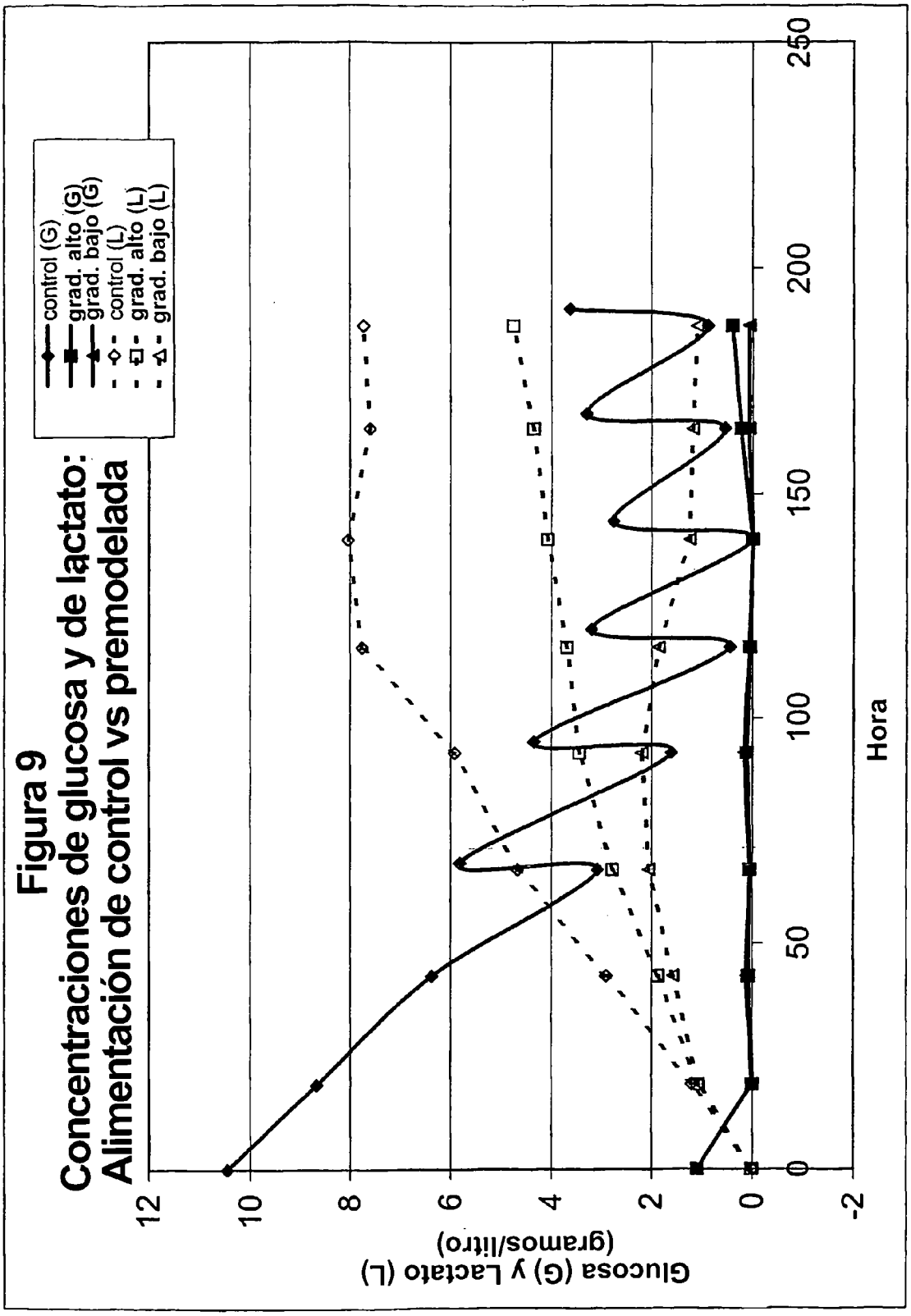


Figura 7
Densidad celular:
Alimentación de control vs premodelada


Figura 8
Título de BMP-2 (normalizado):
Alimentación de control vs premodelada
control
grad. alto
grad. bajo
Título de BMP-2
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
0
50
100
150
200
Hora


Figura 9
Concentraciones de glucosa y de lactato: Alimentación de control vs premodelada
control (G)
grad. alto (G)
grad. bajo (G)
control (L)
grad. alto (L)
grad. bajo (L)
Glucosa (G) y Lactato (L) (gramos/litro)
Hora
12
10
8
6
4
2
0
-2
0
50
100
150
200
250