

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 161**

51 Int. Cl.:

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2003 E 10152393 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2226381**

54 Título: **Procedimiento para el cultivo de células para la producción de sustancias**

30 Prioridad:

27.11.2002 DE 10255508

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

20.04.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ESSERS, RUTH;
GAETGENS, JOCHEN;
LINK, THOMAS;
NOLL, THOMAS;
SKOPNIK, KERSTIN y
WANDREY, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 567 161 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el cultivo de células para la producción de sustancias

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para el cultivo de células para la producción de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas según el preámbulo de la reivindicación 1.

En la producción de sustancias, en particular proteínas, se emplean cultivos celulares en procesos fermentativos. A este respecto pueden diferenciarse procesos en los que los cultivos celulares son genéticamente invariables y forman productos de metabolismo propios y en los que los organismos se modifican genéticamente de tal forma que o bien multiplican sustancias propias, por ejemplo proteínas, o bien producen sustancias extrañas, por ejemplo proteínas. Los organismos que producen las sustancias se alimentan para ello con un medio nutritivo, el cual garantiza la supervivencia de los organismos y hace posible la producción del compuesto diana deseado. Para esta finalidad se conoce un gran número de medios de cultivo que hacen posible la fermentación. Uno de los componentes más importante de los medios de cultivo es la glucosa. Según el estado de la técnica, se procura conseguir en una mezcla de fermentación que se mantenga una mínima concentración de glucosa correctamente, para optimizar el rendimiento del compuesto diana. La solicitud de patente japonesa 001 101 882 A, da a conocer un procedimiento de cultivo para células de mamíferos en el cual se mantiene constante una mínima concentración de 0,2 mmol/litro de glucosa. El documento US 544 39 68 da a conocer un procedimiento de cultivo en el cual tiene lugar una limitación de la glucosa. El procedimiento no conduce sin embargo a una mayor tasa específica de producción de las células con respecto a la alimentación no limitante.

El documento WO 98/41611 da a conocer un procedimiento de tres etapas para el cultivo de células de mamífero con limitación de glucosa, que comprende una fase en modo discontinuo para la reducción de la concentración de glucosa, seguido de una fase en modo de alimentación por partidas, en la que mediante la limitación de glucosa se produce una modificación del metabolismo celular ("*metabolic shift*") y finalmente una fase de conducción del procedimiento continua. El grado de limitación de glucosa se define en el documento mediante la proporción de lactato formado con respecto a la glucosa consumida (<1).

30 El objetivo de la invención es crear un procedimiento para el cultivo de células, con el que aumente la productividad de una célula individual en el producto, y en el que se permitan altas densidades celulares. Debe ser posible un alto rendimiento de espacio/tiempo en el producto.

El procedimiento debe ser particularmente sencillo en su ejecución, debe estar unido a un mínimo gasto de medición y de regulación y debe ser particularmente económico.

Partiendo del preámbulo de la reivindicación 1, se resuelve sorprendentemente el objetivo debido a que se realiza el cultivo de una línea celular que produce una inmunoglobulina o un fragmento de una inmunoglobulina con alimentación de un medio nutritivo de manera que se ajuste en la solución del cultivo una limitación de glucosa. El grado de limitación de la glucosa puede definirse como la relación de la tasa de consumo específica de glucosa observada con respecto a la máxima tasa de consumo de glucosa específica conocida para estas células. El grado de limitación de glucosa $DGL = qGlc/qGlc_{m\acute{a}x}$ ($qGlc$ = tasa de consumo de glucosa específica observada en el momento; $qGlc_{m\acute{a}x}$ = máxima tasa de consumo de glucosa específica conocida para estas células). El DGL está entre los límites $DGL_{mantenimiento}$ y 1, en donde el $DGL_{mantenimiento}$ significa la limitación completa del crecimiento y 1 significa ninguna limitación o respectivamente, el exceso completo de glucosa.

De manera conjunta con la limitación de glucosa tiene lugar un continuo retroceso de la concentración de glucosa residual hasta obtener una concentración estacionaria en la solución de cultivo, la cual es mayor de 0 mmol/litro pero menor de 1 mmol/litro, preferentemente menor de 0,5 mmol/litro. Hay que hacer notar que con la disminución del DGL puede realizarse otro aumento de la densidad de células vivas en el recipiente de cultivo. Con una limitación creciente de glucosa converge entonces la densidad celular hacia un valor máximo. De ello resulta que el grado de limitación de la glucosa converge hacia un valor mínimo, a este respecto el DGL según la invención es mayor o igual que el DGL que conduce al mantenimiento de las células (metabolismo de mantenimiento) $DGL_{mantenimiento} = qGlc_{mantenimiento}/qGlc_{m\acute{a}x}$ ($qGlc_{mantenimiento}$ = tasa de consumo de glucosa específica observada durante el metabolismo de mantenimiento puro; $qGlc_{m\acute{a}x}$ = máxima tasa de consumo de glucosa específica conocida para estas células), e inferior a 0,5, preferentemente inferior a 0,4, con particular preferencia inferior a 0,3.

Es característico sin embargo, que con la disminución de la concentración de glucosa no se logra ninguna disminución de la concentración de células en la solución. Con una creciente limitación de glucosa, o sea con valor de DGL decreciente, aumenta la productividad específica de una célula. Puesto que la densidad de células vivas en el recipiente de cultivo no disminuye, esto conduce a un aumento del rendimiento espacio-tiempo. Con la incorporación de la limitación de glucosa, tiene lugar fenomenológicamente una disminución de la tasa de formación de lactato específica. La tasa de formación de lactato converge hacia un valor mínimo. Esto conduce a que la concentración de lactato residual en el recipiente de cultivo disminuya, como máximo tiende a 0. Con la limitación de glucosa se produce por tanto una modificación del metabolismo celular.

Es importante a este respecto que antes del empleo de la limitación de glucosa no se produzca ninguna otra limitación de otro sustrato. Por lo tanto, el medio de crecimiento debe estar creado de modo que la glucosa esté limitada en primer lugar.

5 Con el procedimiento según la invención aumenta el rendimiento espacio/tiempo para una densidad celular dada. Mediante el procedimiento según la invención, la cantidad de glucosa disponible por célula disminuye de forma que la glucosa se incorpora principalmente al metabolismo de mantenimiento y unido a la misma el producto, y se
10 incorpora menos en el crecimiento celular. Debido a que es necesaria una menor entrada del medio, se ahorra en el coste de la glucosa, puesto que es necesaria menos glucosa. Además, se logra una muy alta concentración del producto. Esto puede conducir a una disminución de los costes de procesamiento. El procedimiento según la invención hace posible en particular el aumento de la producción de inmunoglobulinas o fragmentos de
15 inmunoglobulinas, sin que además deba modificarse genéticamente una línea celular para la transformación del procedimiento según la invención. El aumento del título del producto hace posible la producción de una cantidad deseada de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas en un volumen de cultivo más pequeño, lo cual conduce a menores costes de inversión.

El procedimiento según la invención se inicia o bien como procedimiento discontinuo y se continúa como procedimiento continuo, o está constituido por un modo de procedimiento discontinuo y un modo de procedimiento de alimentación por partidas, iniciándose el procedimiento como procedimiento discontinuo y continuándose como
20 procedimiento de alimentación por partidas.

Las células deben cultivarse preferentemente en modo de procedimiento continuo con separación de las células, por ejemplo, con un filtro centrífugo (cultivo por perfusión). Para ello son apropiadas todas las clases corrientes de recipientes de cultivo, como por ejemplo una caldera con agitación, y mecanismos de separación de las células,
25 como por ejemplo filtros centrífugos, ultrasonidos o decantadores. Preferentemente, el sistema de cultivo debe hacer posible altas densidades celulares. Preferentemente se efectúa una separación de las células, con el fin de que no pueda disminuir la densidad celular cuando actúe la limitación de glucosa. Esto conduce a que cuando la densidad de las células vivas aumenta y se mantiene la alimentación de la glucosa, el DGL se reduce más. Una alta densidad celular hace posible una disminución del DGL por debajo de un valor de 0,4 con una velocidad de flujo ajustada en un orden de magnitud de la máxima tasa de crecimiento. Así pueden emplearse por ejemplo velocidades de flujo de
30 0,03 - 0,05 h⁻¹ para las células CHO MUC2-GFP-C-term empleadas, así como también para las células CHO/MUC1-IgG2a PH3744/25 empleadas.

Para conseguir una disminución del DGL, se puede realizar la estrategia de alimentación con glucosa según esto tal como sigue: la cantidad de glucosa suministrada no aumenta con un aumento de la densidad de células vivas para evitar una limitación de glucosa. A este respecto, la cantidad de glucosa suministrada debía seleccionarse de tal manera que el DGL no sobrepase los valores requeridos, concretamente DGL inferior a $\leq 0,5$, preferentemente $\leq 0,4$, con particular preferencia $\leq 0,3$. De ello resulta que la cantidad de glucosa suministrada no es preferentemente superior al 50 %, de manera especialmente preferente no superior al 35 %, lo cual es lo que el sistema puede
35 consumir como máximo para un número de células vivas que cabe esperar en una conducción del procedimiento convencional no limitador de glucosa. Después de la modificación del metabolismo celular (metabolismo de lactato y productividad), puede elevarse lentamente la cantidad de glucosa suministrada, sin embargo no debía ser posible un DGL superior a 0,5, preferentemente no superior a 0,4. Esto conduce a un posterior aumento de la densidad de las células vivas manteniendo una alta productividad y con ello un rendimiento espacio/tiempo elevado. La cantidad de glucosa suministrada puede verse influida en un procedimiento continuo mediante la velocidad de entrada del medio y la concentración de glucosa en el medio de alimentación. Es decisivo que el flujo de masa de glucosa suministrada durante el procedimiento no aumente o aumente solamente de tal medida que el DGL alcance un valor inferior a 0,5, preferentemente inferior a 0,4, o quede por debajo de estos valores y ya no los sobrepase.

50 En las reivindicaciones dependientes se indican perfeccionamientos ventajosos de la invención.

A continuación, la invención se describirá en sus detalles individuales.

Las figuras muestran resultados de pruebas como ejemplo.

55 Muestra:

La figura 1: aumento del número de células vivas [ml⁻¹] y representación de la velocidad de flujo del medio [h⁻¹] con respecto al tiempo de proceso [h] para la producción de MUC1-IgG2a a partir de células CHO MUC1/IgG2a PH3744/25 en un reactor de perfusión.
60

La figura 2: productividad específica de MUC1-IgG2a [$\mu\text{g}/\text{células h} \cdot \text{E9}$] y DGL con respecto al tiempo de proceso en un reactor de perfusión.

- La figura 3: aumento del número de células vivas [ml^{-1}] y mM de glucosa residual, representado con respecto al tiempo de proceso [h], para la producción de MUC1-IgG2a a partir de células CHO MUC1/IgG2a PH3744/25 en un reactor de perfusión.
- 5 La figura 4: concentración de glucosa y lactato así como concentración de glucosa en la entrada del medio [mmol/litro], representada con respecto al tiempo de proceso [h], para la producción de MUC1-IgG2a a partir de células CHO MUC1/IgG2a PH3744/25 en un reactor de perfusión.
- 10 La figura 5: aumento de la concentración de MUC1-IgG2a [$\mu\text{g/ml}$] y qMUC1-IgG2a [$\mu\text{g/células h}^*E9$] con respecto al tiempo [h], para la producción de MUC1-IgG2a a partir de células CHO MUC1/IgG2a PH3744/25 en un reactor de perfusión.
- 15 La figura 6: aumento del número de células vivas [ml^{-1}] y representación de la velocidad de flujo del medio [h^{-1}] con respecto al tiempo de proceso [h], para la producción de MUC2-GFP-C-term a partir de células CHO MUC2-GFP-C-term en un reactor de perfusión.
- La figura 7: productividad específica de MUC2-GFP-C-term [$\text{nmol/células h}^*E9$] y DGL con respecto al tiempo de proceso, en un reactor de perfusión.
- 20 La figura 8: aumento del número de células vivas [ml^{-1}] y glucosa residual [mM], representado con respecto al tiempo de proceso [h], para la producción de MUC2-GFP-C-term a partir de células CHO MUC2-GFP-C-term en un reactor de perfusión.
- 25 La figura 9: concentración de glucosa y de lactato así como concentración de glucosa en la entrada del medio [mmol/litro], representada con respecto al tiempo de proceso [h], para la producción de MUC2-GFP-C-term a partir de células CHO MUC2-GFP-C-term en un reactor de perfusión.
- 30 La figura 10: aumento de la concentración de MUC2-GFP-C-term [nM] y qMUC2-GFP-C-term [$\text{nmol/células h}^*E9$] con respecto al tiempo [h], para la producción de MUC2-GFP-C-term a partir de células CHO MUC2-GFP-C-term en un reactor de perfusión.

Además, en la tabla 1 se muestran los datos del ensayo a partir del empleo del procedimiento según la invención con la célula CHO MUC1/IgG2a PH 3744/25.

- 35 En la tabla 2 se representan los datos del ensayo a partir del empleo del procedimiento según la invención con la célula CHO MUC2-GFP-C-term.

40 El modo de procedimiento según la invención puede efectuarse con diferentes líneas celulares de producción. Las líneas celulares pueden emplearse como tipo salvaje o como células recombinantes genéticamente modificadas. La modificación genética puede tener lugar por ejemplo por inserción de genes adicionales del mismo organismo o de otro organismo en el ADN, o un vector, o en el reforzamiento de la actividad o respectivamente expresión de un gen mediante la incorporación de un promotor más activo, por ejemplo a partir del CMV. Los genes pueden codificar para diferentes proteínas, por ejemplo para proteínas tales como proteínas de fusión o para anticuerpos.

45 Pueden citarse como ejemplo las siguientes líneas celulares: células de mamíferos, como líneas de células CHO, como por ejemplo CHO-K1, BHK, como BHK-21, hibridomas, NS/O, otras células de mieloma, y células de insectos u otras células superiores. Se prefiere especialmente el uso de células que no producen preferentemente de manera acoplada al crecimiento.

50 Una línea celular CHO recombinante cuya productividad puede aumentar con el modo de procedimiento según la invención, es la línea celular CHO MUC1/IgG2a, PH 3744/25, con la que puede segregarse la glicoproteína MUC1-IgG2a. Otra línea celular CHO, a saber la CHO MUC2-GFP-C-term, es capaz de segregar de forma creciente una proteína de fusión MUC2-GFP-C-term, cuando se somete ésta al modo de procedimiento según la invención.

55 Como medio de cultivo puede emplearse en principio cualquier medio que contenga glucosa, que no sea limitante con respecto a otros componentes. A modo de ejemplo puede citarse ProCHO4-CDM. Pueden emplearse también medios a base de recetas conocidas como por ejemplo IMDM, DMEM o F12 de Ham, los cuales se han optimizado con respecto al modo de procedimiento según la invención de forma que solamente hay limitación de glucosa. Esto puede lograrse por ejemplo concentrando más los otros componentes en relación con la glucosa. En general, es también posible dosificar la glucosa separadamente del medio.

60

El intervalo de pH está preferentemente entre 6,7 - 7,7, con particular preferencia entre 7 - 7,3. Sin embargo, son también posibles otros intervalos de pH.

El intervalo de temperatura está preferentemente entre 35 °C - 38,5 °C, con particular preferencia a 37 °C para CHO MUC1-IgG2a. Sin embargo son también posibles otros intervalos de temperatura, como por ejemplo < 35 °C, en los que no se produzca la destrucción irreversible del producto.

5 Con el procedimiento de cultivo según la invención se pueden producir sustancias, tales como glicoproteínas, proteínas de fusión, anticuerpos, proteínas en general, de las cuales pueden citarse como ejemplo MUC1-IgG2a, MUC2-GFP-C-term, EPO, interferonas, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, PA, inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas.

10 La figura 1 muestra el transcurso de la densidad de células vivas (cv) en células CHO/MUC1-IgG2a y la velocidad de flujo del medio (D) con respecto al tiempo de proceso (h), en un reactor de perfusión. En la misma, son:

- la velocidad de flujo del medio (1/h) y
- la densidad de las células vivas (1/ml).

15 La figura 2 muestra la productividad específica de MUC1-IgG2a ($q_{\text{MUC1-IgG2a}}$) y DGL con respecto al tiempo de proceso, en un reactor de perfusión. En la misma son:

- la productividad específica ($\mu\text{g}/\text{células hE9}$),
- DGL (grado de limitación de glucosa)

20 La figura 3 muestra una gráfica en la cual, en el lado izquierdo está representado el número de células vivas [ml^{-1}] y en el lado derecho está representada la concentración de la glucosa residual [mM] respecto al tiempo de proceso [h] para la producción de MUC1-IgG2 en CHO MUC/IgG2a PH3744/25. En la misma son:

- número de células vivas y
- 0 glucosa

25 En la figura 4 está representada la concentración de glucosa y de lactato, así como la concentración de glucosa en la entrada del medio [mmol/l] con respecto al tiempo de proceso [h]. En la misma son las curvas con:

- curvas de la concentración de lactato y
- 0 curvas de la concentración de glucosa.

30 x 23,9 mmol/l de concentración de glucosa en la entrada del medio (velocidad de flujo $D = 0,035 \text{ h}^{-1}$).

En la figura 5 está representada la concentración de MUC1-IgG2a [$\mu\text{g}/\text{ml}$] sobre el lado izquierdo, así como $q_{\text{MUC1-IgG2a}}$ [$\mu\text{g}/(\text{células hE9})$] sobre el lado derecho de la gráfica con respecto al tiempo [h]. En la misma son:

- productividad específica q de MUC1-IgG2a ($\mu\text{g}/\text{células hE9}$) y
- 0 concentración de MUC1-IgG2a (mg/l).

35 La figura 6 muestra el transcurso de la densidad de células vivas (cv) de células CHO/MUC2-GFP y la velocidad de flujo del medio (D) con respecto al tiempo de proceso (h), en un reactor de perfusión. En la misma son:

- la velocidad de flujo del medio (1/h) y
- la densidad de las células vivas (1/ml).

40 La figura 7 muestra la productividad específica de MUC2-GFP-C-term ($q_{\text{MUC2-GFP-C-term}}$) y DGL con respecto al tiempo de proceso en un reactor de perfusión. En la misma son:

- la productividad específica (nmol/células hE9),
- DGL (*degree of glucose limitation*, grado de limitación de glucosa).

45 La figura 8 muestra una gráfica en la cual, en el lado izquierdo está representado el número de células vivas [ml^{-1}] y en el lado derecho está representada la concentración de la glucosa residual [mM] con respecto al tiempo de proceso [h] para la producción de MUC2-GFP-C-term en CHO MUC/IgG2a PH3744/25. En la misma son:

- número de células vivas y
- 0 glucosa.

50 En la figura 9 está representada la concentración de glucosa y de lactato, así como la concentración de glucosa en la entrada del medio [mmol/l] con respecto al tiempo de proceso [h]. En la misma son las curvas con:

- curvas de la concentración de lactato y

0 curvas de la concentración de glucosa.

x 23,9 mmol/l de concentración de glucosa en la entrada del medio (velocidad de flujo $D = 0,035 \text{ h}^{-1}$).

5 En la figura 10 está representada la concentración de MUC2-GFP-C-term [nM] sobre el lado izquierdo así como $q_{\text{MUC2-GFP-C-term}}$ [nmol/(células $\text{h}^{\text{E}9}$)] sobre el lado derecho de la gráfica con respecto al tiempo [h]. En la misma son:

- productividad específica q de MUC2-GFP-C-term (nmol/células $\text{h}^{\text{E}9}$) y
- ◇ concentración de MUC2-GFP-C-term (nM).

15 La figura 1 muestra un modo de procedimiento a modo de ejemplo correspondiente a la alimentación de glucosa. En un cultivo de perfusión continuo se alimenta una cantidad constante de glucosa. En el ejemplo mostrado esto se logra mediante una velocidad de flujo constante del medio, siendo constante la concentración de glucosa en la entrada del medio. La velocidad de flujo del medio no aumenta al aumentar la densidad de células vivas. El procedimiento empezó como procedimiento discontinuo antes de empezar el modo de procedimiento continuo.

20 La figura 2 muestra que en este modo de procedimiento, el DGL disminuye en el transcurso del procedimiento, y finalmente alcanza un valor por debajo de 0,4. Mientras esto sucede, aumenta la productividad específica y alcanza finalmente un valor que es alrededor de 4 veces mayor que aquél antes de quedar por debajo del valor de DGL de 0,4.

25 A partir de la figura 3 se desprende que en el procedimiento según la invención la densidad de células vivas corre hacia un valor máximo el cual puede mantenerse a continuación, mientras que la concentración de glucosa residual en el transcurso del ensayo tiende a cero. Esto ocurre aunque la glucosa se alimente. Durante la disminución de la concentración de glucosa residual empieza a disminuir la tasa de absorción específica de glucosa de los organismos. Mientras tanto, el número de células vivas puede todavía aumentar. Paralelamente al retroceso de la tasa de absorción específica de glucosa, disminuye también la tasa de formación específica de lactato, lo cual conduce en primer lugar a un aumento ralentizado, y a continuación a una caída de la concentración de lactato en el recipiente de cultivo. Finalmente la concentración de lactato en el recipiente de cultivo va hacia cero, como se desprende de la figura 4. Existe por lo tanto una clara modificación del metabolismo celular. Como se desprende de la figura 5, unido a la modificación del metabolismo celular tiene lugar un aumento de la productividad específica de aproximadamente 4 veces con respecto al momento anterior a la modificación del metabolismo celular. El aumento de la productividad específica con por lo menos las densidades de las células constantes o incluso todavía crecientes, durante la fase descrita, conduce finalmente a un marcado aumento del título del producto en el sobrenadante del cultivo, como se desprende de la figura 5, y con ello a un aumento del rendimiento espacio/tiempo.

La tabla 1 muestra datos de la fermentación de MUC1-IgG2a.

40 Análogamente a las figuras 1 a 5, las figuras de 6 a 10 describen los resultados del empleo del procedimiento según la invención con las células CHO MUC2-GFP-C-term.

45 La tabla 2 muestra datos de la fermentación de MUC2-GFP-C-term. De manera técnica de producción puede hacerse funcionar el procedimiento según la invención aparte de según el procedimiento de perfusión que se acaba de describir, también como alimentación por partidas (procedimiento de alimentación).

50 En un funcionamiento de alimentación por partidas, el cultivo de producción es abastecido una vez o repetidas veces respectivamente por partidas o de manera continua con medio que contiene glucosa o una solución de glucosa separada, de forma y manera que el DGL queda preferentemente por debajo del valor de 0,5, con particular preferencia por debajo de 0,4 y todavía con mayor preferencia por debajo de 0,3. Es posible también aquí una alimentación por partidas repetitiva.

55 Tanto en el modo de procedimiento por perfusión como también en la alimentación por partidas se inicia el procedimiento como procedimiento discontinuo.

Tabla 1:

Tiempo de proceso	cv	D	Alimentación de glucosa	Glucosa	Lactato	MUC1-IgG2a	gMUC1-IgG2a	DGL
h	1/mol	1/h	mmol/l	mmol/l	mmol/l	µg/ml	µg/(h ^E 9)	
0	2,23E+05	0	0	22,07	2,5	2,62		
16,63	2,83E+05	0	0	20,89	5,1	3,59	0,21	0,92
40,52	6,48E+05	0	0	16,75	10,84	5,77	0,14	0,99
68	1,78E+06	0	0	8,74	20,1	14,21	0,17	0,61

ES 2 567 161 T3

Tiempo de proceso	cv	D	Alimentación de glucosa	Glucosa	Lactato	MUC1-IgG2a	gMUC1-IgG2a	DGL
94	2,14E+06	0,035	23,89	8,08	19,48	15,49	0,30	1,00
120	3,70E+06	0,035	23,89	5,84	22,35	18,02	0,22	0,72
136,5	4,68E+06	0,035	23,89	4,30	22,02	19,95	0,17	0,62
163,5	7,02E+06	0,035	23,89	3,17	22,66	22,67	0,14	0,40
187,5	6,96E+06	0,035	23,89	1,79	20,77	22,44	0,11	0,44
215,5	8,85E+06	0,035	23,89	1,04	17,46	28,24	0,13	0,35
264,75	1,30E+07	0,035	23,89	-	8,45	67,03	0,22	0,24
287	1,54E+07	0,035	23,89	-	5,25	89,42	0,22	0,20
310	1,64E+07	0,035	23,89	-	2,77	113,28	0,25	0,19
331	2,27E+07	0,035	23,89	-	1,24	133,80	0,24	0,14
352,4	1,45E+07	0,035	23,89	-	0,82	152,87	0,29	0,21
376,3	1,42E+07	0,035	23,89	-	0,53	182,52	0,45	0,22
404,4	1,58E+07	0,035	23,89	-	0,44	218,51	0,51	0,20
428	1,78E+07	0,035	23,89	-	0,58	241,75	0,50	0,17
448,4	2,08E+07	0,035	23,89	-	0,55	305,39	0,55	0,15
473,63	1,35E+07	0,035	23,89	-	0,55	290,52	0,60	0,23
496,8	9,30E+06	0,035	23,89	-	0,51	274,94	0,85	0,33
521,82	1,53E+07	0,035	23,89	-	0,56	301,12	0,87	0,20

Datos para la fermentación de MUC1-IgG2a

Tabla 2:

Tiempo de proceso	Número de células vivas	D	Alimentación de glucosa	Glucosa	Lactato	MUC2-GFP-Cterm	Producto q	DGL
h	1/ml	1/h	mmol/l	mmol/l	mmol/l	nM	nmol h*E9	
0,5	7,50E+04	0	0	21,37	3,12	0,00		
106	1,80E+06	0	0	4,25	21,1	1,66	0,01	0,44
106,01		0,035	23,89			8,92		
130	2,20E+06	0,035	23,89	9,36		7,71	0,14	0,66
154	2,90E+06	0,035	23,89	8,32	18,23	10,72	0,05	1,00
182,38	6,83E+06	0,035	23,89	5,58	19,28	14,08	0,17	0,53
212,9	1,19E+07	0,035	23,89	1,65	18,78	26,15	0,12	0,33
237,2	1,44E+07	0,035	23,89	0,54	13,84	38,37	0,11	0,26
254	1,48E+07	0,035	23,89	0,52	9,81	50,08	0,13	0,24
278	120E+07	0,035	23,89	-	5,19	65,63	0,20	0,35
302	1,40E+07	0,035	23,89	-	2,05	81,53	0,27	0,29
326	1,20E+07	0,035	23,89	-	0,7	88,03	0,30	0,34
349,9	2,16E+07	0,035	23,89	-	0,33	104,60	0,28	0,19
374	1,20E+07	0,035	23,89	-	0,26	104,03	0,28	0,34
		0,035	23,89	-		84,47		
		0,035	23,89	-		75,16		
446	1,10E+07	0,035	23,89	-	0,19	64,81		0,37
470	1,10E+07	0,035	23,89	-	0,53	52,36		0,37
494	1,40E+07	0,035	23,89	-	0,32	69,63	0,24	0,29
518	1,30E+07	0,035	23,89	-		79,34	0,26	0,32
		0,035	23,89	-		93,94		
		0,035	23,89	-	0,35	104,57		

ES 2 567 161 T3

Tiempo de proceso	Número de células vivas	D	Alimentación de glucosa	Glucosa	Lactato	MUC2-GFP-Cterm	Producto q	DGL
595,8	1,01 E+07	0,035	23,89	-	0,25	113,89		
Datos para la fermentación de MUC2-GFP-Cterm								

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el cultivo de células CHO para la producción de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas, caracterizado por que se cultiva una célula CHO que produce sustancias con limitación de glucosa DGL,
 5
 siendo el grado de limitación de glucosa $DGL = qGlc/qGlc_{m\acute{a}x}$ con $qGlc$ = tasa de consumo de glucosa específica observada en el momento y $qGlc_{m\acute{a}x}$ = máxima tasa de consumo de glucosa específica conocida para estas células CHO, mayor que el DGL que conduce al mantenimiento exclusivo, $DGL_{mantenimiento}$, de la célula CHO y es $\leq 0,5$,
 10
 siendo el $DGL_{mantenimiento} = qGlc_{mantenimiento}/qGlc_{m\acute{a}x}$, con $qGlc_{mantenimiento}$ = tasa de consumo de glucosa específica observada durante el metabolismo de mantenimiento puro y $qGlc_{m\acute{a}x}$ = máxima tasa de consumo de glucosa específica conocida para estas células CHO, siendo la cantidad de glucosa suministrada no superior al 50 % de la que puede consumir como máximo el número de células esperado máximo sin limitación de glucosa,
 en el que se usa un medio que contiene glucosa que con respecto a otros componentes de sustancias nutritivas no está limitado antes del inicio de la limitación de glucosa, en el que el procedimiento se inicia como procedimiento discontinuo y se continúa como procedimiento continuo, en el que antes del inicio del procedimiento continuo se hace funcionar el cultivo como procedimiento discontinuo.
 15
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el DGL es $\leq 0,4$ o $\leq 0,3$.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la cantidad de glucosa suministrada no es superior al 35 % de la que puede consumir como máximo el número de células esperado máximo sin limitación de glucosa.
 20
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la glucosa se suministra separadamente de otros sustratos.
 25
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que se efectúa en un intervalo de pH de 6,7 - 7,7.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que se efectúa en un intervalo de temperatura entre 35 °C y 38,5 °C.
 30
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que se hace funcionar en modo de procedimiento continuo con por lo menos una separación parcial de las células.
 35
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que se efectúa con células que no producen de manera acoplada con el crecimiento.
9. Procedimiento para el cultivo de células CHO para la producción de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas, caracterizado por que se cultiva una célula CHO que produce sustancias con limitación de glucosa DGL,
 40
 siendo el grado de limitación de glucosa $DGL = qGlc/qGlc_{m\acute{a}x}$ con $qGlc$ = tasa de consumo de glucosa específica observada en el momento y $qGlc_{m\acute{a}x}$ = máxima tasa de consumo de glucosa específica conocida para estas células CHO, mayor que el DGL que conduce al mantenimiento exclusivo, $DGL_{mantenimiento}$, de la célula CHO y es $\leq 0,5$,
 45
 siendo el $DGL_{mantenimiento} = qGlc_{mantenimiento}/qGlc_{m\acute{a}x}$, con $qGlc_{mantenimiento}$ = tasa de consumo de glucosa específica observada durante el metabolismo de mantenimiento puro y $qGlc_{m\acute{a}x}$ = máxima tasa de consumo de glucosa específica conocida para estas células CHO, siendo la cantidad de glucosa suministrada no superior al 50 % de la que puede consumir como máximo el número de células esperado máximo sin limitación de glucosa,
 en el que se usa un medio que contiene glucosa que con respecto a otros componentes de sustancias nutritivas no está limitado antes del inicio de la limitación de glucosa, en el que el procedimiento está constituido por un modo de procedimiento discontinuo y un modo de procedimiento de alimentación por partidas, en el que el procedimiento se inicia como procedimiento discontinuo y se continúa como procedimiento de alimentación por partidas.
 50
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que el DGL es $\leq 0,4$ o $\leq 0,3$.
 55
11. Procedimiento según la reivindicación 9 o 10, caracterizado por que la cantidad de glucosa suministrada no es superior al 35 % de la que puede consumir como máximo el número de células esperado máximo sin limitación de glucosa.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por que la glucosa se suministra separadamente de otros sustratos.
 60
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado por que se efectúa en un intervalo de pH de 6,7 - 7,7.
 65

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizado por que se efectúa en un intervalo de temperatura entre 35 °C y 38,5 °C.

5 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 14, caracterizado por que se efectúa con células que no producen de manera acoplada con el crecimiento.

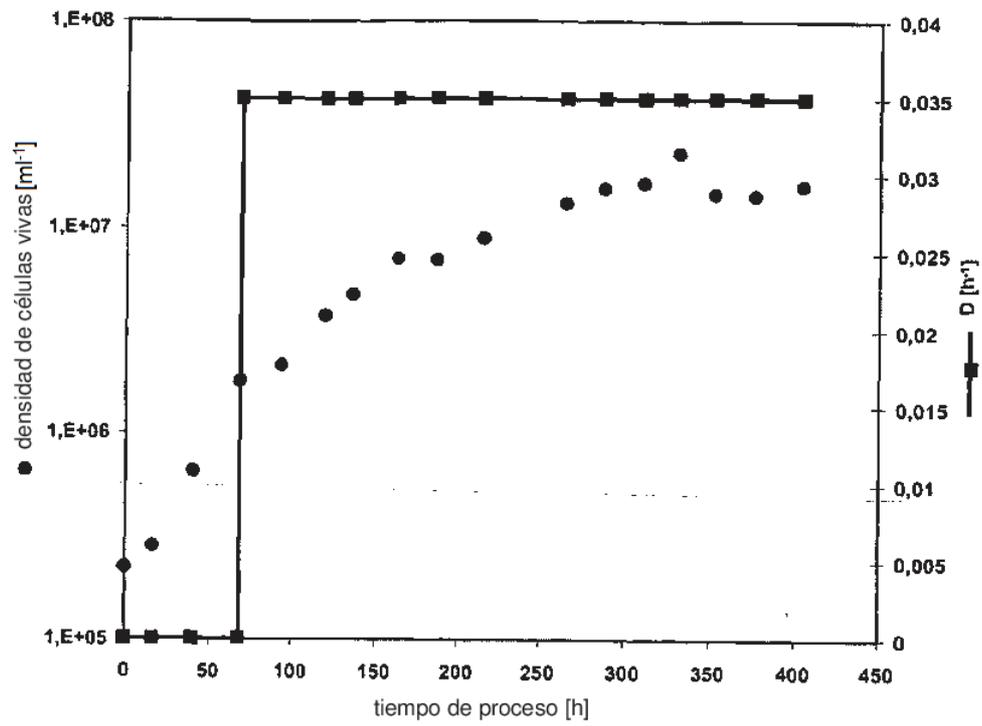


Fig. 1

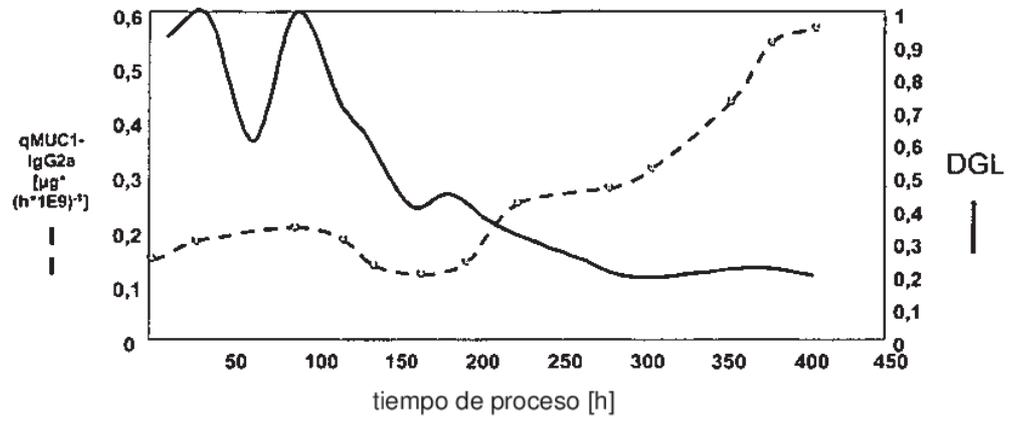


Fig. 2:

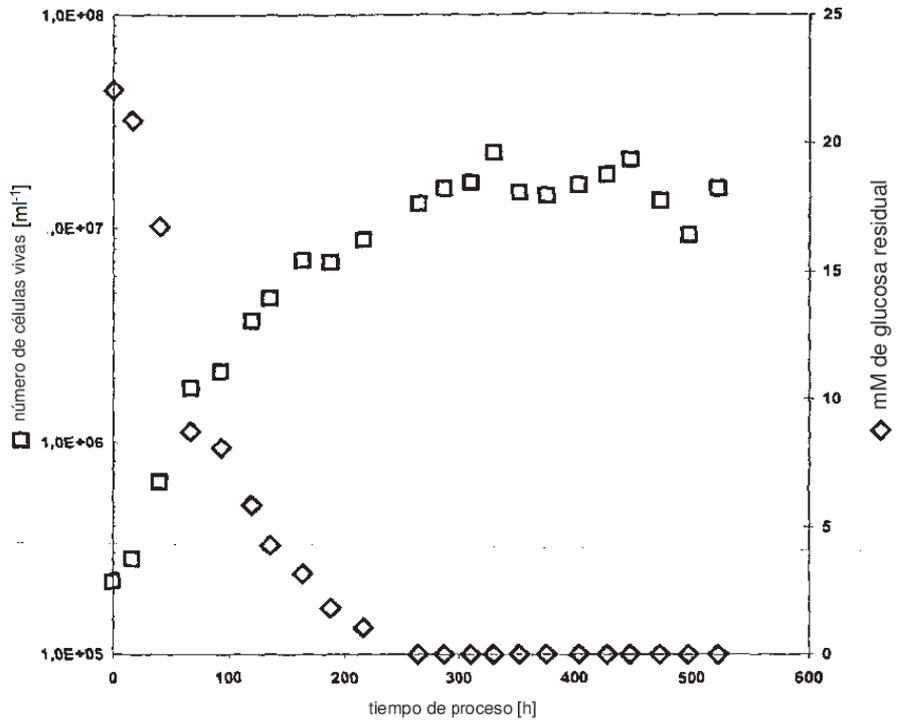


Fig. 3

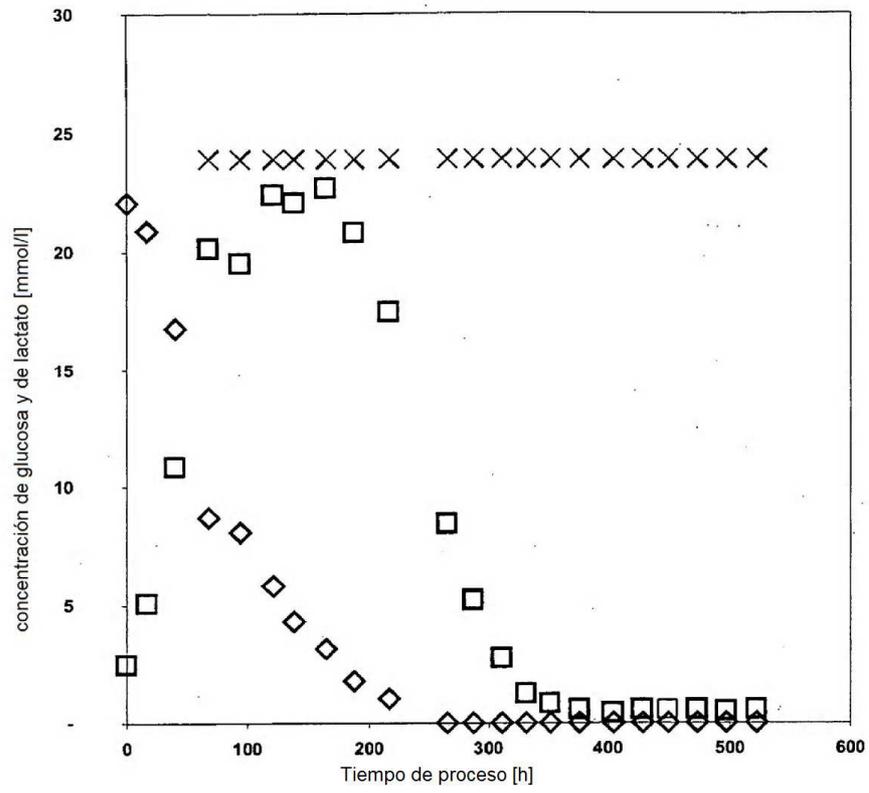


Fig. 4

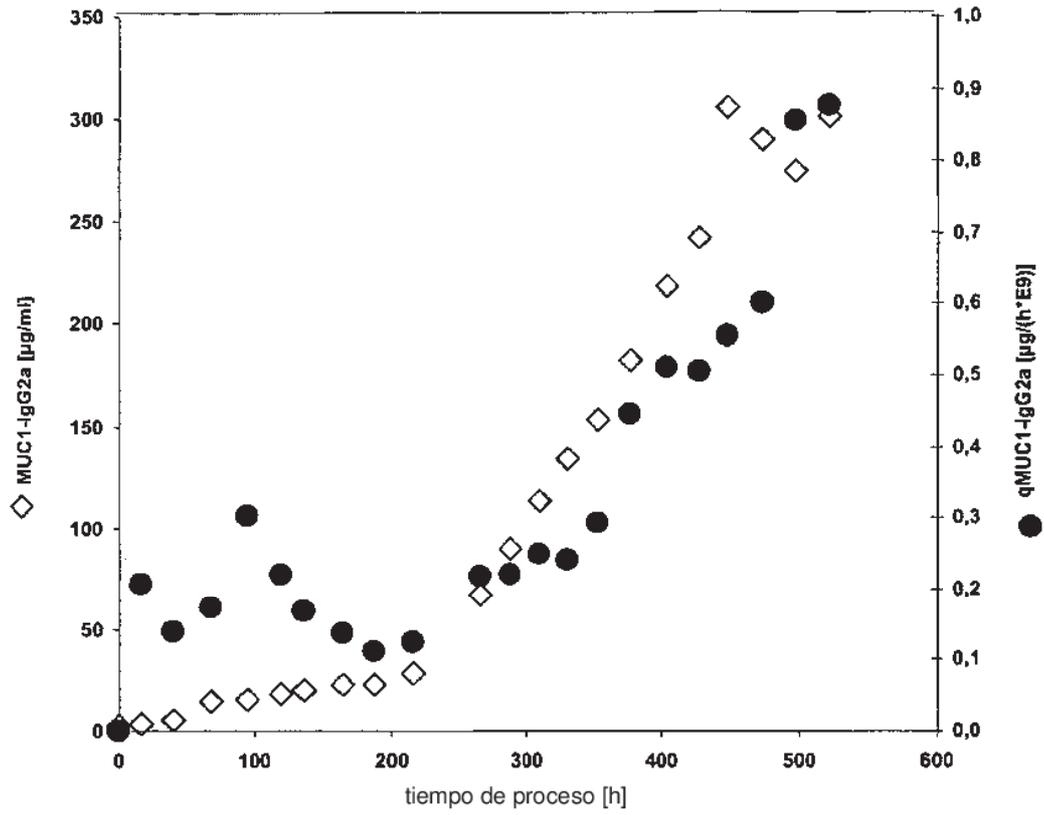


Fig. 5

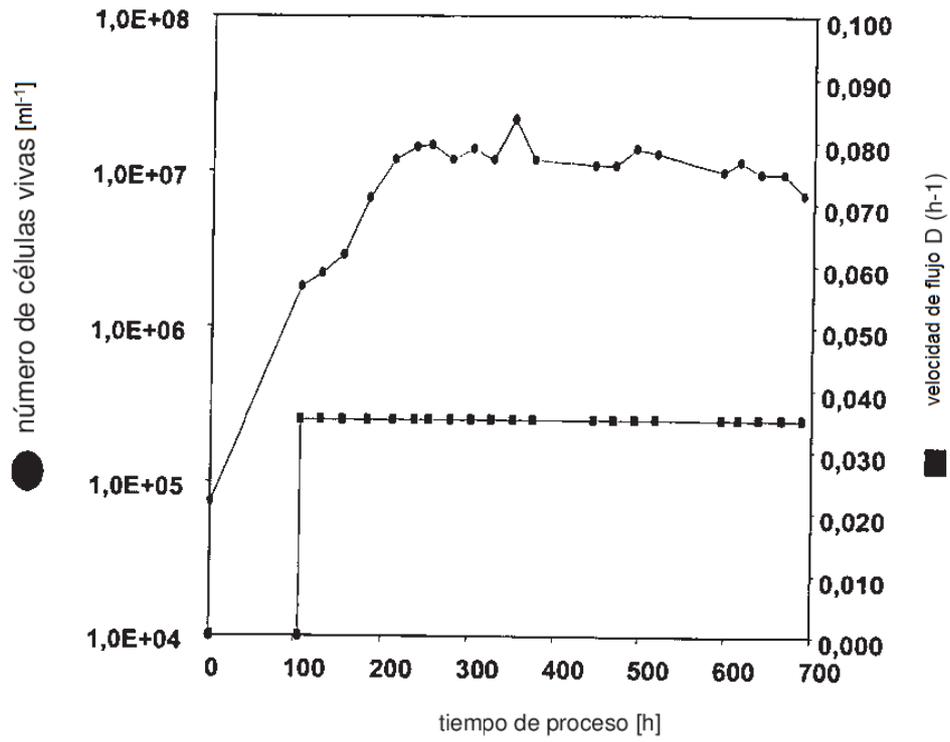


Fig. 6

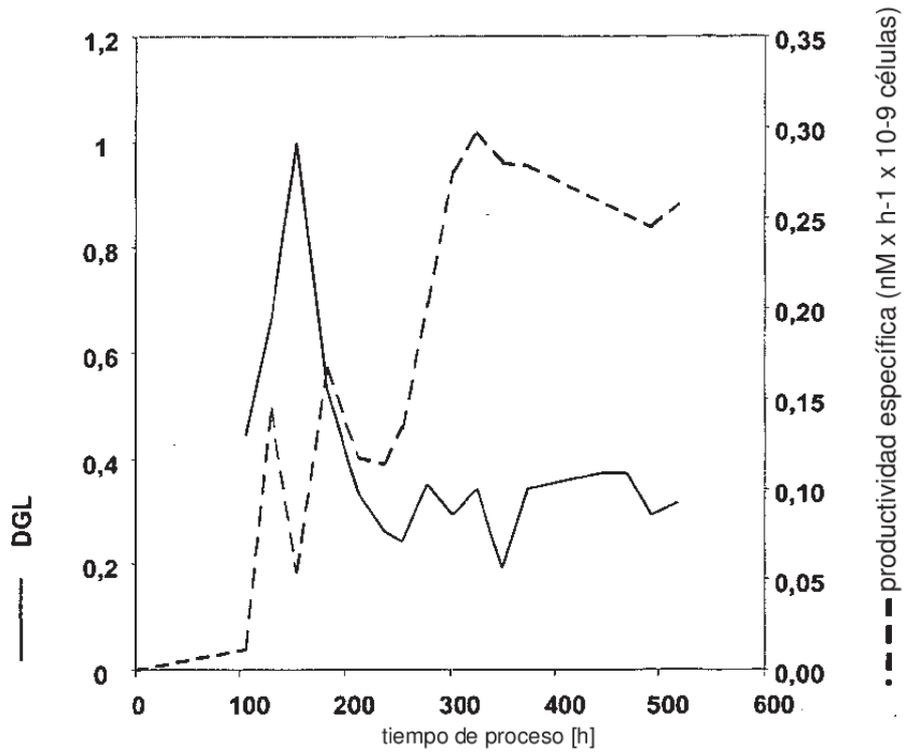


Fig. 7

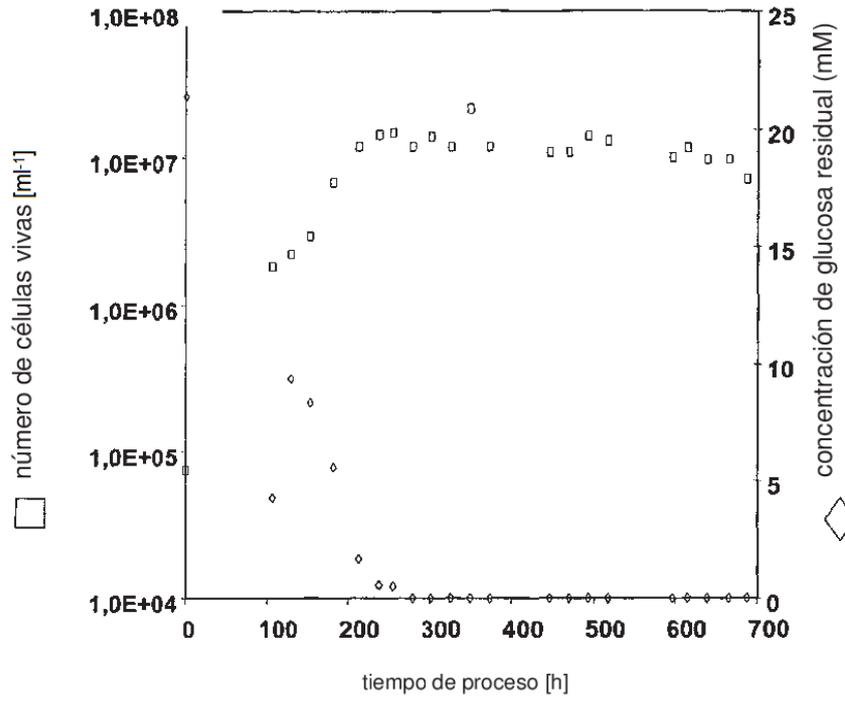


Fig. 8

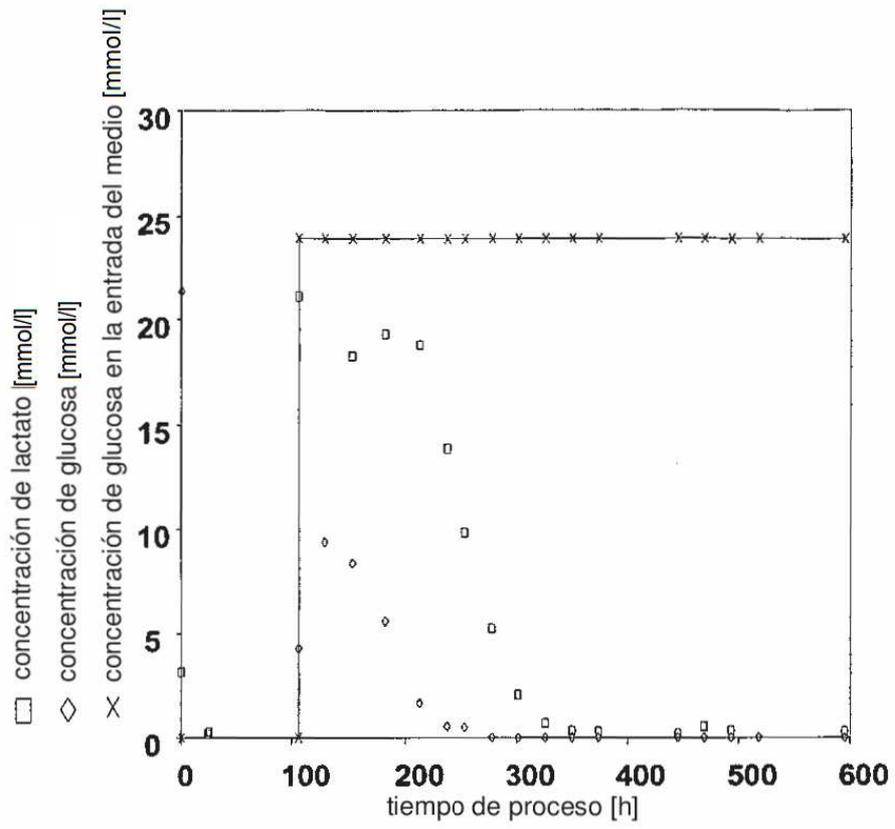


Fig. 9

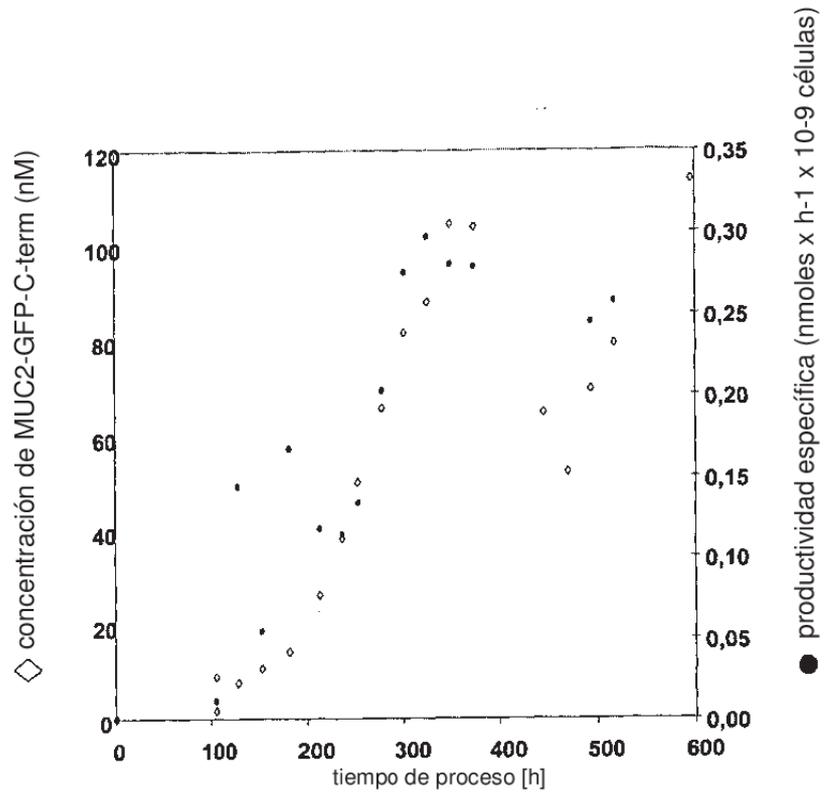


Fig. 10