

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 923**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 27/416 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2016** **PCT/EP2016/076173**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017** **WO17072346**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2016** **E 16790330 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020** **EP 3368653**

54 Título: **Identificación de desviaciones de calibración de dispositivos de medición de pH**

30 Prioridad:

30.10.2015 EP 15192389

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

02.03.2021

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstraße 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KLINGER, CHRISTIAN;

GREPPMAIR, KATRIN y

EISENKRAETZER, DETLEF

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 808 923 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

Identificación de desviaciones de calibración de dispositivos de medición de pH

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de uso y calibración de dispositivos de medición de pH, y más particular a la identificación de errores de calibración y/o efectos de desplazamiento de pH resultantes de un procedimiento de muestreo.

10

Antecedentes y técnica relacionada

15

El uso de dispositivos de medición de pH calibrados con exactitud es útil o crucial en numerosas situaciones, incluyendo el trabajo de laboratorio químico o biológico, para hacer funcionar biorreactores, para supervisar reactores de cosecha, etc.

20

Los biorreactores se usan comúnmente para llevar a cabo procesos químicos, en particular procesos realizados por organismos vivos, de manera controlada, por ejemplo, para obtener un compuesto químico, por ejemplo, un péptido, proteína u otro tipo de sustancia química particular. Un objetivo común es hacer funcionar el biorreactor de una manera que los microorganismos o células puedan realizar su función deseada con una producción limitada de impurezas y/o de una manera rentable y más rápida. Las condiciones ambientales en el interior del biorreactor, tales como la temperatura, concentraciones de nutrientes, pH y gases disueltos, entre otros parámetros, típicamente se eligen de modo que se optimice la proliferación y productividad de los organismos.

25

Para determinar si el estado de un biorreactor y/o el estado de un cultivo celular en un biorreactor está en un estado deseado, por ejemplo, un estado correspondiente a un estado de un biorreactor de referencia en un momento dado en el tiempo cuando se realiza un proyecto de cultivo celular, se mide repetidamente el valor de pH. En caso de que el valor de pH esté fuera de un intervalo de valores de pH deseado, se pueden adaptar diversos parámetros de los biorreactores (tales como tasa de alimentación, tasa de aireación, temperatura, tasa de agitación o similares) para cambiar el estado del biorreactor de una manera que el valor de pH medido en el medio se encuentre dentro del intervalo de valores de pH deseado.

30

35

Se pueden establecer diversos parámetros de control de un biorreactor dependiendo de un valor de pH medido actualmente en el medio de un biorreactor. La configuración correcta de dichos parámetros determina si un cultivo celular particular se cultivará en condiciones muy similares/aproximadamente idénticas a un cultivo de referencia en otro biorreactor. Por lo tanto, para sincronizar el estado de un biorreactor con el estado de otro biorreactor (de referencia), es de vital importancia que los dispositivos de medición de pH de los dos biorreactores comparados emitan el mismo valor de pH para los medios que tienen el mismo valor de pH.

40

Existen muchos otros contextos de casos de uso donde la determinación del valor de pH correcto es de vital importancia. Por ejemplo, al final de un proyecto de cultivo celular, el cultivo celular y/o sus productos se pueden almacenar en un depósito de cosecha antes de que se procesen adicionalmente para extraer los productos de cultivo celular deseados. Es necesario supervisar estrechamente los depósitos de cosecha para evitar o al menos identificar de inmediato cualquier infección u otra modificación de las condiciones dentro del depósito de cosecha que podría dar como resultado una degradación de su contenido. Por lo tanto, el valor de pH en los depósitos de cosecha se mide repetidamente tomando muestras y midiendo el valor de pH de las muestras.

45

A menudo, se usan dispositivos de medición de pH externos al depósito para medir el valor de pH de una muestra del medio contenido en un depósito, por ejemplo, un biorreactor o un depósito de cosecha.

50

Por ejemplo, Heather Evans *et al.*: "Dealing with Disparity in On-line and Off-line pH measurements Genentech found pH drift in its on-line measurements for a cell culture process, and continues to investigate its cause", 1 de enero de 2006, documento XP055271377, se refiere a la detección de problemas en las mediciones de pH en biorreactores con medidores de pH fuera de línea. Para hacer funcionar estos medidores de pH fuera de línea, se toman muestras del depósito de cultivo y se transportan a un punto de medición.

55

Sin embargo, el procedimiento de extracción de muestras de medio conlleva el riesgo de una infección del depósito. Además, el valor de pH medido en una muestra se puede desviar del valor de pH real del medio dentro del depósito debido a los denominados "efectos de desplazamiento". Se pueden provocar efectos de desplazamiento, por ejemplo, durante el procedimiento de extracción de la muestra y su transporte al dispositivo de medición de pH, ya que la temperatura de la muestra, la presión ambiental o la composición del aire ambiental pueden diferir de los parámetros respectivos dentro del depósito. Esto puede dar como resultado un valor de pH medido en la muestra que difiere, debido a los efectos de desplazamiento, significativamente del valor de pH real del medio en el depósito. Como consecuencia, el valor de pH medido en la muestra no refleja con exactitud el estado actual en el depósito.

60

65

Los dispositivos de medición de pH calibrados incorrectamente son otra fuente de error potencial: típicamente, los

dispositivos de medición de pH se calibran con soluciones de referencia disponibles comercialmente que tienen un valor de pH definido. Este enfoque típicamente requiere la extracción y reintroducción del dispositivo de medición de pH del depósito. Después de la reintroducción del dispositivo de medición de pH, el depósito y el dispositivo de medición de pH contenido en el mismo se deben esterilizar en autoclave. Este procedimiento puede tener un efecto en el dispositivo de medición de pH ya calibrado, lo que da como resultado un dispositivo de medición de pH en el depósito que podría indicar un valor de pH diferente para la solución de referencia que antes de la esterilización en autoclave. Incluso en caso de que el dispositivo de medición de pH no se haya visto afectado por el procedimiento de esterilización en autoclave, no hay garantía de que el dispositivo de medición de pH no se haya visto afectado por la esterilización en autoclave. Como resultado, es posible que los valores de pH medidos no se consideren fiables y se puede realizar una recalibración del medidor de pH interno del depósito para calibrar el medidor de pH interno del depósito usando un medidor de pH de referencia externo al depósito que mide el pH en una muestra del medio del depósito. Sin embargo, debido a los efectos de desplazamiento durante el procedimiento de muestreo, esto tampoco garantizará que el medidor de pH interno del depósito esté calibrado correctamente.

La toma de muestras regularmente para realizar mediciones de pH fuera de línea es onerosa e incrementa el riesgo de infectar el biorreactor con gérmenes no deseados.

Heather Evans *et al.* en "Dealing with Disparity in On-line and Off-line pH Measurements Genentech found pH drift in its on-line measurements for a cell culture process; and continues to investigate its cause"; 1 de enero de 2006 (01-01-2006), documento XP055271377, analiza un estudio de caso que implica el control de pH en un procedimiento de cultivo celular a gran escala.

Michael J. Gramer *et al.* en "a semi-empirical mathematical model useful for describing the relationship between carbon dioxide, pH, lactate and base in a bicarbonate-buffered cell-culture process" en BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, vol. 47; n.º 4; 15 de marzo de 2007 (15-03-2007), página 197, documento XP55270826, describen una relación cuantitativa entre los factores de estado principales que afectan al control de pH en un medio tamponado con bicarbonato en base a la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

Sumario

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema y procedimiento mejorados para determinar si un dispositivo de medición de pH se ve afectado por un problema de medición de pH y para recalibrar un medidor de pH como se especifica en las reivindicaciones independientes. Los modos de realización de la invención se dan en las reivindicaciones dependientes. Los modos de realización de la presente invención se pueden combinar libremente entre sí si no son mutuamente excluyentes. Los modos de realización de la invención pueden aprovechar la facilidad con la que se puede medir una concentración de CO₂ en el volumen de aire en un depósito para mejorar y facilitar la identificación de problemas de medición de pH y problemas de calibración. De acuerdo con un aspecto beneficioso, se pueden usar las concentraciones de CO₂ medidas en dos o más depósitos diferentes para identificar las desviaciones de medición de pH de los dispositivos de medición de pH que están acoplados de forma operativa a los diferentes depósitos.

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para determinar si un primer dispositivo de medición de pH acoplado de forma operativa a un primer depósito se ve afectado por un problema de medición de pH. El problema de medición de pH es que el primer dispositivo de medición de pH está calibrado de forma diferente a un segundo dispositivo de medición de pH acoplado de forma operativa a un segundo depósito. Por ejemplo, esta situación puede ser problemática si el segundo depósito es un biorreactor de referencia y el primer depósito es otro biorreactor en el que se comparará su estado y se sincronizará con el estado del biorreactor de referencia. El procedimiento comprende:

- recibir por una unidad de comparación, una primera concentración de CO₂ y un primer valor de pH, siendo la primera concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un primer volumen de gas por encima de un medio (M1) en el primer depósito, midiéndose la primera concentración de CO₂ y el primer valor de pH en un primer tiempo, siendo el primer tiempo un tiempo cuando el medio en el primer depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el primer volumen de gas a una temperatura y presión predefinidas, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, siendo el primer valor de pH un valor medido proporcionado por el primer dispositivo de medición de pH (108; 146);

- recibir, por la unidad de comparación, una segunda concentración de CO₂ y un segundo valor de pH, siendo la segunda concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un segundo volumen de gas por encima del mismo tipo de medio (M1) contenido en el segundo depósito, midiéndose la segunda concentración de CO₂ y el segundo valor de pH en un segundo tiempo, siendo el segundo tiempo un tiempo cuando el medio en el segundo depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el segundo volumen de gas a la temperatura y presión predefinidas, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, siendo el segundo valor de pH un valor medido proporcionado por el segundo dispositivo de medición de pH;

- comparar, por la unidad de comparación, los primer y segundo valores de pH y comparar las primera y segunda concentraciones de CO₂ para determinar si el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por el problema

de medición de pH.

De acuerdo con los modos de realización, la determinación de que el primer dispositivo de medición de pH tiene un problema de medición de pH se realiza en caso de que:

– las primera y segunda concentraciones de CO₂ sean idénticas y los primer y segundo valores de pH difieran entre sí en más de un valor umbral; o

– los primer y segundo valores de pH sean idénticos y las primera y segunda concentraciones de CO₂ difieran entre sí en más de otro valor umbral; o

– un primer valor de datos difiera de un segundo valor de datos en más de otro umbral, derivándose el primer valor de datos del primer valor de pH y la primera concentración de CO₂, derivándose el segundo valor de datos del segundo valor de pH y la segunda concentración de CO₂.

El primer depósito puede ser, por ejemplo, un biorreactor o un depósito de cosecha. El segundo depósito puede ser, por ejemplo, un biorreactor, en particular un biorreactor de referencia, o un depósito de cosecha, en particular un depósito de cosecha de referencia.

Los modos de realización de la invención pueden ser ventajosos ya que permiten comparar con mayor exactitud los valores de pH de los medios en dos o más depósitos, por ejemplo. un depósito de referencia y uno o más depósitos supervisados o controlados. El perfil de pH de referencia del depósito de referencia se puede obtener varios días, semanas o años antes de obtener los valores de medición en el/los depósito(s) que se va(n) a supervisar. De forma alternativa, los primer y segundo depósitos se pueden hacer funcionar de manera básicamente simultánea. En otro aspecto beneficioso, se pueden omitir las mediciones fuera de línea del pH, evitando de este modo la contaminación de los depósitos y evitando una comparación inexacta de los valores de pH ya que los efectos de muestreo pueden crear una variabilidad significativa del valor de pH medido.

De acuerdo con otro aspecto beneficioso, las concentraciones de CO₂ medidas en un depósito particular se pueden usar para calcular un valor de pH absoluto, esperado y pueden permitir identificar cualquier desviación del valor de pH realmente medido del valor de pH esperado. Dicha desviación puede ser un indicador de un problema de medición de pH, por ejemplo, un problema de calibración.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para determinar si un primer dispositivo de medición de pH acoplado de forma operativa a un primer depósito se ve afectado por un problema de medición de pH. El problema es que el primer dispositivo de medición de pH está calibrado incorrectamente (y, por tanto, no solo produce un valor de pH que es incorrecto en relación con un valor de pH proporcionado por un dispositivo de medición de pH de referencia, sino que produce un valor de pH que es incorrecto en términos absolutos). El procedimiento comprende:

– recibir, por una unidad de comparación, una primera concentración de CO₂ y un primer valor de pH, siendo la primera concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un primer volumen de gas por encima de un medio (M1) en el primer depósito, midiéndose la primera concentración de CO₂ y el primer valor de pH en un primer tiempo, siendo el primer tiempo un tiempo cuando el medio en el primer depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el primer volumen de gas a una temperatura y presión predefinidas, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, siendo el primer valor de pH un valor medido proporcionado por el primer dispositivo de medición de pH;

– calcular, por la unidad de comparación, un segundo valor de pH como función de la primera concentración de CO₂, siendo el segundo valor de pH el valor de pH previsto para dicho tipo de medio (M1) cuando dicho medio está en estado de equilibrio pH-CO₂ con un segundo volumen de gas por encima de dicho medio (M1) a la temperatura y presión predefinidas, teniendo el segundo volumen de gas en dicho equilibrio una segunda concentración de CO₂ que es idéntica a la primera concentración de CO₂, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular;

– comparar, por la unidad de comparación, los primer y segundo valores de pH para determinar si el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por el problema de medición de pH.

Esto puede ser ventajoso ya que este procedimiento permite determinar, siempre que se conozcan algunas propiedades del medio, el valor de pH absoluto correcto del medio usando la concentración de CO₂ en el volumen de aire del depósito que se puede medir en el gas liberado como entrada. Comparando el valor de pH exacto calculado derivado de la concentración de CO₂ con el valor de pH realmente medido, es posible detectar errores de calibración.

De acuerdo con los modos de realización, la unidad de comparación emite una señal de advertencia en caso de que se determine que el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por el problema de medición de pH. Esto puede permitir que un operario tome las medidas apropiadas, por ejemplo, recalibrar el dispositivo de medición de pH, reemplazar el dispositivo de medición de pH, etc.

Cálculo de un valor de pH esperado usando la concentración de CO₂ del gas liberado

De acuerdo con algunos ejemplos relacionados con el uso de medios "minimalistas", por ejemplo, soluciones salinas que están básicamente libres de sustancias que actúan como un tampón, el cálculo de un valor de pH en base a dióxido de carbono en la fase gaseosa en sistemas tamponados con carbonato se puede realizar como sigue:

La concentración de dióxido de carbono que está disuelta en un líquido es proporcional a la presión parcial de dióxido de carbono (pCO₂) en la fase gaseosa y se puede calcular usando los factores proporcionales respectivos. Los factores proporcionales dependen del líquido y la temperatura, así como de la presión.

Por ejemplo, el coeficiente de solubilidad para CO₂ en diversos líquidos es conocido y se puede derivar de la literatura o se puede determinar experimentalmente. El coeficiente de solubilidad en sangre a 37 °C es de aproximadamente 0,0304 mmol × l⁻¹ × mmHg⁻¹ [Löffler, G., Petrides, P.E., Physiologische Chemie, Springer-Verlag, 2013], de acuerdo con Sazonov y Shaw, el coeficiente de Bunsen se define como el volumen de gas saturante reducido 273,15 y 100 kPa (1 bar), que se absorbe por unidad de volumen de disolvente puro a la temperatura de medición y presión parcial de 100 kPa (1 bar). La dimensión es, por lo tanto, volumen/volumen o adimensional. Este coeficiente se basa en la Ley de Henry, que enuncia que en equilibrio la presión parcial de un gas es directamente proporcional a la concentración de este gas que está disuelto en una solución correlacionada. Los coeficientes de solubilidad dependen de la solución respectiva [Gros, J.B., Dussap, C.G., Catté, M., Estimation of O₂ and CO₂ solubility in microbial culture media. Biotechnology Progress 1999, 15, 923-927].

Si el coeficiente de solubilidad de un medio es conocido, la concentración de dióxido de carbono disuelto se puede calcular por las concentraciones de dióxido de carbono en la fase gaseosa. Las concentraciones en la fase gaseosa, por ejemplo, en biorreactores, se pueden medir directamente usando un analizador de gas liberado.

Equilibrios de dióxido de carbono y ácido carbónico-base:

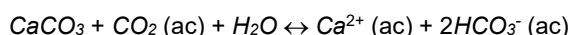
Ecuación 1 $\text{CO}_{2(g)} \rightarrow \text{CO}_{2(ac)}$

El CO_{2(ac)} disuelto se hidrata en agua (H₂O) para producir ácido carbónico (H₂CO₃).

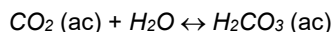
Ecuación 2 $\text{CO}_{2(ac)} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$

En soluciones acuosas a pH neutro y 37 °C, el ácido carbónico de la especie hidratada es casi inexistente; por lo tanto, ambas especies se pueden combinar en H₂CO₃* (CO_{2(ac)} + H₂CO₃ = H₂CO₃). A un pH de fermentación típico de alrededor de 7,00, H₂CO₃* se disocia en bicarbonato (HCO₃⁻) y un protón (H⁺). El carbonato (CO₃²⁻), la especie desprotonada es casi inexistente a valores de pH neutros.

El CO₂ acuoso (ac) puede disolver la piedra caliza



y puede reaccionar con el agua para formar ácido carbónico



Solo existe una pequeña fracción como ácido, por lo que la constante de disociación K es

$$K = \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3(\text{ac})]}{[\text{CO}_2(\text{ac})]} =$$

Equilibrios de dióxido de carbono y ácido carbónico-base

El CO₂ disuelto en forma de H₂CO₃ puede perder hasta dos protones a través del equilibrio ácido

Ecuación 3 $\text{H}_2\text{CO}_3^* \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \quad K_{S1} = 10^{-6,35}$

Ecuación 4 $\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+ \quad K_{S2} = 10^{-10,33}$

Las constantes de disociación K_{S1} y K_{S2}, se dan aquí para condiciones estándar (298,15 K, fuerza iónica I_c = 0 M) [Goudar, C.T.C., Matanguihan, R., Long, E., Cruz, C., *et al.*, Decreased pCO₂ accumulation by eliminating bicarbonate addition to high cell-density cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 2007, 96, 1107-1117].

Para condiciones de cultivo celular se pueden usar temperaturas de 37 °C, así como fuerzas iónicas de 0,1 M. Esto

cambiará las constantes de disociación respectivas a $10^{-6,07}$ y $10^{-10,04}$, respectivamente.

La proporción de todas las especies de dióxido de carbono ($H_2CO_3^*$), bicarbonato HCO_3^- y carbonato CO_3^{2-} se puede calcular usando la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

5

Ecuaciones de equilibrio:

Ecuación 5 $K_{S1} = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$

10

Ecuación 6 $K_{S2} = \frac{[H^+][CO_3^{2-}]}{[HCO_3^-]}$

Se pueden resolver las ecuaciones de equilibrio ácido para dar la fracción α de carbonatos respectivos como función de la concentración de protones, por consiguiente, el pH:

15

Ecuación 7 $\alpha_{H_2CO_3} = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + [H^+] * K_{S1} + K_{S1} K_{S2}}$

Ecuación 8 $\alpha_{HCO_3^-} = \frac{[H^+] * K_{S1}}{[H^+]^2 + [H^+] * K_{S1} + K_{S1} K_{S2}}$

Ecuación 9 $\alpha_{CO_3^{2-}} = \frac{K_{S1} * K_{S2}}{[H^+]^2 + [H^+] * K_{S1} + K_{S1} K_{S2}}$

20

La concentración relativa de H_2CO_3 es en efecto CO_2 (ac) en equilibrio con agua.

Cálculo de pH

25

En lo que sigue, se describirá un cálculo ejemplar de un pH esperado en base a la concentración de dióxido de carbono en agua a 37 grados Celsius:

Si la concentración de dióxido de carbono en la fase gaseosa es conocida, la concentración de dióxido de carbono disuelto se puede calcular por el uso del coeficiente de Bunsen, válido a presión atmosférica a 37 °C [Löffler, G., Petrides, P.E., Physiologische Chemie, Springer-Verlag, 2013].

30

$CO_{2ac} = 0,0304 \text{ [mmol/l*mmHg]} * \text{presión} * \text{concentración de dióxido de carbono en fase gaseosa}/100$.

La presión en este caso es la presión atmosférica de 100 kPa (750,06 mmHg).

35

Puede haber un 10 % de dióxido de carbono en la fase gaseosa de un depósito. El dióxido de carbono se da en [%]. La presión parcial de CO_2 en mmol/l (CO_{2ac} [mmol/l]) se calcula en este caso de acuerdo con $750,06 \text{ mmHg} * 10 \% / 100 = 75,006 \text{ mmHg}$. Se tiene entonces mmol/l de CO_{2ac} .

40

A continuación, la concentración de protones de la primera ecuación $H_2CO_3 \Rightarrow H^+ + HCO_3^-$ se calcula por medio de la ecuación 5 y la ecuación 6:

Concentración de H^+ de la ecuación 5 = $1,01468E-06 \text{ mmol/l}$.

45

Concentración de H^+ de la ecuación 6 = $1,06941E-10 \text{ mmol/l}$.

Por lo tanto, la concentración global de H^+ es de $1,01468E-06 \text{ mmol/l} + 1,06941E-10 \text{ mmol/l} = 1,01479E-06 \text{ mmol/l}$.

La contribución de la ecuación 5 a la concentración global de H^+ es mayor que la de la ecuación 6.

50

A continuación, se calcula el pH de acuerdo con $pH = -\log(1,01479E-06) = 5,99$.

La concentración de CO_2 en la fase gaseosa se puede calcular en base a la concentración de bicarbonato y el pH de acuerdo con:

55

$$CO_2 [\%] = \frac{\left\{ \frac{\left(\frac{[10^{-pH}]^2}{[10^{-pH}]^2 + [10^{-pH}] * K_{S1} + K_{S1} K_{S2}} \right) * C}{b} \right\}}{750,06 \text{ mmHg}} * 100$$

Siendo b el coeficiente de Bunsen de 0,0304 mmol/l*mmHg a una presión atmosférica normal de 100 kPa (750,06 mmHg), siendo el pH el valor de pH de la solución y siendo C la concentración de bicarbonato en [mmol/l].

En primer lugar, se calcula la cantidad de CO₂ disuelto en agua (ac) bajo una atmósfera de presión normal usando la Ley de Henry

Ecuación 10: $[CO_2(ac)] = K_{CO_2} * H$, en la que K_{CO_2} es la concentración de CO₂ medida en la fase gaseosa/gas liberado y H es la solubilidad de Henry.

Después de haber determinado $[CO_2(ac)]$ (ecuación 10) y K_{S1} (ecuación 5), la fórmula de la ecuación 11: $K_{S1} = \frac{[H^+]^2}{[CO_2(ac)]}$

Se puede resolver para calcular el pH como

$pH = \log_{10}([H^+]) = \log_{10}(\sqrt{K_{S1} * [CO_2(ac)]})$.

Cálculo del valor de pH esperado usando una relación específica del medio

De acuerdo con los modos de realización, la unidad de comparación, para calcular el segundo valor de pH, lee una relación específica del medio de un medio de almacenamiento de datos. La relación específica del medio es específica para el medio M1 del primer depósito e indica una relación entre el valor de pH del medio M1 y una fracción respectiva de gas CO₂ en un volumen de gas cuando dicho medio está en estado de equilibrio pH-CO₂ con dicho volumen de gas y carece de un cultivo celular. La unidad de comparación introduce la primera concentración de CO₂ en la relación específica del medio para calcular un valor de pH absoluto esperado para el medio en equilibrio pH-CO₂ a la temperatura y presión predefinidas y en ausencia de un cultivo celular. El valor de pH absoluto se usa como el segundo valor de pH calculado.

Esto puede ser ventajoso ya que una relación específica del medio que correlaciona el valor de pH en el medio con una concentración de CO₂ en el gas liberado en el estado de equilibrio de CO₂-pH se puede obtener empíricamente para cualquier tipo de medio, incluyendo los medios que comprenden una pluralidad de sustancias que tienen un impacto en el equilibrio pH-CO₂.

De acuerdo con los modos de realización, la relación específica del medio es una ecuación $PPH_{M1}(CO_2) = REL-M1(CO_2)$ obtenida ajustando matemáticamente múltiples pares determinados empíricamente de un valor de pH del medio (M1) y una fracción medida respectivamente de gas CO₂ en un volumen de gas. $PPH_{M1}(CO_2)$ es el valor de pH previsto en un medio (M1) cuando dicho medio carece de un cultivo celular y está en equilibrio pH-CO₂ con un volumen de gas por encima de dicho medio, comprendiendo dicho volumen de gas la concentración de CO₂ usada como parámetro de entrada. El CO₂ es un valor de parámetro de entrada y representa la concentración de CO₂ en un volumen de gas por encima del medio (M1) en el estado de equilibrio pH-CO₂ en ausencia del cultivo celular. $REL-M1$ es un conjunto de uno o más parámetros (a_1 , a_2 , b_1 , b_2 , b_3) conectados por operadores. Los parámetros se han obtenido empíricamente por un procedimiento que comprende:

- ajustar las muestras del medio (M1) que carece del cultivo celular a múltiples valores de pH diferentes, dejando, de este modo, que las muestras alcancen el equilibrio pH-CO₂ con el volumen de gas por encima del medio en la muestra respectiva,
- determinar la fracción de gas CO₂ en un volumen de gas respectivo que está en equilibrio pH-CO₂ con el medio en las muestras,
- graficar las fracciones de gas CO₂ determinadas frente a los valores de pH en equilibrio respectivos de las muestras,
- ajustar una curva en los valores graficados y derivar los parámetros (a_1 , a_2 o b_1 , b_2 , b_3) de la relación específica del medio a partir de la curva ajustada.

Por ejemplo, la relación específica del medio se puede determinar en un recipiente especial o biorreactor que comprende un sensor de gas liberado CO₂ y un dispositivo de medición de pH en línea. Las condiciones usadas para determinar la relación específica del medio, por ejemplo, de acuerdo con los modos de realización, el medio M1 en el depósito del que se mide su valor de pH, es un medio de composición definida que es conocido por tener la misma composición que el medio usado para generar empíricamente la relación específica del medio. Por ejemplo, el medio en el depósito y el medio usado para generar la relación específica del medio se pueden preparar por el operario del depósito o se pueden recuperar de un proveedor que divulgue todos los componentes del medio y las concentraciones respectivas. Por tanto, las expresiones "mismo tipo de medio" o el "mismo medio", como se usan en el presente documento, se refieren a medios que tienen la misma composición al menos con respecto a todos los componentes

que tienen un impacto en el equilibrio pH-CO₂.

Por ejemplo, el medio puede ser un tampón de bicarbonato que esté libre de otras sustancias (excepto el bicarbonato) que tengan un impacto en el equilibrio pH-CO₂. Algunos proveedores de medios disponibles comercialmente no divulgan la lista completa de ingredientes. Preparando el tampón que tiene un conjunto limitado y definido de componentes, el operario de un depósito se puede cerciorar de que el medio en el depósito tenga exactamente la misma composición que el medio usado para generar la relación específica del medio. Esto puede evitar una detección errónea de un problema de medición de pH o podría estar desprovisto de un problema real de medición de pH.

La determinación de que el primer dispositivo de medición de pH tiene un problema de medición de pH se realiza en caso de que los primer y segundo valores de pH difieran entre sí en más de un valor umbral. Del mismo modo, la determinación de que el primer dispositivo de medición de pH tiene un problema de medición de pH se realiza en caso de que un primer valor de datos difiera de un segundo valor de datos en más de otro umbral, derivándose el primer valor de datos del primer valor de pH, derivándose el segundo valor de datos del segundo valor de pH. Por ejemplo, el umbral se puede establecer por un operario del depósito al que está acoplado el primer dispositivo de medición de pH y puede depender de los requisitos de exactitud del operario o del proyecto para el que se usa el depósito y el medio.

De acuerdo con los modos de realización, el primer depósito es un biorreactor o un depósito de cosecha o una caja de calibración.

De acuerdo con los modos de realización, el primer depósito es un biorreactor o un depósito de cosecha o una caja de calibración.

De acuerdo con otro aspecto beneficioso, las concentraciones de CO₂ medidas en un depósito particular se pueden usar para calibrar o recalibrar un dispositivo de medición de pH calibrado erróneamente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para calibrar o recalibrar un primer dispositivo de medición de pH. El procedimiento comprende comparar valores de pH y concentraciones de CO₂ medidas en el primer y en el segundo depósito como se describe anteriormente para los modos de realización de la invención para determinar que el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por un problema de medición de pH; y calibrar el primer dispositivo de medición de pH de modo que emita el mismo valor de pH que el segundo dispositivo de medición de pH en caso de que las primera y segunda concentraciones de CO₂ sean idénticas. De forma alternativa, el procedimiento comprende calcular un segundo valor de pH esperado a partir de una primera concentración de CO₂ medida en el gas liberado de un primer depósito como se describe anteriormente para los modos de realización de la invención para determinar que el primer dispositivo de medición de pH en el primer depósito se ve afectado por un problema de medición de pH; y calibrar el primer dispositivo de medición de pH de modo que emita el mismo valor de pH que el valor de pH calculado como función de la primera concentración de CO₂.

De acuerdo con otro aspecto beneficioso, las concentraciones de CO₂ medidas en un depósito particular se pueden usar para calibrar o recalibrar un dispositivo de medición de pH calibrado erróneamente sin retirar y volver a insertar el dispositivo de medición de pH del y al depósito.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de funcionamiento de un depósito que comprende un primer dispositivo de medición de pH. El primer dispositivo de medición de pH es un dispositivo de medición en línea, comprendiendo el procedimiento:

- cultivar un cultivo celular en el depósito, comprendiendo el depósito un medio de proliferación, midiendo repetidamente, de este modo, el pH en el medio de proliferación por el primer dispositivo de medición de pH;

- reemplazar el medio de proliferación y el cultivo celular contenido en el mismo en el depósito por un medio (M1) para el que una relación entre el pH y el CO₂ en equilibrio es conocida; por ejemplo, dicho medio M1 puede ser un medio en el que su relación específica del medio correspondiente está almacenada en un medio de almacenamiento de datos accesible para una unidad de comparación que realiza la determinación si existe un problema de medición de pH, o el medio M1 puede ser un medio tamponado con bicarbonato únicamente que permite el cálculo del valor de pH absoluto a partir de la concentración de gas liberado CO₂ en el equilibrio pH-CO₂;

- después de haber reemplazado el medio de proliferación, calcular un segundo valor de pH esperado a partir de la concentración de gas liberado CO₂ medido como se describe anteriormente para los modos de realización de la invención para determinar que el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por un problema de medición de pH;

- si se detectó un problema de medición de pH, calibrar el primer dispositivo de medición de pH de modo que emita el mismo valor de pH que el valor de pH calculado como función de la primera concentración de CO₂ para el medio (M1);

– después de haber calibrado el primer dispositivo de medición de pH, reemplazar el medio en el depósito por el medio de proliferación.

Dichos rasgos característicos pueden ser ventajosos ya que ya no es necesario retirar el dispositivo de medición de pH del depósito, ejecutar algunas pruebas de calibración, opcionalmente recalibrarlo, esterilizar en autoclave el medidor de pH y reintroducir el medidor de pH esterilizado en autoclave en el depósito. En su lugar, el dispositivo de medición de pH, que puede ser un dispositivo de medición de pH en línea localizado dentro del depósito, se puede verificar y recalibrar en el depósito. Esto puede reducir el riesgo de contaminación y ahorrar tiempo.

De acuerdo con otro aspecto beneficioso, las concentraciones de CO₂ medidas en un depósito particular se pueden usar para identificar los efectos de desplazamiento de pH provocados por tomar una muestra del medio en el depósito.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de determinación de los efectos de desplazamiento de pH provocados por tomar una muestra de medio de un primer depósito. El procedimiento comprende proporcionar un dispositivo de medición de pH fuera de línea externo al depósito y proporcionar el primer depósito. El primer depósito comprende un primer dispositivo de medición de pH. El primer dispositivo de medición de pH es un dispositivo de medición de pH en línea localizado dentro del primer depósito y está rodeado al menos parcialmente por el medio (M1) en el primer depósito. El procedimiento comprende además:

– calibrar el primer dispositivo de medición de pH (interno del depósito) calculando un valor de pH absoluto previsto a partir de una concentración medida de gas liberado CO₂ del primer depósito para determinar si el primer dispositivo de medición de pH (interno del depósito) se ve afectado por un problema de medición de pH; y calibrar (si se detectó un problema de medición de pH) el primer dispositivo de medición de pH (interno del depósito) de modo que emita el mismo valor de pH que el valor de pH calculado como función de la primera concentración de CO₂;

– transferir el dispositivo de medición de pH fuera de línea externo al depósito a una caja de calibración que comprende el mismo tipo de medio (M1) que el primer depósito; y calibrar (si se detectó un problema de medición de pH) el dispositivo de medición de pH fuera de línea externo al depósito, calculando un valor de pH absoluto previsto a partir de una concentración de gas liberado CO₂ medido de la caja de calibración para determinar si el dispositivo de medición de pH fuera de línea externo al depósito se ve afectado por un problema de medición de pH; y calibrar (si se detectó un problema de medición de pH) el dispositivo de medición de pH fuera de línea externo al depósito, de modo que emita el mismo valor de pH que el valor de pH calculado como función de la concentración de CO₂ medida en el gas liberado de la caja de calibración; por tanto, la caja de calibración se usa como el depósito que comprende el dispositivo de medición de pH que se va a calibrar y se usa como un recipiente en el que el sensor de gas liberado CO₂ se usa para medir la concentración de CO₂ usada como entrada para calcular el segundo valor de pH que se va a usar para calibrar el dispositivo de medición de pH fuera de línea externo al depósito.

Después de haber calibrado el primer dispositivo de medición de pH y el dispositivo de medición de pH externo al depósito, el procedimiento comprende:

– medir, por el primer dispositivo de medición de pH, un primer valor de pH actual del medio en el primer depósito, siendo el primer valor de pH actual un valor de medición en línea;

– tomar una muestra del medio del primer depósito y llenar la muestra en un recipiente portátil;

– posicionar el dispositivo de medición de pH externo al depósito de modo que esté al menos parcialmente rodeado del medio en el recipiente de muestra;

– medir, por el dispositivo de medición de pH externo al depósito, un segundo valor de pH actual del medio en el recipiente de muestra, siendo el segundo valor de pH actual un valor de medición fuera de línea;

– en caso de que el primer y el segundo valores de pH actuales difieran en más de un umbral, determinar que el procedimiento de muestreo provocó un efecto de desplazamiento de pH.

De acuerdo con los modos de realización, el procedimiento comprende además:

– recibir una tercera concentración de CO₂ y un tercer valor de pH, siendo la tercera concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un tercer volumen de gas por encima del medio en el primer depósito, midiéndose la tercera concentración de CO₂ y el tercer valor de pH en un tercer tiempo, siendo el tercer tiempo un tiempo cuando el medio en el primer depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ a una temperatura y presión predefinidas con el tercer volumen de gas y después de que dicho estado de equilibrio se modifique por el metabolismo del cultivo celular en el primer depósito, siendo el tercer valor de pH un valor medido proporcionado por el primer dispositivo de medición de pH;

– recibir una cuarta concentración de CO₂ y un cuarto valor de pH, siendo la cuarta concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un cuarto volumen de gas por encima del medio en el segundo depósito, midiéndose la

cuarta concentración de CO₂ y el cuarto valor de pH en un cuarto tiempo, siendo el cuarto tiempo un tiempo cuando el medio en el segundo depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ a la temperatura y presión predefinidas con el segundo volumen de gas y después de que dicho estado de equilibrio se modifique por el metabolismo del cultivo celular en el segundo depósito, siendo el cuarto valor de pH un valor medido proporcionado por el segundo dispositivo de medición de pH, siendo el tiempo transcurrido entre el tercer tiempo y la inoculación del primer depósito idéntico al tiempo transcurrido entre el cuarto tiempo y la inoculación del segundo depósito;

- recibir una primera tasa de consumo de oxígeno medida del cultivo celular en el primer depósito en el tercer tiempo;

- recibir una segunda tasa de consumo de oxígeno medida del cultivo celular en el segundo depósito en el cuarto tiempo;

- en caso de que las primera y segunda tasas de consumo de oxígeno sean idénticas, comparar los tercer y cuarto valores de pH y las concentraciones de CO₂ para determinar si los primer y segundo dispositivos de medición de pH están calibrados de forma diferente.

Por ejemplo, dichas etapas se pueden realizar por una unidad de comparación, por ejemplo, una parte de lógica de programa que supervisa y/o controla las mediciones de pH y los estados de calibración de uno o más dispositivos de medición de pH. Además, la unidad de comparación o una unidad de control acoplada a la unidad de comparación puede supervisar y/o controlar el estado de uno o más depósitos.

Medir con exactitud y minimizar los efectos de desplazamiento de un procedimiento de muestreo puede ser altamente ventajoso ya que el valor de pH medido en una muestra a menudo se puede usar como un parámetro de control importante de los biorreactores. El valor de pH medido en una muestra del medio de un biorreactor a menudo puede ser la base para adoptar acciones correctivas, por ejemplo, se puede realizar para añadir una sustancia básica, incrementar o disminuir la temperatura o la tasa de alimentación. Calibrando el dispositivo de medición de pH interno del depósito, así como el dispositivo de medición de pH externo al depósito en base a una concentración de CO₂ medida, ambos dispositivos de medición de pH se pueden calibrar con respecto a un valor de pH absoluto altamente exacto que se puede derivar exactamente de la concentración de CO₂. Por tanto, se pueden minimizar las diferencias de calibración. Como consecuencia, cuando se hace funcionar el depósito y se toman muestras de medios con regularidad, cualquier diferencia en el valor de pH del dispositivo de medición de pH interno del depósito y del dispositivo de medición de pH externo al depósito se puede atribuir claramente a los efectos de muestreo, no a las diferencias de calibración. Por tanto, el efecto del procedimiento de muestreo se puede determinar con mayor exactitud y se puede filtrar (por ejemplo, sumando o restando de forma informática la diferencia de pH provocada por el procedimiento de muestreo) del valor de pH medido por el dispositivo de medición de pH externo al depósito.

De acuerdo con los modos de realización, el primer dispositivo de medición de pH está rodeado al menos parcialmente por el medio dentro del primer depósito. El primer depósito carece de medios para tomar manual o automáticamente una muestra del medio en el segundo depósito. De forma alternativa, el primer depósito comprende medios para tomar manual o automáticamente una muestra del medio en el primer depósito, pero todas las aberturas de los medios de muestreo se mantienen cerradas durante un intervalo de tiempo después de llenar el medio en el primer depósito y antes de añadir un cultivo celular al medio en el primer depósito. Esto puede reducir el riesgo de contaminar el depósito con microbios.

De acuerdo con los modos de realización, el segundo dispositivo de medición de pH está rodeado al menos parcialmente por el medio dentro del segundo depósito. El segundo depósito carece de medios para tomar manual o automáticamente una muestra del medio en el segundo depósito. De forma alternativa, el segundo depósito comprende medios para tomar manual o automáticamente una muestra del medio en el segundo depósito, pero todas las aberturas de los medios de muestreo se mantienen cerradas durante un intervalo de tiempo después de llenar el medio en el segundo depósito y antes de añadir un cultivo celular al medio en el segundo depósito.

De acuerdo con los modos de realización, el procedimiento para determinar los problemas de medición de pH descritos en el presente documento para los modos de realización de la invención usado para determinar si el segundo dispositivo de medición de pH está calibrado de forma diferente al primer dispositivo de medición de pH, realizándose la determinación de si el primer y segundo dispositivo de medición de pH están calibrados de forma diferente mientras el segundo dispositivo de medición de pH está rodeado al menos parcialmente del medio en el segundo depósito y sin tomar una muestra del medio del segundo depósito para realizar dicha determinación.

De acuerdo con los modos de realización, comparando los valores de pH medidos por dos o más dispositivos de medición de pH diferentes, la determinación de si el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por un problema de medición de pH se realiza usando las primera y segunda concentraciones de CO₂ y los primer y segundo valores de pH como la única entrada de datos para dicha determinación.

De acuerdo con los modos de realización, comparando el valor de pH medido por un dispositivo de medición de pH particular con un valor de pH esperado calculado a partir de la concentración de CO₂ medida, la determinación de si

el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por un problema de medición de pH se realiza usando el valor de pH medido y la concentración de CO₂ medida del depósito que comprende dicho dispositivo de medición de pH como la única entrada de datos para dicha determinación.

5 Dichos rasgos característicos pueden ser ventajosos ya que ya no se requieren mediciones fuera de línea para determinar problemas de medición de pH.

De acuerdo con los modos de realización, la medición del primer valor de pH se realiza como una medición en línea y el primer dispositivo de medición de pH está rodeado al menos parcialmente del medio en el primer depósito. En este caso, el primer dispositivo de medición de pH que está acoplado de forma operativa al primer depósito es un dispositivo de medición de pH interno del depósito del primer depósito.

Además, o de forma alternativa, la medición del segundo valor de pH se realiza como una medición en línea y el segundo dispositivo de medición de pH está rodeado al menos parcialmente por el medio en el segundo depósito. En este caso, el segundo dispositivo de medición de pH que está acoplado de forma operativa al segundo depósito es un dispositivo de medición de pH interno del depósito del segundo depósito.

De acuerdo con los modos de realización, la medición de la primera concentración de CO₂ se realiza como una medición en línea por un primer sensor de CO₂ en el gas liberado del primer depósito para proporcionar la primera concentración de CO₂.

De acuerdo con los modos de realización, la medición de la segunda concentración de CO₂ se realiza como una medición en línea por un segundo sensor de CO₂ en el gas liberado del segundo depósito para proporcionar la segunda concentración de CO₂.

De acuerdo con los modos de realización, la unidad de comparación realiza, en caso de determinar que el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por un problema de medición de pH, una o más de las siguientes etapas: emitir un mensaje de advertencia; realizar automáticamente o activar la realización de una recalibración del primer dispositivo de medición de pH; o realizar automáticamente o activar la realización de un reemplazo del primer dispositivo de medición de pH por un nuevo primer dispositivo de medición de pH.

De acuerdo con los modos de realización, el primer depósito difiere del segundo depósito con respecto a uno o más de los siguientes rasgos característicos:

- 35 a) el volumen de gas en el depósito,
- b) el volumen de medio en el depósito,
- 40 c) el número de Reynolds del depósito,
- d) el número de Newton del depósito,
- e) las dimensiones del depósito,
- 45 f) los rasgos característicos geométricos del depósito y/o los deflectores del depósito,
- g) la configuración del agitador,
- 50 h) la tasa de agitación,
- i) el coeficiente de transferencia de masa volumétrica para oxígeno (kLa) del depósito,
- j) la tasa de flujo de entrada de gas total y/o la tasa de flujo de entrada de O₂ y/o la tasa de flujo de entrada de N₂ y/o la tasa de flujo de entrada de CO₂,
- 55 k) la entrada de potencia,
- l) la presión en el depósito,
- 60 m) el tiempo de retención de burbujas de gas en el medio,
- n) el tamaño de burbujas de gas y distribución en el medio,
- o) la velocidad superficial,
- 65 p) un parámetro calculado como derivado de uno o más de los parámetros a)–o);

q) la localización geográfica de los dos depósitos.

En otro aspecto, la invención se refiere a una unidad de comparación configurada para;

– recibir una primera concentración de CO₂ y un primer valor de pH, siendo la primera concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un primer volumen de gas por encima de un medio (M1) en un primer depósito, midiéndose la primera concentración de CO₂ y el primer valor de pH en un primer tiempo, siendo el primer tiempo un tiempo cuando el medio en el primer depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el primer volumen de gas a una temperatura y presión predefinidas, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, siendo el primer valor de pH un valor medido proporcionado por el primer dispositivo de medición de pH;

– recibir una segunda concentración de CO₂ y un segundo valor de pH, siendo la segunda concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un segundo volumen de gas por encima del mismo tipo de medio (M1) contenido en el segundo depósito, midiéndose la segunda concentración de CO₂ y el segundo valor de pH en un segundo tiempo, siendo el segundo tiempo un tiempo cuando el medio en el segundo depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el segundo volumen de gas a la temperatura y presión predefinidas, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, siendo el segundo valor de pH un valor medido proporcionado por el segundo dispositivo de medición de pH;

– comparar los primer y segundo valores de pH y comparar las primera y segunda concentraciones de CO₂ para determinar si el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por el problema de medición de pH.

En otro aspecto, la invención se refiere a una unidad de comparación configurada para:

– recibir una primera concentración de CO₂ y un primer valor de pH, siendo la primera concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un primer volumen de gas por encima de un medio (M1) en un primer depósito, midiéndose la primera concentración de CO₂ y el primer valor de pH en un primer tiempo, siendo el primer tiempo un tiempo cuando el medio en el primer depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el primer volumen de gas a una temperatura y presión predefinidas, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, siendo el primer valor de pH un valor medido proporcionado por el primer dispositivo de medición de pH;

– calcular un segundo valor de pH como función de la primera concentración de CO₂, siendo el segundo valor de pH el valor de pH previsto para dicho tipo de medio (M1) cuando dicho medio está en estado de equilibrio pH-CO₂ con un segundo volumen de gas por encima de dicho medio (M1) a la temperatura y presión predefinidas, teniendo el segundo volumen de gas en dicho equilibrio una segunda concentración de CO₂ que es idéntica a la primera concentración de CO₂, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular;

– comparar los primer y segundo valores de pH para determinar si el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por el problema de medición de pH.

En otro aspecto, la invención se refiere a un sistema configurado para supervisar y/o controlar un estado de un primer depósito. El sistema comprende:

– la unidad de comparación de acuerdo con los modos de realización de la invención;

– una unidad de control acoplada de forma operativa a la unidad de comparación; y

– el primer depósito y el primer dispositivo de medición de pH;

– estando configurada la unidad de control para supervisar y/o controlar un estado de un cultivo celular en el primer depósito, usando de este modo los valores de pH medidos repetidamente por el primer dispositivo de medición de pH como entrada.

De acuerdo con los modos de realización, el sistema se configura para usar valores de pH del primer y segundo dispositivo de medición de pH y las primera y segunda concentraciones de CO₂ como un parámetro de entrada para supervisar y/o minimizar las desviaciones de un estado del primer depósito del estado del segundo depósito analizando al menos dichos parámetros de entrada.

En lo que sigue, se describirán modos de realización y ejemplos haciendo referencia a biorreactores. Sin embargo, los biorreactores son solo un tipo de depósito donde se pueden aplicar los modos de realización de la invención. Otros ejemplos son los depósitos de cosecha y las cajas de calibración.

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento que comprende:

- recibir, por una unidad de comparación, una primera concentración de CO₂ y un primer valor de pH. La primera concentración de CO₂ es una concentración de CO₂ de un primer volumen de gas por encima de un medio en el primer biorreactor. La primera concentración de CO₂ y el primer valor de pH se miden en un primer tiempo. El primer tiempo es un tiempo cuando el medio en el primer biorreactor está en estado de equilibrio pH-CO₂ a una temperatura y presión predefinidas con el primer volumen de gas y antes de que dicho estado de equilibrio se modifique por el metabolismo de un cultivo celular en el primer biorreactor. El primer valor de pH es un valor medido proporcionado por un primer dispositivo de medición de pH acoplado de forma operativa a un primer biorreactor;
- recibir, por la unidad de comparación, una segunda concentración de CO₂ y un segundo valor de pH. La segunda concentración de CO₂ es una concentración de CO₂ de un segundo volumen de gas por encima de un medio en el segundo biorreactor. La segunda concentración de CO₂ y el segundo valor de pH se miden en un segundo tiempo. El segundo tiempo es un tiempo cuando el medio en el segundo biorreactor está en estado de equilibrio pH-CO₂ a la temperatura y presión predefinidas con el segundo volumen de gas y antes de que dicho estado de equilibrio se modifique por el metabolismo de un cultivo celular en el segundo biorreactor. El segundo valor de pH es un valor medido proporcionado por un segundo dispositivo de medición de pH acoplado de forma operativa a un segundo biorreactor. El medio en el primer biorreactor es el mismo que el medio en el segundo biorreactor;
- comparar, por la unidad de comparación, los primer y segundo valores de pH y las segundas concentraciones de CO₂ para determinar si los primer y segundo dispositivos de medición de pH están calibrados de forma diferente o para determinar si los primer y segundo dispositivos de medición de pH emiten diferentes valores de pH debido a efectos de desplazamiento de un procedimiento de muestreo realizado para medir el primer o el segundo valor de pH en una muestra del medio de uno respectivo de los primer y segundo biorreactores.
- Por ejemplo, el segundo biorreactor se puede usar como biorreactor de referencia y el primer biorreactor se puede usar como otro biorreactor en el que un proyecto de cultivo celular se ejecutará básicamente de la misma manera que un cultivo celular de referencia que se ha cultivado previamente en el biorreactor de referencia. También se puede dar el caso de que los primer y segundo biorreactores se ejecuten de forma sincrónica, con lo que los valores de pH respectivos se miden repetidamente para comparar el estado de los biorreactores. La comparación de parámetros se puede realizar, por ejemplo, para iniciar automática, semiautomática o manualmente las acciones apropiadas para evitar una desviación de estado de dichos dos biorreactores.
- Se ha observado que los errores de calibración de los primer o segundo dispositivos de medición de pH son fuentes de error comunes que dan como resultado una falla para comparar con exactitud los estados de los dos biorreactores y/o para reproducir con exactitud un perfil de estado derivado del segundo biorreactor en el primer biorreactor. Los errores de calibración son fuentes de error comunes tanto para los enfoques de medición de pH fuera de línea como en línea.
- Además, se ha observado que en caso de que se realicen mediciones de pH fuera de línea en el primer y/o el segundo biorreactor, el valor de pH fuera de línea obtenido puede no reflejar con exactitud el valor de pH actual del medio en el biorreactor. Por ejemplo, se puede extraer con regularidad una muestra de medio de un biorreactor para realizar con regularidad una medición de pH fuera de línea en dichas muestras. El procedimiento de muestreo antes de que se pueda medir el valor de pH en la muestra de medio lleva tiempo. Mientras tanto, el valor de pH en el biorreactor del que se extrajo la muestra puede haber cambiado significativamente. Además, puede suceder que la temperatura de la muestra descienda durante el procedimiento de muestreo, o que el valor de pH en la muestra cambie debido a un cambio en la concentración de CO₂ en el volumen de gas por encima del medio de la muestra en comparación con el volumen de gas por encima del medio en el biorreactor. Todos los dichos factores pueden influir en el valor de pH en la muestra de medio y dar lugar a un denominado “efecto de desplazamiento”.
- Un “efecto de desplazamiento” como se usa en el presente documento es un desplazamiento de valor de pH por el que un valor de pH medido en una muestra de medio de un biorreactor en un tiempo particular difiere de un valor de pH que se mediría en dicho tiempo particular directamente en el medio del biorreactor. Por tanto, los errores de calibración del primer o el segundo dispositivo de medición de pH y/o los efectos de desplazamiento (en caso de que el primer y/o el segundo dispositivo de medición de pH sea un dispositivo de medición fuera de línea) pueden dar como resultado una falla para comparar con exactitud y/o sincronizar el estado de dos biorreactores en base a valores de medición de pH.
- Los modos de realización de la invención aprovechan el hecho de que en caso de que dos soluciones/medios idénticos estén en estado de equilibrio pH-CO₂ a una temperatura y presión dadas y un valor de pH dado, el volumen por encima de dichos medios tiene la misma concentración de CO₂. Del mismo modo, dada una concentración de CO₂ particular en los volúmenes por encima de dichos dos medios en estado de equilibrio, los valores de pH de dichos dos medios son idénticos como consecuencia de que los dos medios están en equilibrio pH-CO₂. Como los dos medios están libres de cualquier célula en la que su metabolismo podría cambiar el estado de equilibrio pH-CO₂, cualquier desviación del primer y segundo valor de pH, dadas concentraciones de CO₂ medidas idénticas, se usa como una indicación de que los dos dispositivos de medición de pH están calibrados de forma diferente y/o que la diferencia está provocada por un efecto de desplazamiento de una medición de pH fuera de línea.

- Por ejemplo, la temperatura “predefinida” o “dada” del segundo biorreactor puede ser cualquier temperatura y presión que sea adecuada para iniciar y/o hacer funcionar el segundo biorreactor. Por ejemplo, la segunda temperatura podría ser de 20 °C y la segunda presión podría ser la presión atmosférica normal. Se pueden medir la segunda temperatura y presión y la temperatura y presión del primer biorreactor (referidas en el presente documento como “primera temperatura” y “primera presión”) se pueden controlar y adaptar de modo que las primera y segunda temperaturas sean idénticas o aproximadamente idénticas y las primera y segunda presiones sean idénticas o aproximadamente idénticas.
- Los modos de realización de la invención pueden ser ventajosos por múltiples motivos:
- La comparación de las concentraciones de CO₂ y los valores de pH en un tiempo antes de que el valor de pH del medio se vea afectado por cualquier actividad metabólica del cultivo celular permite verificar si el primer dispositivo de medición de pH está calibrado de forma diferente al segundo dispositivo de medición de pH y permite determinar, en caso de que uno o ambos de dichos dispositivos de medición de pH sean dispositivos fuera de línea, si uno o ambos de los valores de pH medidos pueden estar defectuosos por un efecto de desplazamiento.
- Una detección temprana de las diferencias de calibración y/o los efectos de desplazamiento puede permitir recalibrar, reparar o intercambiar el dispositivo de medición de pH antes de que se inocule el medio con el cultivo celular. La recalibración puede incluir la opción de calibrar el primer dispositivo de medición de pH de modo que compense cualquier efecto de desplazamiento. Por tanto, el cultivo de un cultivo celular en un biorreactor con un dispositivo de medición de pH que está calibrado de forma diferente a un dispositivo de medición de pH de un biorreactor de referencia (o con valores de pH medidos que son defectuosos por un efecto de desplazamiento) se puede evitar y/o corregir desde el principio, ahorrando, de este modo, tiempo y dinero que se perderían en caso de que un error de calibración de un dispositivo de medición de pH dé como resultado una falla para reproducir las condiciones ambientales del biorreactor de referencia (“segundo”) en el otro biorreactor (“primero”).
- En otro aspecto beneficioso, los modos de realización de la invención permiten comparar valores de pH de biorreactores diferentes incluso en caso de que los dos biorreactores comparados y los respectivos dispositivos de medición de pH estén localizados muy lejos entre sí, por ejemplo, estén localizados en edificios diferentes o ciudades diferentes o incluso países diferentes. En lugar de depender de soluciones de calibración estandarizadas disponibles comercialmente que tienen un valor de pH definido, el valor de CO₂ (que se puede determinar fácilmente y con gran exactitud) se usa como base para comparar los valores de pH medidos y para identificar las diferencias de calibración y/o los efectos de desplazamiento en una medición de pH. La primera concentración de CO₂ medida y el primer valor de pH medido se pueden comunicar fácilmente a la unidad de comparación, por ejemplo, por medio de una conexión a internet. No es necesario que los primer y segundo dispositivos de medición de pH se calibren y comparen al mismo tiempo. Ni siquiera es necesario que el valor de pH absoluto se determine correctamente. Dado un primer valor de pH y un primer valor de CO₂ medido por un primer dispositivo de medición de pH en un primer biorreactor en el estado de equilibrio pH-CO₂ como se describe anteriormente, es posible determinar, midiendo un segundo valor de pH y un segundo valor de CO₂ por un segundo dispositivo de medición de pH en un segundo biorreactor en estado de equilibrio pH-CO₂ como se describe anteriormente, si los primer y segundo dispositivos de medición de pH están calibrados de forma idéntica, incluso en caso de que se determinaran el segundo valor de pH y el segundo valor de CO₂ semanas o años antes del primer valor de pH y se observaran segundos valores de CO₂.
- En otro aspecto, en caso de que el primer biorreactor se haga funcionar básicamente con los mismos parámetros ambientales que el segundo biorreactor, determinar la ausencia de diferencias de calibración de los segundo y primer dispositivos de medición de pH y determinar la ausencia de efectos de desplazamiento en las mediciones de pH puede ser mucho más importante que una medición correcta de un valor de pH absoluto. Así que incluso en caso de que el segundo biorreactor (con parámetros de funcionamiento que pueden proporcionar una especie de “perfil de referencia” para hacer funcionar el primer biorreactor) se hiciera funcionar con un dispositivo de medición de pH calibrado incorrectamente y/o el segundo valor de pH esté influenciado por un efecto de desplazamiento mientras el primer dispositivo de medición de pH (del primer biorreactor que se hará funcionar como se especifica en el “perfil de referencia”) está calibrado correctamente/no tiene efecto de desplazamiento, los modos de realización de la invención permiten identificar una diferencia de calibración y/o la existencia de un efecto de desplazamiento cuando se mide el segundo dispositivo de medición de pH. La identificación de la diferencia de calibración y/o el efecto de desplazamiento cuando se mide el segundo o el primer valor de pH permite que un operario o un sistema de control automatizado adopte las acciones apropiadas para evitar la proliferación del cultivo celular en el primer biorreactor bajo diferentes parámetros ambientales (en particular, bajo diferentes valores de pH del medio) a las células del segundo biorreactor/biorreactor de referencia.
- Por tanto, los modos de realización de la invención pueden posibilitar una supervisión y/o control exactos del estado de un biorreactor identificando las diferencias de calibración del dispositivo de medición de pH y/o los efectos de desplazamiento ya en la fase de inicio de un biorreactor.
- De acuerdo con otros modos de realización, el primer biorreactor comprende medios para tomar manual o automáticamente una muestra del medio en el primer biorreactor. Durante un intervalo de tiempo después de llenar el

medio en el primer biorreactor y antes de añadir el cultivo celular al medio en el primer biorreactor, el procedimiento comprende mantener cerradas todas las aberturas de los medios de muestreo.

Esto puede ser beneficioso ya que se evita la contaminación del medio del primer biorreactor. Ya no es necesario abrir los medios de muestreo para determinar el valor de pH en una solución de referencia de valor de pH conocido: las diferencias de calibración se identifican por medio de los valores de CO₂ y los valores de pH se miden, de acuerdo con los modos de realización de la invención, por el dispositivo de medición de pH en el biorreactor. Esto puede ser beneficioso ya que se reduce el riesgo de infectar el biorreactor con microbios no deseados en el procedimiento de muestreo y no se provocan efectos de desplazamiento por el procedimiento de muestreo.

De acuerdo con los modos de realización, las segunda y primera concentraciones de CO₂ del gas liberado de los biorreactores respectivos y la tasa de flujo de entrada de gas total se usan para calcular una segunda tasa de gas liberado CO₂ para el segundo biorreactor y para calcular una primera tasa de gas liberado CO₂ del primer biorreactor. A continuación, se comparan las segunda y primera tasas de gas liberado CO₂ en lugar de las segunda y primera concentraciones de CO₂. Este enfoque se puede aplicar en caso de que las tasas de gas liberado total en el segundo y el primer biorreactor sean idénticas. Algunos analizadores de gas liberado CO₂ pueden medir una tasa de gas liberado CO₂ en lugar de una concentración de CO₂ y devolver una tasa de gas liberado CO₂ a la unidad de comparación. Siempre que la tasa de gas liberado total de los dos biorreactores comparados sea idéntica, se puede comparar la tasa de gas liberado CO₂ ("ACO") de los dos biorreactores en lugar de los dos valores de CO₂ y se detecta un desplazamiento del medidor de pH o una diferencia de calibración si, dadas tasas de gas liberado total idénticas y valores de pH medidos idénticos, las tasas de gas liberado CO₂ medido de los dos biorreactores difieren.

De acuerdo con los modos de realización, el procedimiento se usa para determinar si el primer dispositivo de medición de pH está calibrado de forma diferente al segundo dispositivo de medición de pH. El primer dispositivo de medición de pH está rodeado al menos parcialmente por el medio dentro del primer biorreactor. Por ejemplo, el primer dispositivo de medición de pH puede ser un dispositivo de medición de pH sumergido en el medio del primer biorreactor. El primer biorreactor carece de medios para tomar manual o automáticamente una muestra del medio en el primer biorreactor.

Esto puede tener el beneficio de permitir el uso de un tipo de biorreactor que evita la contaminación del medio y/o la generación de efectos de desplazamiento tomando muestras con el propósito de medir el valor de pH como una medición fuera de línea.

De acuerdo con otros modos de realización, el primer biorreactor comprende medios para tomar manual o automáticamente una muestra del medio en el primer biorreactor. Dichos medios pueden consistir, por ejemplo, en una abertura para tomar muestras de medio del biorreactor manualmente, o pueden consistir en brazos robóticos o drenajes para extraer una muestra automática o semiautomáticamente. El procedimiento comprende además: durante un intervalo de tiempo después de llenar el medio en el primer biorreactor y antes de añadir el cultivo celular al medio en el primer biorreactor, mantener cerradas todas las aberturas de los medios de muestreo. Esto puede prohibir la contaminación del medio en el biorreactor. Ya que el procedimiento usa un primer dispositivo de medición de pH que reside en el interior del biorreactor en combinación con una concentración de CO₂ del volumen de gas por encima del medio que se puede medir fácilmente sin tomar muestras, los modos de realización de la invención permiten detectar diferencias de calibración sin tomar una muestra del biorreactor y, por tanto, sin riesgo de infección.

De acuerdo con los modos de realización, el procedimiento se usa para determinar si el primer dispositivo de medición de pH está calibrado de forma diferente al segundo dispositivo de medición de pH. La determinación de si el segundo y el primer dispositivo de medición de pH se calibran de forma diferente se realiza mientras el primer dispositivo de medición de pH está rodeado al menos parcialmente del medio en el primer biorreactor (por tanto, por un dispositivo de medición de pH completamente o al menos parcialmente localizado en el interior del biorreactor) y sin tomar una muestra del medio del primer biorreactor para realizar dicha determinación.

De acuerdo con los modos de realización, la determinación se realiza usando las segunda y primera concentraciones de CO₂ y los segundo y primer valores de pH como la única entrada de datos para dicha determinación. Esto puede ser ventajoso ya que dichos valores de parámetros se pueden obtener fácilmente realizando mediciones de concentración de CO₂ y de valores de pH en línea.

De acuerdo con los modos de realización, el procedimiento comprende además realizar una medición en línea con el primer dispositivo de medición de pH para medir el primer valor de pH, estando el primer dispositivo de medición de pH rodeado al menos parcialmente del medio en el primer biorreactor.

Además o de forma alternativa, el procedimiento comprende realizar una medición en línea por un primer sensor de CO₂ en el gas liberado del primer biorreactor para proporcionar la primera concentración de CO₂.

Este procedimiento se puede usar en particular determinando si el primer dispositivo de medición de pH está calibrado de forma diferente al segundo dispositivo de medición de pH (ya que el primer dispositivo de medición de pH puede realizar mediciones en línea, típicamente no hay ningún efecto de desplazamiento y cualquier desviación del resultado del segundo dispositivo de medición de pH está provocado por diferencias de calibración o, en caso de que el segundo

dispositivo de medición de pH sea un dispositivo de medición fuera de línea, por efectos de desplazamiento del segundo dispositivo de medición de pH.

En muchos tipos de biorreactores usados actualmente, los dispositivos de medición de concentración de CO₂ y pH respectivos ya están presentes y se pueden emplear fácilmente no solo para propósitos de supervisión y control del estado del biorreactor, sino también para el propósito de identificar diferencias de calibración y efectos de desplazamiento. No es necesario extraer muestras de medio para la medición de pH ni extraer o reintroducir el dispositivo de medición de pH de o a un biorreactor. Por tanto, se reduce el riesgo de infectar el biorreactor con microbios no deseados. El procedimiento puede permitir identificar diferencias de calibración de dos medidores de pH de dos biorreactores sin tomar muestras del medio de ninguno de los dos biorreactores.

El uso de un sensor de CO₂ que mide la concentración de CO₂ en el gas liberado de un biorreactor puede ser ventajoso, debido a que los medidores de gas liberado CO₂ ("analizadores de gas liberado CO₂", "sensores de gas liberado CO₂") no son invasivos, no necesitan un muestreo, se pueden obtener fácilmente en tiempo real y emiten un valor, la concentración de CO₂ en el gas liberado y/o la tasa de gas liberado CO₂. Por tanto, los analizadores de gas liberado CO₂ pueden dar una respuesta inmediata a los cambios de procedimiento intencionados o involuntarios en un biorreactor (en contraste con, por ejemplo, densidades celulares o recuentos celulares). Además, los analizadores de gas liberado se pueden calibrar en cualquier momento y no tienen que esterilizarse en autoclave.

De acuerdo con modos de realización, el procedimiento comprende realizar una medición en línea con el segundo dispositivo de medición de pH para medir el segundo valor de pH. El segundo dispositivo de medición de pH está rodeado al menos parcialmente del medio en el segundo biorreactor. Además, o de forma alternativa, el procedimiento comprende realizar una medición en línea por un segundo sensor de CO₂ en el gas liberado del segundo biorreactor para proporcionar la segunda concentración de CO₂. Esto puede tener la ventaja de que también los valores de pH y concentración de CO₂ del segundo biorreactor (o "de referencia") se pueden recopilar por medio de mediciones en línea, por ejemplo, por medio de un medidor de pH continuo sumergido, evitando de este modo los efectos de desplazamiento de pH y reduciendo el riesgo de infecciones provocadas por el procedimiento de muestreo.

De acuerdo con los modos de realización, el procedimiento se usa para determinar si el primer dispositivo de medición de pH emite un valor de pH diferente al segundo dispositivo de medición de pH debido a los efectos de desplazamiento de un procedimiento de muestreo realizado para medir el primer valor de pH en una muestra del medio del primer biorreactor. El procedimiento comprende además realizar una medición fuera de línea con el primer dispositivo de medición de pH para medir el primer valor de pH. El primer dispositivo de medición de pH está fuera del primer biorreactor y está rodeado al menos parcialmente del medio en una muestra de medio del primer biorreactor.

Dichos rasgos característicos pueden ser beneficiosas si se usa un tipo de biorreactor que está técnicamente equipado con dispositivos de medición fuera de línea, en particular dispositivos de medición de pH fuera de línea. En este contexto, se puede usar cualquier efecto de desplazamiento determinado por una comparación de los segundo y primer valores de pH y segunda y primera concentraciones de CO₂ para emitir una advertencia y/o modificar la salida del primer dispositivo de medición de pH de una manera que se compense el efecto de desplazamiento provocado por el procedimiento de muestreo.

De acuerdo con los modos de realización, el procedimiento comprende determinar que los segundo y primer dispositivos de medición de pH están calibrados de forma diferente o determinar que los segundo y primer dispositivos de medición de pH emiten valores de pH diferentes debido a los efectos de desplazamiento de un procedimiento de muestreo en caso de que se produzca una de las siguientes situaciones:

- las segunda y primera concentraciones de CO₂ son idénticas y los segundo y primer valores de pH difieren entre sí en más de un valor umbral; o
- los segundo y primer valores de pH son idénticos y las segunda y primera concentraciones de CO₂ difieren entre sí en más de otro valor umbral; o
- un segundo valor de datos difiere de un primer valor de datos en más de otro umbral, derivándose el segundo valor de datos del segundo valor de pH y la segunda concentración de CO₂, derivándose el primer valor de datos del primer valor de pH y la primera concentración de CO₂. Por ejemplo, en caso de que las tasas de gas liberado total sean idénticas para dos biorreactores con dispositivos de medición de pH que se van a calibrar para permitir una comparación del valor de pH en los medios en ambos biorreactores, se pueden comparar las tasas de gas liberado CO₂ en lugar de las concentraciones de CO₂.

De acuerdo con los modos de realización, en caso de que ni el valor de pH ni las concentraciones de CO₂ sean idénticos, una unidad de control de un sistema de supervisión y/o control de biorreactor puede modificar la tasa de flujo de entrada de gas CO₂. De este modo, se pueden ver afectados tanto la concentración de CO₂ en la fase gaseosa como el valor de pH en el medio. Tan pronto como el primer valor de pH sea idéntico al segundo valor de pH o bien la primera concentración de CO₂ sea idéntica a la segunda concentración de CO₂, se realiza la determinación descrita anteriormente.

De acuerdo con los modos de realización, el procedimiento comprende además observar que la segunda y la primera concentración de CO₂ son idénticas y calibrar el primer dispositivo de medición de pH de una manera que el primer dispositivo de medición de pH indique el mismo valor de pH que el segundo dispositivo de medición de pH.

Por ejemplo, en caso de que las segunda y primera concentraciones de CO₂ sean idénticas y el segundo y el primer valor de pH difieran entre sí en una cantidad "delta", dicho valor de desplazamiento de pH "delta" se puede añadir a cada valor de pH medido por el primer dispositivo de medición de pH en el futuro (es decir, en un tiempo posterior al primer tiempo). Los valores de pH resultantes emitidos por el primer dispositivo de medición de pH compensan, por tanto, el desplazamiento de pH provocado por un procedimiento de muestreo para medir el segundo o el primer valor de pH y/o compensan cualquier diferencia de calibración entre los segundo y primer dispositivos de medición de pH.

De acuerdo con los modos de realización, una unidad de control de un sistema configurado para supervisar y/o minimizar las desviaciones de un estado del primer biorreactor con respecto al estado del segundo biorreactor usa valores de pH del primer dispositivo de medición de pH como entrada. La minimización de las diferencias de estado y/o la comparación de los estados de los dos biorreactores se realiza por la unidad de comparación que analiza al menos dichos parámetros de entrada. La unidad de comparación puede ser una parte implementada por programa informático, microprograma y/o equipo informático de lógica de programa, por ejemplo, un programa de aplicación que se ejecuta en un sistema de procesamiento electrónico de datos. De acuerdo con los modos de realización, la unidad de comparación está acoplada de forma operativa a la unidad de control. Por ejemplo, la unidad de comparación puede ser una parte integral de la unidad de control o puede ser un programa de aplicación configurado para interactuar con la unidad de control. La unidad de control y la unidad de supervisión pueden estar alojadas en la misma o en diferentes máquinas de procesamiento electrónico de datos.

Esto puede ser ventajoso ya que se puede evitar el uso de un primer dispositivo de medición de pH que está calibrado de forma diferente al segundo dispositivo de medición de pH y/o con valores de pH que tienen un efecto de desplazamiento debido al procedimiento de muestreo.

De acuerdo con los modos de realización, la recepción del segundo y el primer valor de pH, la recepción de la segunda y la primera concentración de CO₂ y la comparación de dichos valores de pH y concentración de CO₂ se realizan por la unidad de comparación. En caso de determinar que los segundo y primer dispositivos de medición de pH están calibrados de forma diferente, la unidad de comparación puede realizar una o más de las siguientes etapas:

- enviar un mensaje de advertencia;
- realizar automáticamente o activar la realización de una recalibración del primer dispositivo de medición de pH;
- realizar automáticamente o activar la realización de un reemplazo del primer dispositivo de medición de pH por un nuevo primer dispositivo de medición de pH.

Por tanto, se posibilita que un operario o un componente automatizado del primer biorreactor adopte las acciones apropiadas, por ejemplo, intercambiar o recalibrar el primer dispositivo de medición de pH y retrasar la inoculación del primer biorreactor hasta que se solucione el problema.

La unidad de comparación se puede, por ejemplo, proporcionar por o ejecutar en un aparato de procesamiento electrónico de datos o parte del mismo. El aparato comprende un procesador, memoria e instrucciones electrónicas almacenadas en el mismo. Tras procesar las instrucciones por el procesador, el procedimiento de los modos de realización de la invención se realiza por la unidad de comparación. En algunos modos de realización, la unidad de comparación está acoplada de forma operativa a uno o más programas de aplicación de supervisión y/o control de biorreactor. La unidad de comparación puede ser una parte integral de un sistema que comprende el primer y opcionalmente también el segundo biorreactor. El sistema, de acuerdo con algunos modos de realización, comprende biorreactores adicionales con estados que se van a supervisar y comparar con el estado del segundo biorreactor.

De acuerdo con los modos de realización, la unidad de comparación lee una relación específica del medio de un medio de almacenamiento de datos. La relación específica del medio es específica para el medio en el segundo y en el primer biorreactores e indica una relación entre el valor de pH del medio y una fracción respectiva de gas CO₂ en un volumen de gas cuando dicho medio está en estado de equilibrio pH-CO₂ con dicho volumen de gas y carece de un cultivo celular. A continuación, la unidad de comparación usa la primera concentración de CO₂ como entrada para la relación específica del medio para calcular un valor de pH absoluto esperado para el medio en el primer biorreactor en equilibrio pH-CO₂ a la temperatura y presión predefinidas y en ausencia de un cultivo celular. A continuación, la unidad de comparación (o un operario que usa el resultado de cálculo de la relación específica del medio) configura el primer dispositivo de medición de pH de modo que se emita el valor de pH absoluto calculado por dicho primer dispositivo de medición de pH. Por ejemplo, el primer dispositivo de medición de pH se calibra de modo que en futuras mediciones de pH, el primer dispositivo de medición de pH emita una suma de un primer valor de pH medido y un delta pH, siendo el delta pH la diferencia entre el primer valor de pH medido y el valor de pH esperado calculado usando la relación específica del medio.

La relación específica del medio puede ser, por ejemplo, una ecuación $PPH_{M1}(CO_2) = REL-M1(CO_2)$ obtenida ajustando matemáticamente múltiples pares determinados empíricamente de un valor de pH del medio (M1) y una fracción medida respectivamente de gas CO₂ en un volumen de gas por encima de dicho medio. De este modo:

– $PPH_{M1}(CO_2)$ es el valor de pH previsto en un medio (M1) cuando dicho medio carece de un cultivo celular y está en equilibrio pH-CO₂ con un volumen de gas por encima de dicho medio, comprendiendo dicho volumen de gas la concentración de CO₂ usada como parámetro de entrada;

– el CO₂ es un valor de parámetro de entrada y representa la concentración de CO₂ en un volumen de gas por encima del medio (M1) en el estado de equilibrio pH-CO₂ en ausencia del cultivo celular;

– REL-M1 es un conjunto de uno o más parámetros conectados por operadores.

Los parámetros se obtienen, por ejemplo, realizando manual, automática o semiautomáticamente las siguientes etapas:

– ajustar las muestras del medio M1 que carece del cultivo celular a múltiples valores de pH diferentes, dejando, de este modo, que las muestras alcancen el equilibrio pH-CO₂ con el volumen de gas por encima del medio en la muestra respectiva,

– determinar la fracción de gas CO₂ en un volumen de gas respectivo que está en equilibrio pH-CO₂ con el medio en las muestras,

– graficar las fracciones de gas CO₂ determinadas frente a los valores de pH en equilibrio respectivos de las muestras,

– ajustar una curva en los valores graficados y derivar los parámetros de la relación específica del medio a partir de la curva ajustada.

Por tanto, la relación específica del medio se puede identificar empíricamente, por ejemplo, antes de que se inocule el segundo o el primer biorreactor con el cultivo celular de referencia.

De acuerdo con algunos modos de realización, la relación específica del medio se obtiene llenando un biorreactor, por ejemplo, el segundo biorreactor, con el medio, con lo que el medio no comprende las células de cultivo celular, y ajustar la temperatura y la presión del segundo biorreactor a valores predefinidos, por ejemplo, 20 °C y presión atmosférica estándar. El medio en el biorreactor usado para determinar empíricamente la relación específica del medio se cita también en el presente documento como una de las muestras con un valor de pH que se va a establecer.

A continuación, se puede establecer el medio en diferentes valores de pH incrementando o disminuyendo la concentración de CO₂ en el volumen de gas por encima del medio por medio de una tasa de flujo de entrada de gas CO₂ modificada, y después de algún tiempo (típicamente minutos u horas) cuando el medio se ha equilibrado (alcanzado el estado de equilibrio pH-CO₂ al pH y la temperatura y presión predefinidas dados), se mide la concentración de CO₂ en el volumen de gas por encima de dicho medio (que se correlaciona con la presión parcial de CO₂ en dicho estado de equilibrio). Dicha medición se realiza, por ejemplo, analizando la concentración de CO₂ en el volumen de gas por encima del medio o por medio de la fracción volumétrica de CO₂ en el gas liberado. Los pares adquiridos de valores de pH y concentraciones de CO₂ (o valores de gas liberado CO₂) en equilibrio medidos en la muestra (biorreactor o alícuota) se grafican, es decir, se representan en un sistema de coordenadas. El gráfico se puede realizar automáticamente por un sistema de procesamiento electrónico de datos que, además, puede emitir la gráfica en forma de una impresión en papel y/o una gráfica visualizada en una pantalla de visualización. El gráfico también se puede realizar manualmente. Se ajusta una curva automática o manualmente a dicha gráfica y se calculan los parámetros que son descriptivos de dicha curva ajustada. Los parámetros definen la relación específica del medio del valor de pH y la concentración de CO₂ de un volumen de gas por encima de dicho medio cuando dicho medio está en equilibrio pH-CO₂ a un valor de pH particular. El valor de pH se establece preferentemente ajustando la tasa de flujo de entrada de CO₂, no añadiendo sustancias básicas o ácidas para evitar una modificación de la composición del medio.

Después de haber calculado los parámetros, se puede transferir la relación específica del medio a la unidad de comparación, por ejemplo, por medio de una interfaz gráfica de usuario que permita a un usuario introducir la relación manualmente, por medio de un medio de almacenamiento portátil o por medio de una conexión de red.

De acuerdo con otros modos de realización, la relación específica del medio se obtiene creando múltiples muestras en forma de alícuotas de dicho medio, teniendo cada muestra un valor de pH diferente. Las muestras se dejan a una temperatura y presión predefinidas durante algún tiempo para permitir el equilibrio pH-CO₂ entre el gas y el medio líquido en cada muestra.

Las muestras se pueden obtener secuencialmente, por ejemplo, cambiando el valor de pH de una única muestra y realizando mediciones secuenciales, o se pueden obtener creando múltiples muestras de dicho medio en paralelo, estableciéndose cada alícuota en un valor de pH diferente modificando la concentración de CO₂ del volumen de gas por encima del medio. La muestra se puede llenar en cualquier recipiente que permita el establecimiento y medición de un valor de pH actual y permita la modificación de la concentración de CO₂ y la medición de una concentración de CO₂ o una tasa gas liberado CO₂ en estado de equilibrio. Preferentemente, el valor de pH en las muestras respectivas se establece adaptando la tasa de flujo de entrada de CO₂ y, por tanto, la concentración de CO₂ en la fase gaseosa de un biorreactor de una manera que el valor de pH se adapte en consecuencia. Esto puede ser ventajoso ya que una modificación de la composición del medio (excepto el producto de disociación de CO₂ disuelto) no cambia cuando se usa CO₂ en lugar de ácidos o bases para adaptar el pH.

De acuerdo con algunos modos de realización, la ecuación $PPH_{M1}(CO_2) = REL-M1(CO_2)$ es una ecuación lineal de acuerdo con $PPH_{M1}(CO_2) = a_1 \times pH + a_2$. En este caso, los parámetros a_1 y a_2 son los parámetros derivados de la curva ajustada. El $PPH_{M1}(CO_2)$ indica el valor de pH previsto en un medio en estado de equilibrio con un volumen de gas que tiene la concentración de CO₂ particular usada como entrada para dicha ecuación.

De acuerdo con otros modos de realización, la ecuación $PPH_{M1}(CO_2) = REL-M1(CO_2)$ es una ecuación polinómica de acuerdo con $PPH_{M1}(CO_2) = b_1 \times pH^2 + b_2 \times pH + b_3$. En este caso, los parámetros b_1 , b_2 y b_3 son los parámetros derivados de la curva ajustada.

Determinar empíricamente la relación específica del medio y los correspondientes parámetros específicos del medio puede tener el efecto beneficioso de que incluso en caso de que no se conozca la composición exacta del medio (que es comúnmente el caso de muchos medios en el mercado), se puede determinar experimentalmente el impacto de un valor de pH particular en la concentración de CO₂ en equilibrio en un volumen de aire en equilibrio pH-CO₂ con dicho medio. Por tanto, se puede calcular un valor de pH absoluto y se puede usar para calibrar un dispositivo de medición de pH también cuando se usan tipos de medios con una composición que no es conocida.

De acuerdo con los modos de realización, las células de los cultivos celulares son células procariotas o eucariotas, en particular células de cultivo celular de mamífero.

De acuerdo con los modos de realización, el segundo biorreactor difiere del primer biorreactor con respecto a uno o más de los siguientes rasgos característicos:

- a) el volumen de gas en el biorreactor,
- b) el volumen de medio en el biorreactor,
- c) el número de Reynolds del biorreactor,
- d) el número de Newton del biorreactor,
- e) las dimensiones del biorreactor,
- f) los rasgos característicos geométricos del biorreactor y/o los deflectores del biorreactor,
- g) la configuración del agitador,
- h) la tasa de agitación,
- i) el coeficiente de transferencia de masa volumétrica para oxígeno (kLa) del biorreactor,
- j) la tasa de flujo de entrada de gas total y/o la tasa de flujo de entrada de O₂ y/o la tasa de flujo de entrada de N₂ y/o la tasa de flujo de entrada de CO₂,
- k) la entrada de potencia,
- l) la presión en el biorreactor,
- m) el tiempo de retención de burbujas de gas en el medio,
- n) el tamaño de burbujas de gas y distribución en el medio,
- o) la velocidad superficial,
- p) un parámetro calculado como derivado de uno o más de los parámetros a)-o);

q) la localización geográfica de los dos biorreactores (por ejemplo, diferentes países, ciudades, edificios)

El parámetro de "entrada de potencia" como se usa en el presente documento especifica la cantidad de entrada de potencia de un agitador de un biorreactor. Las diferentes configuraciones de agitador pueden tener diferentes entradas de potencia a agitación idéntica o velocidades de punta idénticas. La entrada de potencia a velocidades de agitador idénticas puede depender de la viscosidad del medio.

Comparando las concentraciones de gas liberado CO₂, se puede comparar fácilmente el estado de calibración de los dispositivos de medición de pH de dos biorreactores: las concentraciones de CO₂ idénticas en el gas liberado indican una calibración idéntica de los dispositivos de medición de pH de biorreactores diferentes, incluso en caso de que dichos biorreactores tengan diferentes números de Reynolds y/o Newton, tengan una velocidad o configuración diferente del agitador o similares.

De acuerdo con los modos de realización, la unidad de comparación recibe una tercera concentración de CO₂ y un tercer valor de pH. La tercera concentración de CO₂ es una concentración de CO₂ de un tercer volumen de gas por encima del medio en el segundo biorreactor. La tercera concentración de CO₂ y el tercer valor de pH se miden en un tercer tiempo. El tercer tiempo es un tiempo cuando el medio en el segundo biorreactor está en estado de equilibrio pH-CO₂ a una temperatura y presión predefinidas con el tercer volumen de gas y después de que dicho estado de equilibrio se modifique por el metabolismo del cultivo celular en el segundo biorreactor. El tercer valor de pH es un valor medido proporcionado por el segundo dispositivo de medición de pH.

A continuación, la unidad de comparación recibe una cuarta concentración de CO₂ y un cuarto valor de pH. La cuarta concentración de CO₂ es una concentración de CO₂ de un cuarto volumen de gas por encima del medio en el primer biorreactor. La cuarta concentración de CO₂ y el cuarto valor de pH se miden en un cuarto tiempo. El cuarto tiempo es un tiempo cuando el medio en el primer biorreactor está en estado de equilibrio pH-CO₂ a la temperatura y presión predefinidas con el primer volumen de gas y después de que dicho estado de equilibrio se modifique por el metabolismo del cultivo celular en el primer biorreactor. Por ejemplo, después de algunas horas o incluso días, algunas células comienzan a excretar sustancias, por ejemplo, lactato, en el medio que cambian el pH y/o la composición del medio. El cuarto valor de pH es un valor medido proporcionado por el primer dispositivo de medición de pH. El tiempo transcurrido entre el tercer tiempo y la inoculación del segundo biorreactor es idéntico al tiempo transcurrido entre el cuarto tiempo y la inoculación del primer biorreactor.

Además, la unidad de comparación recibe una segunda tasa de consumo de oxígeno medida del cultivo celular en el segundo biorreactor en el tercer tiempo y recibe una primera tasa de consumo de oxígeno medida del cultivo celular en el primer biorreactor en el cuarto tiempo.

En caso de que las segunda y primera tasas de consumo de oxígeno sean idénticas, la unidad de comparación compara los tercer y cuarto valores de pH y compara las tercera y cuarta concentraciones de CO₂ para determinar si los segundo y primer dispositivos de medición de pH están calibrados de forma diferente o para determinar si los segundo y primer dispositivos de medición de pH emiten diferentes valores de pH debido a los efectos de desplazamiento de un procedimiento de muestreo realizado para medir el tercer o el cuarto valor de pH en una muestra del medio de uno respectivo de los segundo y primer biorreactores.

Se determina que los segundo y primer dispositivos de medición de pH se van a calibrar de forma diferente o se determina que emiten diferentes valores de pH debido a los efectos de desplazamiento de un procedimiento de muestreo en caso de que se produzca una de las siguientes situaciones:

- las tercera y cuarta concentraciones de CO₂ son idénticas y los tercero y cuarto valores de pH difieren entre sí en más de un valor umbral; o
- los tercero y cuarto valores de pH son idénticos y las tercera y cuarta concentraciones de CO₂ difieren entre sí en más de otro valor umbral adicional.

Los modos de realización de la invención suponen que en caso de que la temperatura y la presión sean idénticas en el segundo y el primer biorreactor y en caso de que además la tasa de consumo de oxígeno sea idéntica, entonces las diferencias en los valores de pH medidos resultan de errores de calibración o efectos de desplazamiento de un procedimiento de muestreo para medir un valor de pH.

Dichos rasgos característicos pueden ser particularmente ventajosos ya que permiten determinar si dos dispositivos de medición de pH están calibrados de forma diferente o muestran efectos de desplazamiento de muestreo incluso en caso de que el metabolismo de las células haya comenzado a modificar el estado de equilibrio pH-CO₂ de un biorreactor, por ejemplo, excretando lactato (y sin tomar muestras para mediciones de pH fuera de línea). Se observó que a menudo la tasa de consumo de oxígeno de las células se correlaciona con el estado de un cultivo celular particular, por lo que en caso de que el OUR de los cultivos celulares en dos biorreactores sea idéntico y también las concentraciones de CO₂ en el gas liberado, la temperatura y la presión sean idénticas, cualquier diferencia de pH observada está provocada por errores de calibración o efectos de desplazamiento basados en el muestreo.

En otro aspecto, la invención se refiere a una unidad de comparación configurada para:

- 5 – recibir una segunda concentración de CO₂ y un segundo valor de pH, siendo la segunda concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un segundo volumen de gas por encima de un medio en el segundo biorreactor, midiéndose la segunda concentración de CO₂ y el segundo valor de pH en un segundo tiempo, siendo el segundo tiempo un tiempo cuando el medio en el segundo biorreactor está en estado de equilibrio pH-CO₂ a una temperatura y presión predefinidas con el segundo volumen de gas y antes de que dicho estado de equilibrio se modifique por el metabolismo de un cultivo celular en el segundo biorreactor, siendo el segundo valor de pH un valor medido
10 proporcionado por un segundo dispositivo de medición de pH acoplado de forma operativa a un segundo biorreactor;
- recibir una primera concentración de CO₂ y un primer valor de pH, siendo la primera concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un primer volumen de gas por encima de un medio en el primer biorreactor, midiéndose la primera concentración de CO₂ y el primer valor de pH en un primer tiempo, siendo el primer tiempo un tiempo
15 cuando el medio en el primer biorreactor está en estado de equilibrio pH-CO₂ a la temperatura y presión predefinidas con el primer volumen de gas y antes de que dicho estado de equilibrio se modifique por el metabolismo de un cultivo celular en el primer biorreactor, siendo el primer valor de pH un valor medido proporcionado por un primer dispositivo de medición de pH acoplado de forma operativa a un primer biorreactor;
- 20 – comparar los segundo y primer valores de pH y concentraciones de CO₂ para determinar si los segundo y primer dispositivos de medición de pH están calibrados de forma diferente o para determinar si los segundo y primer dispositivos de medición de pH emiten valores de pH diferentes debido a los efectos de desplazamiento de un procedimiento de muestreo realizado para medir el segundo o el primer valor de pH en una muestra del medio de uno respectivo de los segundo y primer biorreactores.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un sistema configurado para supervisar y/o minimizar las desviaciones de un estado del primer biorreactor del estado del segundo biorreactor. El sistema comprende una unidad de control para supervisar y/o controlar al menos el primer y opcionalmente también el segundo y uno o más biorreactores adicionales y comprende una unidad de comparación de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización descritos en el presente documento. El sistema comprende además al menos el primer biorreactor y el primer dispositivo de medición de pH. La unidad de control se configura para supervisar y/o controlar un estado de un cultivo celular al menos en el primer biorreactor, usando de este modo los valores de pH medidos repetidamente por el primer dispositivo de medición de pH.

35 De acuerdo con los modos de realización, el sistema comprende además el segundo biorreactor, con lo que los segundo y primer biorreactores están localizados en diferentes regiones geográficas y opcionalmente acoplados a la unidad de comparación por medio de una red, por ejemplo, Internet, para comunicar las concentraciones de CO₂ y los valores de pH.

40 De acuerdo con los modos de realización, el segundo tiempo es un tiempo antes de que el segundo biorreactor se inocule con un cultivo celular. El segundo tiempo también puede ser un tiempo en o después de la inoculación del segundo biorreactor con el cultivo celular y antes de que el metabolismo de dicho cultivo celular modifique el valor de pH del medio en el segundo biorreactor.

45 El primer tiempo es un tiempo antes de que el primer biorreactor se inocule con un cultivo celular. De forma alternativa, el primer tiempo es un tiempo en o después de la inoculación del primer biorreactor con el cultivo celular y antes de que el metabolismo de dicho cultivo celular modifique el valor de pH del medio en el primer biorreactor.

50 Un “perfil” como se usa en el presente documento es una representación de la variación en un valor de parámetro frente al tiempo.

Un “depósito”, como se usa en el presente documento, es un recipiente para contener, transportar o almacenar líquidos. Un depósito puede ser, por ejemplo, un biorreactor o un depósito de cosecha o transporte que comprende el medio, el cultivo celular y los productos de reacción de un biorreactor. Un depósito también puede ser una caja de
55 calibración que se llena con medio sin células y se usa para calibrar un dispositivo de medición de pH.

Una “caja de calibración”, como se usa en el presente documento, es un depósito con un medio conocido, con lo que el depósito está acoplado de forma operativa a un sensor de CO₂ y se configura para alojar temporalmente uno o más dispositivos de medición de pH para calibrar los dispositivos de medición de pH usando la concentración de gas liberado CO₂ medida por el sensor. Por ejemplo, la caja de calibración puede ser un biorreactor que actualmente no se usa para cultivar un cultivo celular, pero se usa única o predominantemente para calibrar dispositivos de medición de pH. De forma alternativa, la caja de calibración puede ser un recipiente de propósito especial, en particular un recipiente portátil que se puede transportar por una persona a diferentes lugares para calibrar los medidores de pH en diferentes laboratorios. La caja de calibración comprende un medio con propiedades conocidas (temperatura, presión, relación específica del medio conocida o composición conocida actual en caso de medios únicamente tamponados con bicarbonato) y comprende un sensor de CO₂ en el volumen de gas por encima del medio o en el gas
60
65

liberado de la caja de calibración. Además comprende una abertura para insertar y retirar fácilmente un dispositivo de medición de pH y puede comprender uno o más dispositivos de fijación para fijar temporalmente el uno o más dispositivos de medición de pH en la caja de calibración de modo que estén rodeados al menos parcialmente por el medio en la caja de calibración.

5

Una temperatura y presión “predefinidas”, como se usa en el presente documento, especifica una temperatura y presión que se controlan o al menos son conocidas por un operario del primer y/o el segundo depósito o que se controlan o al menos “son conocidas” por una lógica de programa configurada para hacer funcionar el primer y/o el segundo depósito o los dispositivos de medición de pH contenidos en el mismo. Por tanto, la temperatura y la presión “predefinidas” también se pueden denominar temperatura y presión “dadas”. Puede ser necesario cerciorarse de que los primer y segundo valores de pH y los primer y segundo valores de CO₂ se midan a la misma temperatura y presión dadas.

10

Una “unidad de comparación”, como se usa en el presente documento, es una lógica de programa, por ejemplo, un programa o módulo de aplicación, un chip de ordenador u otra parte de equipo informático o microcódigo que se configura para recibir y procesar uno o más valores de pH medidos y una o más concentraciones de CO₂ medidas en el gas liberado de un depósito para determinar si se ha producido un error de medición de pH. Por ejemplo, la unidad de comparación puede ser un módulo de programa que es parte de o interactúa con un programa informático de calibración o programa informático de supervisión o control de biorreactor.

15

20

Un dispositivo de medición de pH que está “acoplado de forma operativa” a un depósito puede ser, por ejemplo, un dispositivo de medición de pH que está localizado permanente o temporalmente dentro del depósito y está configurado para realizar mediciones de pH en línea.

25

Un “biorreactor” como se usa en el presente documento es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que implica organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Este proceso puede ser, por ejemplo, aeróbico o anaeróbico. Existe una pluralidad de tipos de biorreactores diferentes que varían en forma (por ejemplo, cilíndrica u otra), tamaño (por ejemplo, mililitros, de litros a metros cúbicos) y material (acero inoxidable, vidrio, plástico, etc.). De acuerdo con los modos de realización, el biorreactor se adapta para cultivar células o tejido en cultivos celulares. Dependiendo del modo de realización y/o del modo de funcionamiento, un biorreactor puede ser un biorreactor por lotes, un biorreactor por lotes alimentados o un biorreactor continuo (por ejemplo, un modelo de reactor de depósito agitado continuo). Un ejemplo de un biorreactor continuo es el quimiostato.

30

Una “medición en línea”, como se usa en el presente documento, es un procedimiento de obtención de un valor de medición que es descriptivo de los rasgos característicos de estado de un biorreactor o de un cultivo celular contenido en el mismo, con lo que la duración requerida para realizar la medición es más breve que el tiempo durante el que dichos rasgos característicos cambian significativamente. Un cambio significativo puede ser un cambio en más de un valor umbral predefinido. Por ejemplo, un cambio en más de un 5 % se puede considerar como un cambio significativo. El umbral puede variar para diferentes rasgos característicos. Las mediciones en línea pueden permitir controlar un biorreactor en tiempo real.

35

40

Una “medición fuera de línea” es un procedimiento de obtención de un valor de medición que es descriptivo de los rasgos característicos de estado de un biorreactor o de un cultivo celular contenido en el mismo, con lo que la duración requerida para realizar la medición es mayor que el tiempo durante el que dichos rasgos característicos pueden cambiar significativamente. Un cambio significativo puede ser un cambio en más de un valor umbral predefinido. Un ejemplo típico para una medición fuera de línea es el muestreo automatizado, semiautomatizado o manual de un medio, por ejemplo, para medir un valor de pH actual. Las mediciones fuera de línea se basan en un procedimiento de muestreo discontinuo. Ya que los rasgos característicos del biorreactor pueden haber cambiado desde que se tomó la muestra, controlar el biorreactor en base a datos de medición fuera de línea tiende a ser de baja calidad debido a tiempos de latencia significativos entre el momento de la medición y el momento de realizar una operación de control respectiva.

45

50

Un cambio significativo puede ser un cambio en más de un valor umbral predefinido, por ejemplo, un 2 % o cualquier otro valor porcentual, dependiendo del rasgo característico de estado respectivo. Un ejemplo típico para una medición fuera de línea es el muestreo automatizado, semiautomatizado o manual de una sonda del medio, por ejemplo, para medir un valor de pH actual para calibrar un dispositivo de medición de pH cuando se inicia un biorreactor.

55

Un procedimiento de muestreo discontinuo para obtener el valor de medición de una muestra puede tener la desventaja de que los rasgos característicos del biorreactor entretanto pueden haber cambiado. Por tanto, controlar el biorreactor en base a datos de medición fuera de línea tiende a ser de baja calidad debido a tiempos de latencia significativos entre el momento de la medición y el momento de realizar una operación de control respectiva.

60

Un “dispositivo de medición de pH” o “medidor de pH” como se usa en el presente documento es un dispositivo y/o sustancia usada para medir un valor de pH actual en un medio. Un medidor de pH puede ser, por ejemplo, un indicador de pH (como la fenolftaleína), en forma de solución o tiras de pH, o un aparato potenciométrico. De acuerdo con los modos de realización preferentes, el medidor de pH es un medidor de pH continuo, es decir, un medidor de pH que

65

puede medir continua y repetidamente el pH del medio de un biorreactor sin tener que extraer muestras y sin tener que insertar dicho medidor de pH en el medio para cada medición individual. Por ejemplo, un medidor de pH puede ser un voltímetro preciso, conectado al medio y a un electrodo de referencia, y escalado de tal manera que no visualice el potencial medido, sino el valor de pH listo. Preferentemente, el medidor de pH se sumerge en el medio y se usa para medir repetidamente el valor de pH actual en el medio durante todo el tiempo mientras se cultivan células en el biorreactor. Por ejemplo, el medidor de pH puede medir un valor de pH actual cada minuto, o cada 30 minutos, o cada hora. En el típico medidor de pH actual, el electrodo de referencia está integrado en el electrodo de pH, lo que hace que el dispositivo sea compacto.

Un “dispositivo de medición de CO₂”, “sensor de CO₂”, “medidor de CO₂” o “analizador de CO₂”, como se usa en el presente documento, es un dispositivo usado para medir una concentración de CO₂ actual en un volumen de gas, por ejemplo, el volumen de gas por encima del medio de un biorreactor o el gas liberado de un biorreactor. De acuerdo con los modos de realización, la concentración de CO₂ actual del segundo y/o el primer biorreactor se mide por un medidor continuo de gas liberado CO₂, es decir, un dispositivo que puede medir la concentración de CO₂ actual en el gas liberado de un biorreactor repetidamente sin tener que insertar o reemplazar un módulo de equipo informático en el biorreactor o en su tubería o tuberías de gas liberado conectadas para cada medición de concentración de CO₂. El uso de dispositivos de medición de pH continua y/o medidores continuos de gas liberado CO₂ puede ser ventajoso ya que se pueden realizar las mediciones respectivas fácil y repetidamente sin provocar efectos de desplazamiento y/o sin necesidad de tomar una muestra del medio. Muchos biorreactores existentes ya comprenden uno o más medidores de pH sumergidos y/o comprenden o están acoplados con dispositivos de medición que pueden medir la concentración de CO₂ y/o la tasa de gas liberado CO₂.

Dependiendo del modo de realización, el biorreactor (o biorreactor de referencia) comprende una única línea o tubería de entrada de gas o múltiples líneas o tuberías de entrada de gas. Por ejemplo, se puede usar una única línea o tubería de entrada de gas para suministrar aire ambiental o aire comprimido (ya expandido) de proveedores especiales al biorreactor (biorreactor de referencia). Dicho aire ambiental o aire comprimido puede consistir en una mezcla de gases, en particular N₂, O₂ y CO₂ que es típica de la atmósfera terrestre o tiene una composición diferente. Además o de forma alternativa, la única línea o tubería de entrada de gas o cualquiera de las otras líneas o tuberías de entrada de gas se pueden usar para suministrar gases individuales tales como N₂, O₂ y CO₂ al biorreactor, por ejemplo, para controlar la proliferación celular.

De acuerdo con los modos de realización, uno o cada uno de los dos biorreactores, respectivamente, comprende un microburbujeador para generar burbujas de gas muy finamente dispersas del gas entrante para acelerar el establecimiento de un equilibrio pH-CO₂ entre el medio y el volumen de gas en el biorreactor. Por ejemplo, se puede usar un microburbujeador para una mezcla de gas de flujo de entrada o para cada componente de gas de flujo de entrada individual por separado. Además, o de forma alternativa, uno o cada uno de los dos biorreactores se configura y se hace funcionar de modo que el dióxido de carbono y uno o más de otros gases (por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y/o aire) se añadan juntos simultáneamente al biorreactor como una mezcla de gases. Por ejemplo, se pueden introducir todos los gases de flujo de entrada al biorreactor como una mezcla de gases, por ejemplo, por medio de una abertura de tubería sumergida o un microburbujeador.

Preferentemente, todos los gases de procedimiento se introducen en el biorreactor por medio de un microburbujeador y/o en forma de una mezcla de gases en caso de que el volumen del biorreactor esté por debajo de un volumen umbral de, por ejemplo, 400 litros o, por ejemplo, 200 litros.

De acuerdo con los modos de realización, la tasa de aireación y el tamaño de burbuja de los gases de flujo de entrada en el medio del biorreactor se elige de modo que todas las burbujas de gas alcancen el equilibrio pH-CO₂ con el medio antes de abandonar el biorreactor o se disuelvan completamente en el medio.

Dichos rasgos característicos pueden ser ventajosos ya que garantizan que las burbujas de gas alcanzan el estado de equilibrio antes de que su contenido de gas abandone el biorreactor: un microburbujeador genera burbujas de gas muy finamente dispersas del gas entrante, acelerando de este modo el establecimiento de un equilibrio pH-CO₂ entre el medio y el volumen de gas en el biorreactor. Introducir el gas CO₂ como una mezcla de gases evita la situación de que la tasa de transición de CO₂ de una burbuja de gas CO₂ puro al medio sea mayor que la tasa de transición de CO₂ desde el medio a, por ejemplo, burbujas de aire o N₂ (la tasa de transición puede depender de la cantidad de diferencia de concentración de CO₂ entre el medio y diferentes tipos de burbujas). Por tanto, dichas medidas garantizan la comparabilidad del estado de los biorreactores en una amplia gama de volúmenes de biorreactores, incluyendo los volúmenes inferiores a, por ejemplo, 400 litros.

Un “perfil” como se usa en el presente documento es una representación de la variación en un valor de parámetro frente al tiempo.

El “equilibrio pH-CO₂” indica un estado de un sistema que comprende una solución acuosa (por ejemplo, un medio de cultivo celular) y un volumen de aire por encima de dicha solución (por ejemplo, el volumen de gas en un biorreactor) con un valor de pH y una presión parcial de CO₂ que están en equilibrio químico de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch. La presión parcial de CO₂ corresponde a la fracción de gas CO₂ en el volumen de gas total

por encima del medio. La ecuación de Henderson-Hasselbalch describe la relación del pH como una medida de acidez con la constante de disociación ácida (pKa), en sistemas biológicos y químicos. Si un gas que comprende CO₂ está en contacto con un líquido acuoso, por ejemplo, un medio de cultivo, al menos una pequeña fracción del CO₂ se disuelve en dicho líquido. A temperatura ambiente, por ejemplo, la solubilidad del dióxido de carbono es de aproximadamente 90 cm³ de CO₂ por 100 ml de agua (C₁/C_g = 0,8). Cualquier gas soluble en agua se vuelve más soluble a medida que disminuye la temperatura. Una pequeña fracción (aprox. 0,2 - 1 %) del CO₂ disuelto se convierte en H₂CO₃. La mayor parte del CO₂ permanece como CO₂ molecular solvatado. Este proceso se puede describir por las siguientes fórmulas:

Equilibrio del ácido carbónico (H₂CO₃):



$[H^+] \times [HCO_3^-] = K \times [CO_2] \times [H_2O]$, en la que K = constante de equilibrio

$$pH = pK + \log ([HCO_3^-] / [CO_2])$$

Una "fracción volumétrica de CO₂" como se usa en el presente documento es la fracción de gas CO₂ en un volumen de gas total. La unidad puede ser, por ejemplo, % v/v. También se denomina "concentración de CO₂" de un volumen de gas, especificándose la concentración en % v/v.

Un "medio" o "medio de cultivo celular" es un líquido o gel diseñado para sustentar el cultivo y típicamente la proliferación de microorganismos o células, o plantas pequeñas como el musgo *Physcomitrella*. Existen diferentes medios para cultivar diferentes tipos de células. Típicamente, un medio es una solución a base de agua que comprende una mezcla de una o más sustancias tales como sal(es), carbohidratos, oligoelementos, péptidos y/o proteínas. Existe una pluralidad de diferentes medios en el mercado, por ejemplo, para el cultivo celular de tipos de células específicas derivadas de plantas o animales, y el cultivo microbiológico para cultivar microorganismos, tales como bacterias o levaduras. Un medio puede ser, por ejemplo, un medio nutritivo, por ejemplo, un medio LB (caldo de lisogenia), un medio mínimo, un medio selectivo, un medio diferencial o un medio enriquecido. Algunos medios pueden requerir un entorno de CO₂ de, por ejemplo, un 5-10 % de CO₂ para mantener el pH fisiológico.

De acuerdo con algunos modos de realización, la expresión "dos medios son iguales" implica que los dos medios (por ejemplo, el medio en el biorreactor de referencia, por una parte, y el medio en el biorreactor supervisado y/o controlado, por otra parte) comprenden, dadas una presión, temperatura y concentración de CO₂ en el volumen de gas por encima de dicho medio particulares, la misma composición y concentración de compuestos y disolventes orgánicos e inorgánicos y/o se han fabricado usando los mismos protocolos y condiciones de fabricación dentro del contexto de exactitud de medición.

De acuerdo con algunos modos de realización, dicha expresión implica que los dos medios pueden diferir con respecto a cualquiera de dichos criterios (composición, concentración, protocolo de fabricación) solo en la medida en que dicha diferencia (a una temperatura, presión y concentración de CO₂ en el volumen de gas por encima de dicho medio dadas) no tenga ningún o aproximadamente ningún impacto en el equilibrio pH-CO₂ de dicho medio a una pluralidad de valores de pH diferentes y en la medida en que las relaciones específicas del medio derivadas empíricamente de dichos dos medios sean idénticas respectivamente.

"Cultivar un cultivo celular" como se usa en el presente documento típicamente significa que se hace proliferar el cultivo de células, es decir, se incrementa el número de células del cultivo celular. En algunas ocasiones, sin embargo, el número de células también se puede estancar o incluso disminuir.

En lo que sigue, se explican modos de realización de la invención con mayor detalle, solo a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos, en los que:

Figura 1 muestra un diagrama de bloques de un sistema para supervisar y/o controlar uno o más biorreactores configurados para detectar una desviación de calibración del dispositivo de medición de pH o un efecto de desplazamiento de medición de pH;

Figura 2 muestra un diagrama de flujo de procedimientos para detectar desviaciones de calibración del dispositivo de medición de pH o efectos de desplazamiento de medición de pH;

Figura 3 muestra los componentes de un biorreactor;

Figura 4 muestra diagramas que ilustran la dependencia de la concentración de CO₂ en el gas liberado de un biorreactor del valor de pH;

Figura 5 muestra una gráfica usada para obtener una relación de pH-concentración de CO₂ específica del medio;

Figura 6 muestra valores de pH de cuatro biorreactores diferentes medidos por respectivos medidores de pH mientras se cultiva un cultivo celular en los biorreactores respectivos;

Figura 7 muestra la fracción de CO₂ medida en el gas liberado de cada uno de los cuatro biorreactores;

Figura 8a es un diagrama que muestra los perfiles de estado derivado del gas liberado-CO₂ de dos biorreactores y de un biorreactor de referencia;

Figura 8b es un diagrama que muestra las diferencias de perfil de estado de los dos biorreactores de la fig. 8a con respecto a dicho biorreactor de referencia.

Figura 9 es una gráfica que ilustra que el procedimiento de muestreo da como resultado una desviación del valor de pH medido en la muestra con respecto al valor de pH en el depósito y que la manera en que se calibran los dispositivos de medición de pH también tiene un impacto en el valor de pH medido.

Descripción detallada

La **figura 1** muestra un diagrama de bloques de un sistema 100 que comprende una unidad de control 132 para supervisar y/o controlar uno o más biorreactores. El sistema 100 comprende una unidad de comparación 130 para comparar los valores de pH medidos y las concentraciones de CO₂ recibidas por medio de una interfaz 128 de dos o más biorreactores. En lo que sigue, se describirán modos de realización de la invención haciendo referencia a un procedimiento correspondiente para identificar diferencias de calibración y efectos de desplazamiento de muestreo de medición de pH como se indica en el diagrama de flujo de la **figura 2**.

La figura 1 muestra un sistema 100 que permite una comparación exacta y en tiempo real de los valores de pH medidos por dispositivos de medición de pH de dos o más biorreactores y de las concentraciones de CO₂ medidas por analizadores de gas liberado de los biorreactores respectivos para identificar diferencias de calibración y efectos de desplazamiento en dos biorreactores comparados inmediatamente, sin tener que tomar muestras del medio de uno de los biorreactores y sin necesidad de usar una solución "estándar" de un valor de pH conocido para determinar errores de calibración o efectos de desplazamiento.

El sistema 100 comprende un procesador 110, una memoria principal 112 y un medio de almacenamiento no transitorio 114. El medio de almacenamiento comprende instrucciones legibles por ordenador que, cuando se ejecutan por el procesador 110, hacen que el procesador realice un procedimiento para supervisar y/o controlar automáticamente uno o más biorreactores 102, 104, 106 como se describe para los modos de realización de la invención.

El medio de almacenamiento 114 comprende al menos una estructura de datos 136, por ejemplo, un archivo o un registro de base de datos, que es indicativa de una relación de pH-concentración de CO₂ que es particular para el medio M1 contenido en cualquiera de los biorreactores 102, 104, 106.

Además, el medio de almacenamiento puede comprender relaciones específicas del medio 138 de otros medios de cultivo celular M2. Las relaciones específicas del medio 136, 138 se pueden recibir por medio de una interfaz de comunicación de datos 120, por ejemplo, una interfaz de red, un puerto USB, una unidad de CDROM o similares.

El sistema 100 puede comprender además una interfaz 126 para recibir dinámicamente valores de medición actuales desde uno o más biorreactores supervisados y/o controlados 102, 104, 106. La interfaz 126 también puede ser una interfaz de red, por ejemplo, Internet o una Intranet. Los valores de medición son en particular un valor de pH actual y una concentración de CO₂ actual medida en el gas liberado del biorreactor respectivo. Una unidad de comparación 130 usa los valores de medición recibidos desde los biorreactores supervisados y/o controlados 102, 104, 106 para determinar si los dispositivos de medición de pH respectivos están calibrados de la misma manera y están libres de efectos de desplazamiento que prohíben una comparación correcta de los valores de pH medidos recibidos desde biorreactores diferentes. Opcionalmente, la unidad de comparación 130 también usa la relación específica del medio 136 del medio M1 como entrada para determinar si un dispositivo de medición de pH emite un valor de pH absoluto correcto.

El primer biorreactor 104 se inicia llenando el primer biorreactor con el medio sin células M1 y comenzando a añadir gas continuamente, por ejemplo, transportando aire ambiental y/o sus componentes individuales (N₂, O₂ y/o CO₂) al biorreactor y opcionalmente también comenzando a añadir líquidos continuamente (el medio sin células, opcionalmente líquidos adicionales tales como alimento, etc.). Además, se pueden encender los agitadores. De este modo, el primer biorreactor funciona a una temperatura y presión que son idénticas a la temperatura y presión usadas para iniciar el segundo biorreactor.

Después de un tiempo (típicamente minutos u horas), el medio en el primer biorreactor y el volumen de aire en el primer biorreactor por encima del medio habrán alcanzado el estado de equilibrio pH-CO₂ y se medirán los primeros valores de pH y concentración de CO₂ en el medio y gas liberado del primer biorreactor. Para establecer el medio en

el primer biorreactor en un valor de pH particular, la tasa de flujo de entrada de CO₂ al primer biorreactor se puede modificar en consecuencia, porque la concentración de CO₂ en el volumen de gas tiene un impacto en el valor de pH del medio.

5 En una segunda etapa 202, la unidad de comparación 130 recibe una segunda concentración de CO₂ CO_{2-R-M-ti} y un segundo valor de pH pH_{R-M-ti}. La segunda concentración de CO₂ es una concentración de CO₂ de un segundo volumen de gas por encima de un medio en un segundo biorreactor 102. Midiéndose la segunda concentración de CO₂ y el segundo valor de pH en un segundo tiempo ti. El segundo tiempo es un tiempo cuando el medio en el
10 segundo biorreactor está en un estado de equilibrio pH-CO₂ a una temperatura y presión predefinidas (por ejemplo, 20 °C y presión atmosférica normal) con el segundo volumen de gas y antes de que dicho estado de equilibrio se modifique por el metabolismo de un cultivo celular en el segundo biorreactor. Por ejemplo, el segundo tiempo ti es un tiempo antes de que el biorreactor 102 se inocule con el cultivo celular o un tiempo poco después de la inoculación para que el metabolismo de las células aún no tenga un impacto en el equilibrio pH-CO₂ en el biorreactor 102. El
15 segundo valor de pH es un valor medido proporcionado por un segundo dispositivo de medición de pH fuera de línea o en línea 142 acoplado de forma operativa al segundo biorreactor 102. En el ejemplo representado, el segundo dispositivo de medición de pH es un medidor de pH en línea sumergido en el medio M1 del segundo biorreactor 102.

En la siguiente etapa 204, la unidad de comparación recibe una primera concentración de CO₂ CO_{2-B1-M-ti} y un primer valor de pH pH_{B1-M-ti}. La primera concentración de CO₂ es una concentración de CO₂ de un primer volumen de gas
20 por encima de un medio en un primer biorreactor que se puede medir, por ejemplo, en el gas liberado del primer biorreactor 104. La primera concentración de CO₂ y el primer valor de pH se miden en un primer tiempo. El primer tiempo es un tiempo cuando el medio en el primer biorreactor 104 está en estado de equilibrio pH-CO₂ a la temperatura y presión predefinidas con el primer volumen de gas y antes de que dicho estado de equilibrio se modifique por el metabolismo de un cultivo celular en el primer biorreactor.

25 Por ejemplo, se puede usar un dispositivo analizador de CO₂ 122, también denominado “sensor de dióxido de carbono” para medir repetidamente la concentración de CO₂ en el gas liberado. Los ejemplos comunes de sensores de CO₂ son los sensores de gas infrarrojo (NDIR) y los sensores de gas químico. Los sensores NDIR son sensores espectroscópicos para detectar CO₂ en un entorno gaseoso por su absorción característica. De forma alternativa, el
30 sensor de CO₂ puede ser un sensor microelectromecánico.

El primer valor de pH es un valor medido proporcionado por un primer dispositivo de medición de pH 108 acoplado de forma operativa al primer biorreactor 104. El medio en el segundo y en el primer biorreactor son el mismo.

35 En algunos modos de realización, el segundo biorreactor 102, también denominado “biorreactor de referencia”, se usa para cultivar un cultivo celular días, semanas o incluso años antes de que se inocule el primer biorreactor 104 para cultivar un cultivo celular básicamente en las mismas condiciones que en el biorreactor de referencia anterior. En este caso, el segundo y el primer tiempo pueden estar separados por años, pero representan respectivamente un tiempo en el que se inicia el biorreactor respectivo y no comprenden (aún) un cultivo celular que tenga un impacto en el
40 equilibrio pH-CO₂. En este caso, el segundo valor de pH y la segunda concentración de CO₂ se miden antes de que se mida el primer valor de pH y la primera concentración de CO₂. En otros modos de realización, el segundo y el primer biorreactores se hacen funcionar en paralelo y los segundo y primer valores de pH y CO₂ se pueden medir y recibir por la unidad de comparación aproximadamente al mismo tiempo.

45 En la etapa 206, la unidad de comparación compara los segundo y primer valores de pH y las concentraciones de CO₂ para determinar si los segundo y primer dispositivos de medición de pH están calibrados de forma diferente.

La unidad de comparación determinará que los segundo y primer dispositivos de medición de pH están calibrados de forma diferente o que al menos uno de dichos dispositivos se ve afectado por un efecto de desplazamiento (provocado por el procedimiento de muestreo) en caso de que:
50

– las segunda y primera concentraciones de CO₂ sean idénticas y los segundo y primer valores de pH difieran entre sí en más de un valor umbral; o

55 – los segundo y primer valores de pH sean idénticos y las segunda y primera concentraciones de CO₂ difieran entre sí en más de otro valor umbral

En caso de que el segundo y el primer dispositivos de medición de pH sean ambos dispositivos de medición en línea, no existe ningún efecto de desplazamiento provocado por un procedimiento de muestreo. En este caso, la unidad de
60 comparación determina que hay una diferencia de calibración entre el segundo y el primer dispositivo de medición de pH y puede emitir un mensaje de advertencia y/o un delta de los segundo y primer valores de pH en el visualizador 134. El dispositivo de visualización puede ser, por ejemplo, un monitor de ordenador o un monitor de un teléfono inteligente. Por tanto, un operario puede prohibir la inoculación del primer biorreactor y realizar una recalibración o un intercambio del primer dispositivo de medición de pH. También es posible que el moderador o la unidad de comparación
65 reconfigure el primer dispositivo de medición de pH de manera que emita un valor que sea idéntico al segundo valor de pH para el medio en el primer biorreactor en el que se determinó que la concentración de CO₂ en equilibrio en la

fase de gas (liberado) era idéntica a la concentración de CO₂ en equilibrio en la fase de gas (liberado) del segundo biorreactor. En algunos modos de realización, la unidad de control 132 controla uno o más parámetros de uno o más de los biorreactores 102, 104, 106 de modo que se minimiza la diferencia de las condiciones ambientales para las células en el primer biorreactor con respecto a las condiciones ambientales para las células en el segundo biorreactor (de referencia). La unidad de control puede ser, por ejemplo, un módulo de programa informático y/o equipo informático que está acoplado de forma operativa a la unidad de comparación 130 para recibir los resultados de la comparación. La unidad de control puede controlar la configuración y el funcionamiento de uno o más procedimientos y parámetros de ingeniería. Por ejemplo, la unidad de control 132 se puede hacer funcionar para incrementar o disminuir el flujo de entrada de líquidos que tienen un impacto sobre el valor de pH, por ejemplo, puede incrementar o disminuir el flujo de entrada de un ácido cítrico o de una solución de NaOH 1 M y/o puede incrementar o disminuir el flujo de entrada de gas CO₂ para modificar el valor del pH en el medio de un biorreactor.

El medio M1 puede ser, por ejemplo, la modificación de Kaighn del medio F-12 de Ham que comprende, por ejemplo, putrescina, timidina, hipoxantina, cinc y niveles mayores de todos los aminoácidos y piruvato de sodio. Estas adiciones permiten que el medio se complemente con niveles muy bajos de suero o componentes definidos, para algunos tipos de células. El medio F-12K (de Kaighn) de Ham no contiene proteínas ni factores de crecimiento y, por lo tanto, a menudo se complementa con factores de crecimiento y suero fetal bovino (FBS) que se pueden optimizar para una línea celular particular. El medio F-12K (de Kaighn) de Ham usa un sistema tampón de bicarbonato de sodio (2,5 g/l). El medio M2 puede ser un medio LB, y pueden existir perfiles de referencia para una pluralidad de otros medios M3, M4, por ejemplo, para cultivar bacterias o plantas para una variedad de propósitos y "proyectos" correspondientes.

El sistema 100 comprende la unidad de comparación y uno o más biorreactores 104 106 que se han de supervisar y/o controlar por una unidad de control 132 acoplada de forma operativa al uno o más biorreactores. Como se puede deducir de la fig. 1, las dimensiones y los parámetros de ingeniería (tasa de agitación y configuración, tamaño de burbuja, dimensión, volumen de medio, etc.) de los biorreactores supervisados o controlados pueden diferir entre sí y/o pueden diferir de los parámetros respectivos del biorreactor de referencia. Los biorreactores 102, 104, 106 pueden estar localizados en diferentes regiones geográficas. Uno o más de los biorreactores envían datos de supervisión (pH y concentración de CO₂ actuales en las tasas de gas liberado y/o de gas liberado CO₂) a la unidad de comparación 130 y/o la unidad de control 132 y opcionalmente también reciben datos de control desde la unidad de control 132 o reciben datos de control para reconfigurar, recalibrar o intercambiar un dispositivo de medición de pH desde la unidad de comparación. El biorreactor de referencia puede, pero no tiene que, estar acoplado al sistema 100. Es suficiente que los segundos valores de pH y concentración de CO₂ recogidos del biorreactor de referencia sean accesibles por la unidad de comparación 130 cuando se inicia el primer biorreactor (o cualquier biorreactor adicional 106 con un dispositivo de medición de pH que se ha de calibrar de la misma manera que el segundo dispositivo de medición de pH y debe estar libre de cualquier efecto de desplazamiento con respecto a los valores de pH medidos por el segundo dispositivo de medición de pH 142). El segundo biorreactor y cada uno de los primeros biorreactores 104, 106 comprenden el mismo medio M1 y se inoculan con el mismo tipo de cultivo celular.

Preferentemente, el biorreactor supervisado y/o controlado 104, 106 al menos en el punto de tiempo de inicio se hace funcionar a la misma temperatura y presión que el biorreactor de referencia. Sin embargo, es posible que mientras se hace funcionar el biorreactor 104, 106, la temperatura y/o presión se modifique para minimizar las diferencias de estado con respecto al estado de cultivo celular en el biorreactor de referencia.

La figura 3 muestra un modo de realización de un biorreactor 102, 104, 106. El biorreactor está acoplado a una segunda tubería o manguera para transferir medio reciente y opcionalmente uno o más líquidos adicionales al biorreactor. Además, el biorreactor está acoplado a una salida y a una o más primeras tuberías o mangueras para transferir gases, por ejemplo, aire ambiental y/o gas N₂ y/o gas O₂ y/o gas CO₂ al biorreactor.

Además, el biorreactor está acoplado a una tercera tubería o manguera para el gas liberado. La primera tubería o manguera puede comprender un sensor 144 para determinar una tasa de flujo de entrada de gas total actual. La tercera tubería o manguera puede comprender un sensor 122, por ejemplo, un analizador de gas liberado CO₂, para medir selectivamente la concentración de CO₂ en el gas liberado y la cantidad de gas CO₂ transferido a través de la tercera tubería por unidad de tiempo. De acuerdo con otros modos de realización, puede que no haya tuberías para el flujo de entrada y flujo de salida de líquidos y se pueden alimentar los nutrientes al biorreactor por medio de la adición de bolo por etapas de una solución de alimentación.

En muchos tipos de biorreactores, los gases de flujo de entrada se alimentan (como una mezcla de gases o por medio de aberturas separadas) al biorreactor por medio de una o más tomas de gas sumergidas. En caso de que el biorreactor comprenda una aireación de espacio de cabeza adicional, la tasa de flujo de entrada de dicha fracción de gas de flujo de entrada de "espacio de cabeza" y/o la circulación de aire de la fase gaseosa por encima del medio se tienen que configurar de modo que todos los gases alimentados al biorreactor por medio de aireación de espacio de cabeza alcancen el equilibrio pH-CO₂ con el medio del biorreactor antes de abandonar el biorreactor. Además, en caso de que la aireación de espacio de cabeza sea el único mecanismo de aireación del biorreactor, la tasa de flujo de entrada de dicha fracción de gas de flujo de entrada de "espacio de cabeza" se tiene que configurar de modo que todos los gases alimentados al biorreactor alcancen el equilibrio pH-CO₂ con el medio del biorreactor antes de abandonar el biorreactor.

De forma alternativa (por ejemplo, en caso de que no se pueda alcanzar a tiempo un equilibrio pH-CO₂ de los gases de aireación de espacio de cabeza con el medio), se apaga la aireación de espacio de cabeza adicional antes de medir la concentración de CO₂ en el gas liberado para realizar la calibración del dispositivo de medición de pH o la detección de desplazamiento. Esto puede permitir evitar errores de calibración que podrían resultar de una desviación de la concentración de CO₂ en equilibrio en la fase gaseosa del biorreactor provocada por la aireación de espacio de cabeza adicional.

En caso de que durante la fase de inicio del segundo biorreactor no solo se añada medio reciente sino también líquidos adicionales tales como soluciones de alimentación y/o líquidos ácidos o básicos al segundo biorreactor, se añade la misma cantidad y composición de dichos líquidos adicionales al primer biorreactor durante el inicio para garantizar que, en el segundo y el primer tiempo, el medio (incluyendo todos los líquidos y sustancias adicionales) en el segundo y primer biorreactores sea idéntico.

La **figura 4** muestra los diagramas A, B, C y D que ilustran la dependencia de la concentración de CO₂ en el gas liberado de cuatro biorreactores diferentes I-IV del valor de pH y la independencia de dicha concentración de CO₂ de los parámetros de ingeniería y tamaño de los biorreactores respectivos.

Los cuatro biorreactores diferentes tienen las siguientes propiedades de ingeniería:

	Biorreactor I	Biorreactor II	Biorreactor III	Biorreactor IV
Volumen total (volumen del medio + fase gaseosa)	0,94 l	1,2 l	1,5 l	1,8 l
Tasa de aireación	26,3 ml/l/min	20,8 ml/l/min	16,6 ml/l/min	13,8 ml/l/min
Número de agitadores	1	1	2	2

Cada uno de dichos biorreactores I-IV se llenó con un medio de cultivo celular M1 particular que no comprendía ninguna célula. El valor de pH original de dicho medio fue de 6,85 (véase diagrama B). A continuación, el valor de pH se incrementó en cada uno de los biorreactores disminuyendo la concentración de CO₂ en el volumen de gas por encima de dicho medio en el biorreactor respectivo. Al principio de la prueba y para cada uno de un conjunto de valores de pH predefinidos, se permitió que el medio en cada biorreactor alcanzara el equilibrio pH-CO₂ con el volumen de gas por encima del medio a una temperatura y presión predefinidas, por ejemplo, 20 °C y presión atmosférica normal. Después de alcanzar dicho equilibrio, se determinó la concentración de CO₂ en % v/v del gas liberado total (también denominado "fracción de gas CO₂", "CO₂ [%]" o "FCO₂") para cada uno de dichos cuatro biorreactores (véase el diagrama A que muestra, en combinación con el diagrama B, el impacto del valor de pH en la concentración de CO₂ medida en el gas liberado). El diagrama 4 C) muestra el impacto del valor de pH en la concentración de CO₂ medida de cada uno de los cuatro biorreactores en forma de un gráfico de barras. La desviación máxima del CO₂ [%] obtenido para cada uno de los cuatro biorreactores fue inferior a un 0,4 % del gas liberado total del biorreactor.

El diagrama 4 D) es un gráfico que comprende los valores de CO₂ [%] medidos en cada uno de los cuatro biorreactores I-IV en cada uno de un conjunto de valores de pH (6,85, 6,95, 7,05, 7,15, 7,25, 7,35) en un tiempo cuando el medio M1 de dicho biorreactor alcanzó el estado de equilibrio pH-CO₂.

Cabe destacar que el equilibrio pH-CO₂ en un biorreactor se puede ver desafiado por la tasa de gas CO₂ que entra y/o abandona el biorreactor, por lo que el equilibrio pH-CO₂ puede ser, de hecho, un equilibrio dinámico. No obstante, es posible controlar un biorreactor de manera que se establezca el equilibrio pH-CO₂ dinámico a un valor de pH particular, por ejemplo, disminuyendo o incrementando la concentración de CO₂ en el volumen de gas por encima del medio en el biorreactor modificando la tasa de flujo de entrada de CO₂ total en el biorreactor. De forma alternativa, se puede modificar el valor del pH añadiendo sustancias o líquidos ácidos o básicos.

Preferentemente, el estado de equilibrio pH-CO₂ dinámico se establece en un biorreactor a un valor de pH particular únicamente controlando la tasa de flujo de entrada de CO₂ y la tasa de flujo de salida de gas total de una manera que se alcanza un valor de pH deseado. El uso de la concentración de CO₂ para establecer el equilibrio pH-CO₂ en lugar de añadir una sustancia básica o una ácida tiene la ventaja de que la composición del medio no se altera (excepto la concentración del CO₂ disuelto y sus productos de disociación) y, por tanto, la relación específica del medio se puede derivar empíricamente del mismo medio a diferentes valores de pH.

A continuación, se ajusta una curva 502 a la gráfica para determinar empíricamente los parámetros para una relación 316 que es específica para el medio M1 contenido en los cuatro biorreactores. Este enfoque permite determinar empíricamente, para un medio de cultivo celular particular, una relación específica del medio 136 usada como entrada por la unidad de comparación para predecir el valor de pH absoluto de un medio dada una concentración de gas liberado CO₂ medida cuando dicho medio tiene una presión y temperatura particulares (por ejemplo, 20 °C y presión atmosférica normal), carece de células y está en equilibrio pH-CO₂ con la fase gaseosa. La relación obtenida es independiente de la escala del biorreactor, la tasa de aireación y otros parámetros de ingeniería.

La relación específica del medio se determina solo una vez para un medio particular M1. La determinación se puede realizar en un único biorreactor, por ejemplo, en el segundo biorreactor 102 antes de que el segundo biorreactor se inocule con el cultivo celular. Para incrementar la exactitud, también es posible realizar la determinación en múltiples biorreactores u otros recipientes que permitan la medición de un valor de pH y una fracción de gas CO₂ (concentración de CO₂) y a continuación usar la información obtenida en los múltiples biorreactores o recipientes para obtener una curva ajustada más exacta 502. En el ejemplo representado en la figura 4D y 5, se usaron cuatro biorreactores diferentes para determinar empíricamente una curva ajustada 502 y una relación específica del medio correspondiente, entre el valor de pH en equilibrio y la concentración de CO₂ en equilibrio.

Se realizó otra prueba similar (no mostrada) con cuatro biorreactores que tienen un volumen de 400 l, 100 l, 2 l y 2 l y que comprenden el mismo tipo de medio. Los biorreactores comprendían dispositivos de medición de pH de diferentes tipos (por ejemplo, sondas Knick y Mettler), comprendían diferentes configuraciones de disposición del controlador (Siemens S7 frente a Sartorius DCU) y diferentes analizadores de gas liberado del mismo tipo (Dasgip/Eppendorf GA4). Los dispositivos de medición de pH se calibraron respectivamente usando tampones de calibración convencionales en dos puntos de pH conocidos (4 y 7) antes de sumergirlos en el medio de su biorreactor respectivo. En una etapa siguiente, cada uno de los cuatro dispositivos de medición de pH se recalibró por el uso de un quinto dispositivo de medición de pH precalibrado que se insertó secuencialmente en los medios de los cuatro biorreactores comparados. Los cuatro dispositivos de medición de pH se recalibraron al valor del quinto dispositivo de medición de pH. Después de esa recalibración, se midió la concentración de CO₂ en el gas liberado (valor de "FCO₂") de los cuatro biorreactores. Los cuatro valores de medición de FCO₂ obtenidos mostraron una diferencia ("delta") del valor máximo de los cuatro valores al valor mínimo de los cuatro valores de aproximadamente un 0,75 %.

A continuación, se minimizó la desviación del controlador de los cuatro biorreactores para establecer valores de pH reales comparables en los cuatro biorreactores. Después de esa minimización, se midió la concentración de CO₂ en el gas liberado ("FCO₂" o "CO₂ [%]") de los cuatro biorreactores. Los cuatro valores de medición de FCO₂ obtenidos mostraron una diferencia ("delta") del valor máximo de los cuatro valores al valor mínimo de los cuatro valores de aproximadamente un 0,27 %. Los resultados confirmaron que los biorreactores, con medios que están en estado de equilibrio pH-CO₂ tienen la misma concentración de CO₂ a los mismos valores de pH, independientemente del volumen del medio, el volumen total, la velocidad de aireación y los parámetros que dependen de la tasa de aireación, la velocidad del agitador y los parámetros que dependen de la velocidad del agitador y otros parámetros que dependen de la escala, la dimensión del biorreactor y similares.

Por lo tanto, en dicho estado de equilibrio, con una variabilidad de un 0,27 %, los desplazamientos de pH de menos de 0,02 unidades de escala de pH fueron detectables en este contexto de prueba. Por tanto, se proporciona un procedimiento altamente exacto para calibrar dispositivos de medición de pH.

La **figura 5** es una versión transformada del diagrama de la fig. 4 D). La relación específica del medio 136 del medio M1 es una ecuación $PPH(pH) = REL-M1(CO_2)$ obtenida ajustando matemáticamente múltiples pares determinados empíricamente de un valor de pH y una concentración [%] de CO₂ respectiva en la fase gaseosa por encima de dicho medio, estando la concentración de CO₂ en la fase gaseosa en equilibrio pH-CO₂ con dicho medio de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

La ecuación derivada empíricamente ajustando una curva lineal o polinómica a la gráfica de la fig. 5 permite predecir un valor de pH de un medio a la temperatura predefinida y la presión predefinida en caso de que el volumen de gas por encima de dicho medio esté en estado de equilibrio pH-CO₂ con dicho medio y tenga una concentración particular de CO₂. La predicción es específica para el medio M1 para el que la relación se obtuvo empíricamente.

El parámetro "CO₂" es un parámetro de entrada de dicha ecuación para introducir una concentración de CO₂ medida en una fase gaseosa que está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el medio de un biorreactor.

"REL-M1" es un conjunto de uno o más parámetros a1, a2, b1, b2, b3 conectados por operadores. Los parámetros se han obtenido ajustando muestras del medio M1 que carecen del cultivo celular a múltiples valores de pH diferentes como se describe anteriormente, dejando, de este modo, que las muestras alcancen el equilibrio pH-CO₂ a la presión y temperatura predefinidas, determinando las concentraciones de CO₂ en equilibrio en volúmenes de gas respectivos que están en contacto con el medio en las muestras, graficando las concentraciones de CO₂ en equilibrio medidas frente a los valores de pH en equilibrio respectivos de las muestras para generar la gráfica representada en la fig. 5, ajustando una curva 502 en los valores graficados y derivando los parámetros a1, a2 o b1, b2, b3 de la curva ajustada.

De acuerdo con algunos modos de realización, la ecuación $PPH_{M1}(CO_2) = REL-M1(CO_2)$ es una ecuación lineal de acuerdo con $PPH_{M1}(CO_2) [\%] = a1 \times CO_2 [\%] + a2$. En este caso, los parámetros a1 y a2 son los parámetros derivados de la curva ajustada. En el ejemplo representado, un ajuste lineal produciría la siguiente ecuación:

$PPH_{M1}(CO_2) = -0,046 \times CO_2 [\%] + 7,45$. En este ejemplo, a1=-0,046 y a2= 7,45.

De acuerdo con otros modos de realización, la ecuación $PPH_{M1}(CO_2) = REL-M1(CO_2)$ es una ecuación polinómica de

acuerdo con $PPH_{M1}(CO_2) = b_1 \times CO_2 [\%]^2 + b_2 \times CO_2 [\%] + b_3$.

El uso de un ajuste polinómico tiene la ventaja de que es más exacto que un ajuste lineal, aunque un ajuste lineal ya es lo suficientemente exacto para calcular un valor de pH absoluto usando únicamente la relación específica del medio 136 y una concentración de CO_2 CO_{2R-M-i} medida, por ejemplo, en el gas liberado de un biorreactor como entrada.

La **figura 6** muestra la variación de un valor de pH medido en cuatro biorreactores diferentes I-IV mientras se cultiva un cultivo celular en un medio particular M1 durante múltiples días para un proyecto de cultivo celular particular. Preferentemente, cada valor de pH se mide usando un dispositivo de medición de pH, por ejemplo, un medidor de pH potenciométrico, sumergido en el medio M1 del biorreactor en equilibrio pH- CO_2 de dicho medio. En cada biorreactor, al menos un valor de pH actual y una concentración de CO_2 actual en el gas liberado se miden repetidamente antes y después de la inoculación y durante todo el proyecto.

Por ejemplo, el proyecto podría ser cultivar células CHO (células de ovario de hámster chino) durante 14 días en el medio de cultivo celular M1 en condiciones óptimas o casi óptimas de proliferación celular hasta alcanzar una densidad celular de aproximadamente 100×10^5 células/mililitro.

La **figura 7** muestra la fracción de CO_2 ("concentración de CO_2 ") medida en el gas liberado de cada uno de los cuatro biorreactores con perfiles de valores de pH que se muestran en la fig. 6. Los valores de pH y las concentraciones de gas liberado CO_2 medidos para un biorreactor particular en un momento particular en el tiempo dependen entre sí, ya que la concentración de CO_2 en el volumen de gas por encima del medio influye en el valor del pH de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Además, el metabolismo celular puede tener un impacto tanto en el valor del pH (por medio de metabolitos excretados tales como lactato) como en la concentración de CO_2 en la fase gaseosa (por medio de la degradación aeróbica de los sustratos).

Mientras se cultivan las células en uno de los biorreactores, por ejemplo, en un biorreactor de referencia 102, se pueden determinar repetidamente el valor de pH actual y las concentraciones de gas liberado CO_2 actuales en el biorreactor de referencia 102 y se calcula un valor de parámetro derivado de al menos dichos dos valores de parámetros de entrada y se usa como un parámetro que es indicativo del estado actual del cultivo celular en el biorreactor de referencia. Se genera un perfil de dichos valores de parámetros derivados. Un perfil es una representación de la variación de dichos valores de parámetros frente al tiempo.

La **figura 8a** es un diagrama que muestra un perfil de estado de referencia 02 de un biorreactor de referencia 102, un perfil de estado 802 de un primer biorreactor supervisado y/o controlado 104 y otro perfil de estado 804 de un primer biorreactor supervisado y controlado 106. Cada perfil de estado es indicativo del estado de un biorreactor y su cultivo celular, con lo que se calcula el estado en un tiempo t_i particular como un derivado de al menos un valor de pH medido actualmente y una concentración de CO_2 medida actualmente en el gas liberado del biorreactor. Todos los biorreactores R, B1 y B2 comprenden el mismo medio M1, funcionan a la misma temperatura y presión y están en estado de equilibrio de pH con un volumen de gas respectivo en el tiempo t_0 . El tiempo t_0 representa un momento en el tiempo justo antes de que el biorreactor respectivo se inocule con un cultivo celular.

En el momento t_0 , el biorreactor de referencia R, también denominado "segundo biorreactor", el primer biorreactor B1 y el tercer biorreactor B2 se configuran y se hacen funcionar de modo que tengan la misma concentración de CO_2 en el gas liberado. Los medidores de pH de los respectivos biorreactores R y B2 pueden medir un valor de pH casi idéntico en el tiempo t_0 . Sin embargo, el dispositivo de medición de pH del biorreactor B1 puede medir un valor de pH diferente en t_0 que el medido por el dispositivo de medición de pH del biorreactor de referencia (no mostrado). Los dispositivos de medición de pH de los tres biorreactores pueden ser medidores de pH en línea sumergidos en el medio del biorreactor respectivo. En este caso, la unidad de comparación puede determinar que no hay diferencia de calibración entre los medidores de pH del segundo biorreactor/biorreactor de referencia R y el medidor de pH del primer biorreactor B2, pero existe una desviación de calibración entre los medidores de pH del biorreactor de referencia R y el biorreactor B1.

En el ejemplo representado, el valor de perfil del perfil de estado 804 del biorreactor supervisado 106 ("B2") en el tiempo t_0 es idéntico al valor de referencia del perfil de referencia 402 en el tiempo t_0 . El valor del perfil 802 del biorreactor supervisado 104 ("B4") en el tiempo t_0 difiere significativamente del valor de referencia del perfil de referencia 402 en el tiempo t_0 .

De forma alternativa, en lugar de los valores de perfil, se puede comparar la concentración de CO_2 del gas liberado de los dos biorreactores como se representa en la fig. 7 para determinar si los dispositivos de medición de pH de los dos biorreactores comparados se calibraron de forma idéntica. Los dos biorreactores se inician y se llenan con el mismo medio sin células a la misma presión y temperatura, y se miden un valor de pH actual y una concentración de CO_2 actual del medio en los dos biorreactores y se comparan cuando los dos biorreactores han alcanzado el equilibrio pH- CO_2 . Si la concentración de CO_2 en el gas liberado de los dos biorreactores es idéntica mientras que el valor de pH no lo es, o si los valores de pH de los dos biorreactores son idénticos y la concentración de CO_2 en el gas liberado no lo es, la unidad de comparación determina que los dos biorreactores se calibraron de forma diferente.

Los dispositivos de medición de pH calibrados incorrectamente pueden dar como resultado resultados inexactos cuando se comparan los estados de cultivo celular de dos cultivos celulares en base a perfiles de cultivo celular que se han derivado, únicamente o además de otros parámetros, de los valores de pH. Como consecuencia, también cualquier acción tomada por el controlador para minimizar la diferencia de estado puede fallar en minimizar las diferencias de estado (este efecto no se muestra en las figuras 8a y 8b, porque durante el cultivo del cultivo celular en el biorreactor B2, se modificó el equilibrio pH-CO₂ añadiendo una base e incrementando la tasa de flujo de entrada de gas total; por tanto, el perfil de B2 difiere significativamente del perfil de referencia, aunque los medidores de pH del biorreactor de referencia y del biorreactor B2 se calibraron de la misma manera.

Los medidores de pH calibrados incorrectamente pueden dar como resultado resultados inexactos cuando se comparan los estados de cultivo celular de dos cultivos celulares en base a los valores de pH de los biorreactores respectivos o cualquier otro parámetro de supervisión o control que sea un derivado de dichos valores de pH. Como consecuencia, también cualquier acción tomada por el controlador para minimizar la diferencia de pH puede fallar o puede dar como resultado una desviación de estado incluso mayor de los dos biorreactores comparados (este efecto no se muestra en las figuras 8a y 8b, porque durante el cultivo del cultivo celular en el biorreactor B2, se modificó el equilibrio pH-CO₂ añadiendo una base e incrementando la tasa de flujo de entrada de gas total; por tanto, el perfil de estado de cultivo celular de B2 difiere significativamente del perfil de estado de referencia, aunque los medidores de pH del biorreactor de referencia y del biorreactor B2 se calibraron de la misma manera).

Por ejemplo, se puede calcular el perfil de estado de un biorreactor antes y después de la inoculación con un cultivo celular como un perfil PACO. Un valor PACO PACO_{B1-ti}, PACO_{B2-ti} es indicativo de una desviación de una tasa de gas liberado CO₂ ACO_{B1-M-ti} medida en el biorreactor de una tasa de gas liberado CO₂ prevista ACO_{B1-EXP-ti}, ACO_{B2-EXP-ti}. La tasa de gas liberado CO₂ prevista es la tasa de gas liberado de dicho medio en el biorreactor en estado de equilibrio pH-CO₂ en ausencia del cultivo celular y con la condición de que el valor de pH del medio en estado de equilibrio sea idéntico al valor de pH del biorreactor 104, 106 cuando se mide la tasa de gas liberado CO₂ en el biorreactor. El valor PACO depende de la cantidad de gas liberado CO₂ producido por las células del cultivo celular en el biorreactor mientras se cultiva el cultivo celular. El cálculo del valor PACO PACO_{B1-ti}, PACO_{B2-ti} usa como entrada:

- la tasa de gas liberado CO₂ actual recibida ACO_{B1-M-ti}, ACO_{B2-M-ti};
- el valor de pH actual recibido pH_{B1-ti}, pH_{B2-ti};
- la tasa de entrada de gas total TGI_{B1}, TGI_{B2} del biorreactor en el tiempo ti de recepción de la tasa de gas liberado CO₂ actual; y
- la relación específica del medio 136.

El cálculo del valor PACO del biorreactor supervisado y/o controlado en un tiempo actual comprende calcular, para cada una de las tasas de gas liberado CO₂ y valores de pH actuales del biorreactor supervisado y/o controlado:

– la fracción de gas liberado CO₂ esperada FCO_{2B1-EXP-ti} de un volumen de gas de salida actual del biorreactor 104 de acuerdo con: FCO_{2B1-EXP-ti} = REL-M1 (pH_{B1-ti}), en la que FCO_{2B1-EXP-ti} es una fracción de gas liberado CO₂ prevista del volumen total de gas liberado (TGO_{B1}) del biorreactor 104 en % en el tiempo actual ti, calculándose la predicción usando el valor de pH actual recibido pH_{B1-ti} como entrada para REL-M1(pH_{B1-ti}), en la que REL-M1 es una relación específica del medio del medio M1 derivada empíricamente ajustando una gráfica tal como se representa, por ejemplo, en la fig. 4 D. El parámetro pH_{B1-ti} es el valor de pH actual recibido en el medio del biorreactor 104, 106 en un tiempo ti; por tanto, la fracción de gas liberado CO₂ esperada en el biorreactor se calcula bajo el supuesto de que el medio del biorreactor carece del cultivo celular, tiene el valor de pH usado como entrada de la relación específica del medio y está en estado de equilibrio pH-CO₂ con la fase gaseosa en el biorreactor por encima de dicho medio y, por tanto, también está en equilibrio con el volumen total de gas liberado de dicho biorreactor.

– un valor de la tasa de gas liberado CO₂ ACO_{B1-EXP-ti} [mol/min] esperada de acuerdo con: ACO_{B1-EXP-ti} [mol/min] = $\left(\frac{FCO_{2B1-EXP-ti} - [\%] \text{ ti}}{100} \right) \times TGI_{B1}$, en la que el valor ACO_{B1-EXP-ti} es la tasa de gas liberado CO₂ esperada del biorreactor (104) cuando el medio del biorreactor tiene el valor de pH medido actualmente y está en equilibrio pH-CO₂ con la fase gaseosa por encima de dicho medio, en la que la TGI_{B1} es la cantidad total de flujo de entrada de gas del biorreactor 104 en el tiempo (ti) actual; la cantidad total de flujo de entrada de gas del biorreactor es aproximadamente idéntica a la cantidad total de salida de gas;

– el valor PACO_{B1-ti} de acuerdo con: PACO_{B1-ti} = ACO_{B1-EXP-ti} - ACO_{B1-M-ti}, en la que ACO_{B1-M-ti} es la tasa de gas liberado CO₂ medida en el tiempo ti en el biorreactor 104.

Se puede calcular, en consecuencia, un valor PACO_{B1-ti} de referencia del biorreactor de referencia 102: PACO_{R-ti} = ACO_{R-EXP-ti} - ACO_{R-M-ti}, en la que ACO_{R-M-ti} es la tasa de gas liberado CO₂ medida en el tiempo ti en el biorreactor 102.

De acuerdo con algunos modos de realización, se realiza repetidamente la comparación mencionada anteriormente de los valores de PACO después de la inoculación del cultivo celular para identificar las desviaciones de estado del cultivo celular en el biorreactor 104 en comparación con el estado del cultivo celular correspondiente en el biorreactor de referencia 102.

5

Un valor "valor PACO" es un valor de datos. Un "valor FCO₂" es un valor de datos. Un "valor ACO" es un valor de datos. "FCO₂" o "CO₂ [%]", también denominada "concentración de CO₂" es la "fracción de gas CO₂" en un volumen de gas, por ejemplo, en el gas liberado de un biorreactor.

10

Un "perfil" es un conjunto de valores de datos o una relación matemática que indica la variación de un valor de parámetro a lo largo del tiempo. El valor de parámetro puede ser, por ejemplo, un valor PACO, una concentración de CO₂ en el gas liberado ("FCO₂"), una tasa de gas liberado CO₂ ("valor ACO") o el valor de pH obtenido de un biorreactor.

15

La **figura 8b** es un diagrama que muestra las diferencias de perfil de los perfiles de estado de cultivo celular 802, 804 de dos biorreactores 104, 106 con respecto al perfil de referencia 402 del biorreactor de referencia 102. La curva 810 representa las diferencias de perfil del biorreactor 104 y el biorreactor de referencia y la curva 808 representa las diferencias de perfil del biorreactor 106 y el biorreactor de referencia. Las diferencias de perfil del biorreactor 106 con respecto al perfil de referencia 402 son significativamente mayores que las diferencias del biorreactor 104, porque mientras se cultivó el cultivo celular en B2, se modificó el equilibrio pH-CO₂. La comparación de un perfil PACO con un perfil PACO de referencia permite identificar desviaciones de estado del cultivo celular en dos biorreactores comparados y adoptar las acciones apropiadas automática, semiautomática o manualmente para minimizar las diferencias de perfil. Se ha observado que diferencias de calibración entre los dispositivos de medición de pH pueden dar como resultado diferencias significativas en los perfiles de parámetros de control, por ejemplo, los perfiles PACO. Por tanto, el uso de un procedimiento de calibración de acuerdo con los modos de realización de la invención en la fase de inicio del biorreactor puede incrementar significativamente la exactitud de la comparación y sincronización del biorreactor y los estados de cultivo celular en un momento posterior en el tiempo.

20

25

30

La **figura 9** representa dos gráficas de cajas y bigotes que ilustran que el procedimiento de muestreo tiene un efecto sobre el valor de pH medido.

35

Mientras se realizaba un primer proyecto de cultivo celular P1, el valor de pH del medio de un biorreactor que comprendía el cultivo celular se midió repetidamente con un medidor de pH interno del biorreactor. Los valores de pH medidos por el medidor de pH interno del biorreactor en múltiples puntos de tiempo t₁, t₂,..., t_n se compararon con los valores de pH medidos por un segundo medidor de pH externo al biorreactor en muestras de medio extraídas en dichos puntos de tiempo respectivos t₁,..., t_n. Por tanto, los valores de datos representados por la gráfica de cajas y bigotes del proyecto P1 representan respectivamente la diferencia entre el valor de pH medido por el medidor de pH interno del biorreactor y externo al biorreactor en un tiempo respectivo t₁,..., t_n. Por tanto, la gráfica de cajas y bigotes para el proyecto P1 representa la variabilidad y distribución de las diferencias de pH ("efectos de desplazamiento de pH") generadas por el procedimiento de muestreo. Las muestras se templaron a 32 °C para garantizar una temperatura de medición de pH constante para todas las mediciones.

40

45

Se calibró el medidor de pH interno del biorreactor del proyecto P1 de acuerdo con un procedimiento del estado de la técnica, es decir, retirando del biorreactor el medidor de pH interno del biorreactor, calibrando el medidor de pH en el exterior del biorreactor con una solución de referencia de pH conocido, reintroduciendo el medidor de pH calibrado en el biorreactor y esterilizando en autoclave el biorreactor.

50

Además, en el proyecto P1, se compararon repetidamente los valores de pH medidos por el medidor de pH interno del biorreactor con los valores de pH medidos por el medidor de pH externo al biorreactor en muestras del medio del biorreactor. En caso de que la comparación revelara que una diferencia (es decir, un "desplazamiento") entre los dos valores de pH comparados era mayor que un umbral dado, se recalibró el medidor de pH interno del biorreactor. Antes de la inoculación, tuvo lugar una recalibración del medidor de pH interno del biorreactor independientemente del desplazamiento ("calibración de objetivo principal"). El desplazamiento de pH del proyecto P1 promedia alrededor de "-0,01" y, por tanto, está muy cerca de cero. Esto no es sorprendente ya que los valores de medición de pH obtenidos por el medidor de pH externo al biorreactor se usaron como referencia para calibrar el medidor de pH interno del biorreactor, nivelando, de este modo, en gran medida los efectos de desplazamiento. Sin embargo, una desventaja de este enfoque de calibración es que el valor de pH "verdadero" absoluto del medio en el biorreactor y la magnitud del efecto de desplazamiento siguen siendo desconocidos. La variabilidad es muy alta con solo un 50 % de todos los puntos de datos dentro de +/- 0,05 pH, mientras que más de un 25 % de todos los desplazamientos son mayores de 0,07 unidades de escala de pH.

60

65

También se observó y confirmó una disparidad entre las mediciones de pH en línea y fuera de línea (realizadas por medidores de pH internos del biorreactor y externos al biorreactor), por ejemplo, por Heather Evans *et al.*: "Dealing with Disparity in On-line and Off-line pH Measurements Genentech found pH drift in its on-line measurements for a cell culture process, and continues to investigate its cause" cuando se realizaron mediciones de pH y pruebas de calibración del medidor de pH similares como se describe para el proyecto P1. Heather Evans *et al.*, consideraron que

la capacidad de controlar el pH dentro de un intervalo de $\pm 0,10$ unidades de pH es fundamental para garantizar un rendimiento de procedimiento consecuente y consistente en términos tanto de productividad como de calidad del producto.

- 5 La gráfica de cajas y bigotes del segundo proyecto P2 se obtuvo como se describe para el proyecto P1. Sin embargo, en lugar de calibrar el medidor de pH interno del biorreactor de acuerdo con el enfoque del estado de la técnica, el medidor de pH interno del biorreactor se calibra de acuerdo con un modo de realización de la invención usando una tasa de gas liberado CO₂ calculada que se calculó para el medio usado y para la temperatura y presión actuales
- 10 tomando como entrada una concentración de CO₂ medida en el gas liberado del biorreactor. Por tanto, se realizó repetidamente la calibración del medidor de pH interno del biorreactor (después del llenado de medios y el establecimiento de un equilibrio pH-CO₂ y antes de la inoculación con un cultivo celular ya que los metabolitos celulares cambiarían el equilibrio) usando una relación específica del medio entre el valor de pH y la tasa de gas liberado CO₂ como se describe para los modos de realización de la invención.
- 15 El desplazamiento de pH observado entre el medidor de pH extra e intrabiorreactor promedia alrededor de $+ 0,11$, revelando, de este modo, que la magnitud del efecto de desplazamiento es más de 0,1 unidades de pH de alto. En cuanto a P1, se tomaron las muestras a 32 °C y los medidores de pH usados fueron electrodos de vidrio. La variabilidad de la medición de pH fuera de línea permanece comparable, ya que el procedimiento de muestreo y el procedimiento de medición de pH fuera de línea en P1 y P2 son los mismos.
- 20 En total, se obtuvieron 1070 valores de datos para generar las dos gráficas de cajas y bigotes para los proyectos P1, P2 en la fig. 9 (P1: N = 607 y P2: N = 463). En ambos proyectos, se usaron electrodos de vidrio a una temperatura definida como medidores de pH intra y extrabiorreactor.
- 25 Como se puede deducir de las dos gráficas, la variabilidad de los desplazamientos de pH determinada en ambos proyectos P1, P2 es similar. Los desplazamientos del valor de pH están provocados por el procedimiento de muestreo en ambos casos.
- 30 Sin embargo, como también se puede deducir de la fig. 9, la media de los desplazamientos de pH del proyecto P1 difiere de la media de los desplazamientos obtenidos para el proyecto P2 en casi 0,1 unidades de escala. Esta “diferencia de medias de desplazamiento de pH” está provocada por diferentes procedimientos usados para calibrar los medidores de pH internos del biorreactor en los proyectos P1 y P2. También se provocarían las diferencias de la media de valores de pH cambiando el procedimiento de muestreo, por ejemplo, incrementando el tiempo entre tomar una muestra y realizar realmente la medición de pH en la muestra.
- 35 Como se puede deducir de la fig. 9, se puede suponer que las mediciones de pH fuera de línea son la causa primordial de la variabilidad del pH. El cambio en el desplazamiento promedio se debe a los desplazamientos generales que se añaden por el muestreo, los tiempos de retención de muestra, los descensos de temperatura, la desgasificación de dióxido de carbono durante el muestreo y la medición fuera de línea, así como los desplazamientos específicos del procedimiento de medición fuera de línea usado. Los datos del analizador de gasometría (no mostrados) suministran diferentes desplazamientos. Otros procedimientos de medición de pH fuera de línea (no mostrados), nuevamente, suministran diferentes desplazamientos.
- 40

Lista de números de referencia

5	100	sistema para supervisar y/o controlar los estados de cultivo celular en un biorreactor
	102	primer biorreactor ("de referencia")
	104	segundo biorreactor B1
10	106	biorreactor adicional B2
	108	dispositivo de medición de pH
15	110	procesador
	112	memoria
	114	medio de almacenamiento
20	120	interfaz para recibir una o más relaciones específicas del medio
	122	analizador de gas liberado CO ₂
25	124	analizador de gas liberado CO ₂
	126	analizador de gas liberado CO ₂
	128	interfaz para recibir parámetros de medición de dos o más biorreactores
30	130	unidad de comparación
	132	unidad de control
35	134	visualizador
	136	relación específica del medio para el medio M1
	138	relación específica del medio para el medio M2
40	140	sensor para flujo de entrada de gas total
	142	dispositivo de medición de pH
45	144	sensor para flujo de entrada de gas total
	146	dispositivo de medición de pH
	202-206	etapas
50	402	perfil de estado del biorreactor de referencia 102
	502	relación específica del medio graficada para cuatro biorreactores
55	802	perfil de estado de un biorreactor
	804	perfil de estado de un biorreactor
	808	diferencia de perfil de estado con respecto al perfil de referencia
60	810	diferencia de perfil de estado con respecto al perfil de referencia
	M1	medio de cultivo celular
65	TGI _{B1}	total gas influx into biorreactor B1

	TGI _{B2}	flujo de entrada de gas total al biorreactor B2
	TGI _R	flujo de entrada de gas total al biorreactor de referencia
5	TGO _{B1}	gas liberado total del biorreactor B1
	TGO _{B2}	gas liberado total del biorreactor B2
	TGO _R	gas liberado total del biorreactor de referencia
10	TL1 _{B1}	flujo de entrada de líquido total al biorreactor B1
	TLI _{B2}	flujo de entrada de líquido total al biorreactor B2
15	TLI _R	flujo de entrada de líquido total al biorreactor de referencia
	TLO _{B1}	salida total (líquido) del biorreactor B1
	TLO _{B2}	salida total (líquido) del biorreactor B2
20	TLO _R	salida total (líquido) del biorreactor de referencia

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar si un primer dispositivo de medición de pH (108; 146) acoplado de forma operativa a un primer depósito (104; 106) se ve afectado por un problema de medición de pH, siendo el problema que el primer dispositivo de medición de pH está calibrado de forma diferente a un segundo dispositivo de medición de pH (142) acoplado de forma operativa a un segundo depósito (102), comprendiendo el procedimiento:
 - recibir (202), por una unidad de comparación (130), una primera concentración de CO₂ y un primer valor de pH, siendo la primera concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un primer volumen de gas por encima de un medio (M1) en el primer depósito, midiéndose la primera concentración de CO₂ y el primer valor de pH en un primer tiempo, siendo el primer tiempo un tiempo cuando el medio en el primer depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el primer volumen de gas a una temperatura y presión predefinidas, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, siendo el primer valor de pH un valor medido proporcionado por el primer dispositivo de medición de pH (108; 146);
 - recibir (202), por la unidad de comparación (130), una segunda concentración de CO₂ y un segundo valor de pH, siendo la segunda concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un segundo volumen de gas por encima del mismo tipo de medio (M1) contenido en el segundo depósito, midiéndose la segunda concentración de CO₂ y el segundo valor de pH en un segundo tiempo, siendo el segundo tiempo un tiempo cuando el medio en el segundo depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el segundo volumen de gas a la temperatura y presión predefinidas, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, siendo el segundo valor de pH un valor medido proporcionado por el segundo dispositivo de medición de pH (142);
 - comparar (206), por la unidad de comparación, los primer y segundo valores de pH y comparar las primera y segunda concentraciones de CO₂ para determinar si el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por el problema de medición de pH.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, haciéndose la determinación de que el primer dispositivo de medición de pH tiene un problema de medición de pH en caso de que:
 - las primera y segunda concentraciones de CO₂ sean idénticas y los primer y segundo valores de pH difieran entre sí en más de un valor umbral; o
 - los primer y segundo valores de pH sean idénticos y las primera y segunda concentraciones de CO₂ difieran entre sí en más de otro valor umbral; o
 - un primer valor de datos difiera de un segundo valor de datos en más de otro umbral, derivándose el primer valor de datos del primer valor de pH y la primera concentración de CO₂, derivándose el segundo valor de datos del segundo valor de pH y la segunda concentración de CO₂.
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones previas,
 - siendo el primer depósito un biorreactor o un depósito de cosecha y/o
 - siendo el segundo depósito un biorreactor, en particular un biorreactor de referencia, o un depósito de cosecha, en particular un depósito de cosecha de referencia.
4. Un procedimiento para determinar si un primer dispositivo de medición de pH (108; 146; 160) acoplado de forma operativa a un primer depósito (104; 106) se ve afectado por un problema de medición de pH, siendo el problema que el primer dispositivo de medición de pH está calibrado incorrectamente, comprendiendo el procedimiento:
 - recibir (202), por una unidad de comparación (130), una primera concentración de CO₂ y un primer valor de pH, siendo la primera concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un primer volumen de gas por encima de un medio (M1) en el primer depósito, midiéndose la primera concentración de CO₂ y el primer valor de pH en un primer tiempo, siendo el primer tiempo un tiempo cuando el medio en el primer depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el primer volumen de gas a una temperatura y presión predefinidas, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, siendo el primer valor de pH un valor medido proporcionado por el primer dispositivo de medición de pH (108; 146);
 - calcular (204), por la unidad de comparación, un segundo valor de pH como función de la primera concentración de CO₂, siendo el segundo valor de pH el valor de pH previsto para dicho tipo de medio (M1) cuando dicho medio está en estado de equilibrio pH-CO₂ con un segundo volumen de gas por encima de dicho medio (M1) a la temperatura y presión predefinidas, teniendo el segundo volumen de gas en dicho equilibrio una segunda concentración de CO₂ que es idéntica a la primera concentración de CO₂, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, comprendiendo el cálculo del segundo valor de pH:

– leer, por la unidad de comparación (130), una relación específica del medio (136) de un medio de almacenamiento de datos (114), siendo la relación específica del medio específica para el medio (M1) e indicar una relación entre el valor de pH del medio (M1) y una fracción respectiva de gas CO₂ en un volumen de gas cuando dicho medio está en estado de equilibrio pH-CO₂ con dicho volumen de gas y carece de un cultivo celular;

– introducir la primera concentración de CO₂ en la relación específica del medio para calcular un valor de pH absoluto esperado para el medio en equilibrio pH-CO₂ a la temperatura y presión predefinidas y en ausencia de un cultivo celular, usándose el valor de pH absoluto como el segundo valor de pH calculado;

– comparar (206), por la unidad de comparación, los primer y segundo valores de pH para determinar si el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por el problema de medición de pH.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, siendo la relación específica del medio una ecuación $PPH_{M1}(CO_2) = REL-M1(CO_2)$ obtenida ajustando matemáticamente múltiples pares determinados empíricamente de un valor de pH del medio (M1) y una fracción medida respectivamente de gas CO₂ en un volumen de gas, en la que:

– $PPH_{M1}(CO_2)$ es el valor de pH previsto en un medio (M1) cuando dicho medio carece de un cultivo celular y está en equilibrio pH-CO₂ con un volumen de gas por encima de dicho medio, comprendiendo dicho volumen de gas la concentración de CO₂ usada como parámetro de entrada;

– el CO₂ es un valor de parámetro de entrada y representa la concentración de CO₂ en un volumen de gas por encima del medio (M1) en el estado de equilibrio pH-CO₂ en ausencia del cultivo celular;

– en la que REL-M1 es un conjunto de uno o más parámetros (a1, a2, b1, b2, b3) conectados por operadores, habiéndose obtenido los parámetros:

▪ ajustando las muestras del medio (M1) que carece del cultivo celular a múltiples valores de pH diferentes, dejando, de este modo, que las muestras alcancen el equilibrio pH-CO₂ con el volumen de gas por encima del medio en la muestra respectiva,

▪ determinando la fracción de gas CO₂ en un volumen de gas respectivo que está en equilibrio pH-CO₂ con el medio en las muestras,

▪ graficando las fracciones de gas CO₂ determinadas frente a los valores de pH en equilibrio respectivos de las muestras,

▪ ajustando una curva (502) en los valores graficados y derivando los parámetros (a1, a2 o b1, b2, b3) de la relación específica del medio a partir de la curva ajustada.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, haciéndose la determinación de que el primer dispositivo de medición de pH tiene un problema de medición de pH en caso de que:

– los primer y segundo valores de pH difieran entre sí en más de un valor umbral; o

– un primer valor de datos difiera de un segundo valor de datos en más de otro umbral, derivándose el primer valor de datos del primer valor de pH, derivándose el segundo valor de datos del segundo valor de pH.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones previas 3-6, siendo el primer depósito un biorreactor o un depósito de cosecha o una caja de calibración.

8. Un procedimiento para calibrar o recalibrar un primer dispositivo de medición de pH (108; 146) que comprende:

a) realizar el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para determinar que el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por un problema de medición de pH; y calibrar el primer dispositivo de medición de pH de modo que emita el mismo valor de pH que el segundo dispositivo de medición de pH en caso de que las primera y segunda concentraciones de CO₂ sean idénticas; o

b) realizar el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 para determinar que el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por un problema de medición de pH; y calibrar el primer dispositivo de medición de pH de modo que emita el mismo valor de pH que el valor de pH calculado como función de la primera concentración de CO₂.

9. Un procedimiento de funcionamiento de un depósito que comprende un primer dispositivo de medición de pH (108; 146), siendo el primer dispositivo de medición de pH un dispositivo de medición en línea, comprendiendo el procedimiento:

- cultivar un cultivo celular en el depósito, comprendiendo el depósito un medio de proliferación, midiendo repetidamente, de este modo, el pH en el medio de proliferación por el primer dispositivo de medición de pH;
- 5 – reemplazar el medio de proliferación y el cultivo celular contenido en el mismo en el depósito por un medio (M1) para el que es conocida una relación entre el pH y el CO₂ en equilibrio;
- después de haber reemplazado el medio de proliferación, realizar el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-8 para determinar si el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por un problema de medición de pH;
- 10 – si se detectó un problema de medición de pH, calibrar el primer dispositivo de medición de pH de modo que emita el mismo valor de pH que el valor de pH calculado como función de la primera concentración de CO₂ para el medio (M1);
- 15 – después de haber calibrado el primer dispositivo de medición de pH, reemplazar el medio en el depósito por el medio de proliferación.
- 10. Un procedimiento de determinación de los efectos de desplazamiento de pH provocados por tomar una muestra de medio de un primer depósito, comprendiendo el procedimiento proporcionar un dispositivo de medición de pH fuera de línea externo al depósito (160) y proporcionar el primer depósito (104, 106), comprendiendo el primer depósito un primer dispositivo de medición de pH (108, 146), siendo el primer dispositivo de medición de pH un dispositivo de medición de pH en línea localizado dentro del primer depósito y estando rodeado al menos parcialmente por el medio (M1) en el primer depósito, comprendiendo además el procedimiento:
- 20 – realizar el procedimiento de acuerdo con la opción b) de la reivindicación 8 para calibrar el primer dispositivo de medición de pH;
- transferir el dispositivo de medición de pH fuera de línea externo al depósito (160) a una caja de calibración que comprende el mismo tipo de medio (M1) que el primer depósito; y realizar el procedimiento de acuerdo con la opción b) de la reivindicación 8 usando la caja de calibración como depósito que comprende el dispositivo de medición de pH que se va a calibrar (160), usando, de este modo, la caja de calibración como un recipiente con un sensor de gas liberado CO₂ que se usa para medir la primera concentración de CO₂ y usar la misma función para calcular el segundo valor de pH como se usó para calibrar el primer dispositivo de medición de pH;
- 30 – después de haber calibrado el primer dispositivo de medición de pH (108, 146) y el dispositivo de medición de pH externo al depósito (160):
 - medir, por el primer dispositivo de medición de pH, un primer valor de pH actual del medio en el primer depósito, siendo el primer valor de pH actual un valor de medición en línea;
 - tomar una muestra del medio del primer depósito y llenar la muestra en un recipiente portátil (162);
 - posicionar el dispositivo de medición de pH externo al depósito de modo que esté al menos parcialmente rodeado del medio en el recipiente de muestra;
 - medir, por el dispositivo de medición de pH externo al depósito, un segundo valor de pH actual del medio en el recipiente de muestra, siendo el segundo valor de pH actual un valor de medición fuera de línea;
 - 50 ▪ en caso de que los primer y segundo valores de pH actuales difieran en más de un umbral, determinar que el procedimiento de muestreo provocó un efecto de desplazamiento de pH y, opcionalmente, determinar la magnitud del efecto de desplazamiento como la diferencia del primer y segundo valor de pH actual.
- 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende además:
- 55 – recibir (202) una tercera concentración de CO₂ y un tercer valor de pH, siendo la tercera concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un tercer volumen de gas por encima del medio en el primer depósito, midiéndose la tercera concentración de CO₂ y el tercer valor de pH en un tercer tiempo, siendo el tercer tiempo un tiempo cuando el medio en el primer depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ a una temperatura y presión predefinidas con el tercer volumen de gas y después de que dicho estado de equilibrio se modifique por el metabolismo del cultivo celular en el primer depósito, siendo el tercer valor de pH un valor medido proporcionado por el primer dispositivo de medición de pH (142);
- 60 – recibir (204) una cuarta concentración de CO₂ y un cuarto valor de pH, siendo la cuarta concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un cuarto volumen de gas por encima del medio en el segundo depósito, midiéndose la cuarta concentración de CO₂ y el cuarto valor de pH en un cuarto tiempo, siendo el cuarto tiempo un tiempo cuando
- 65

- el medio en el segundo depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ a la temperatura y presión predefinidas con el segundo volumen de gas y después de que dicho estado de equilibrio se modifique por el metabolismo del cultivo celular en el segundo depósito, siendo el cuarto valor de pH un valor medido proporcionado por el segundo dispositivo de medición de pH (108, 146), siendo el tiempo transcurrido entre el tercer tiempo y la inoculación del primer depósito idéntico al tiempo transcurrido entre el cuarto tiempo y la inoculación del segundo depósito;
- 5 – recibir una primera tasa de consumo de oxígeno medida del cultivo celular en el primer depósito en el tercer tiempo;
- 10 – recibir una segunda tasa de consumo de oxígeno medida del cultivo celular en el segundo depósito en el cuarto tiempo;
- 15 – en caso de que las primera y segunda tasas de consumo de oxígeno sean idénticas, comparar (206) los tercer y cuarto valores de pH y las concentraciones de CO₂ para determinar si los primer y segundo dispositivos de medición de pH están calibrados de forma diferente.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones previas, estando el primer dispositivo de medición de pH rodeado al menos parcialmente por el medio dentro del primer depósito, en el que:
- 20 – el primer depósito carece de medios para tomar manual o automáticamente una muestra del medio en el segundo depósito; o
- 25 – el primer depósito comprende medios para tomar manual o automáticamente una muestra del medio en el primer depósito, comprendiendo además el procedimiento: durante un intervalo de tiempo después de llenar el medio en el primer depósito y antes de añadir un cultivo celular al medio en el primer depósito, mantener todas las aberturas de los medios de muestreo cerradas.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones previas, estando el segundo dispositivo de medición de pH rodeado al menos parcialmente por el medio dentro del segundo depósito en el que:
- 30 – el segundo depósito carece de medios para tomar manual o automáticamente una muestra del medio en el segundo depósito; o
- 35 – el segundo depósito comprende medios para tomar manual o automáticamente una muestra del medio en el segundo depósito, comprendiendo además el procedimiento: durante un intervalo de tiempo después de llenar el medio en el segundo depósito y antes de añadir un cultivo celular al medio en el segundo depósito, mantener todas las aberturas de los medios de muestreo cerradas.
- 40 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones previas 1-3, 10-13, usándose el procedimiento para determinar si el segundo dispositivo de medición de pH está calibrado de forma diferente al primer dispositivo de medición de pH, realizándose la determinación de si el primer y segundo dispositivo de medición de pH están calibrados de forma diferente mientras el segundo dispositivo de medición de pH está rodeado al menos parcialmente del medio en el segundo depósito y sin tomar una muestra del medio del segundo depósito para realizar dicha determinación.
- 45 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones previas 1-3, 10-14, realizándose la determinación de si el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por un problema de medición de pH usando las primera y segunda concentraciones de CO₂ y los primer y segundo valores de pH como la única entrada de datos para dicha determinación.
- 50 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones previas, comprendiendo además el procedimiento:
- 55 – realizar una medición en línea con el primer dispositivo de medición de pH para medir el primer valor de pH, estando el primer dispositivo de medición de pH rodeado al menos parcialmente del medio en el primer depósito; y/o
- 60 – realizar una medición en línea por un primer sensor de CO₂ (124, 126) en el gas liberado del primer depósito para proporcionar la primera concentración de CO₂.
- 65 17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones previas 1-3, 10-16, que comprende además:
- realizar una medición en línea con el segundo dispositivo de medición de pH para medir el segundo valor de pH, estando el segundo dispositivo de medición de pH rodeado al menos parcialmente del medio en el segundo depósito; y/o
- realizar una medición en línea por un segundo sensor de CO₂ (122) en el gas liberado del segundo depósito para proporcionar la segunda concentración de CO₂.

18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones previas, comprendiendo el procedimiento, en caso de determinar que el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por un problema de medición de pH, realizar una o más de las siguientes etapas por la unidad de comparación:

- enviar un mensaje de advertencia;
- realizar automáticamente o activar la realización de una recalibración del primer dispositivo de medición de pH;
- realizar automáticamente o activar la realización de un reemplazo del primer dispositivo de medición de pH por un nuevo primer dispositivo de medición de pH.

19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones previas 1-3, 10-18, difiriendo el primer depósito (104, 106) del segundo depósito (102) con respecto a uno o más de los siguientes rasgos característicos:

- a) el volumen de gas en el depósito,
- b) el volumen de medio en el depósito,
- c) el número de Reynolds del depósito,
- d) el número de Newton del depósito,
- e) las dimensiones del depósito,
- f) los rasgos característicos geométricos del depósito y/o los deflectores del depósito,
- g) la configuración del agitador,
- h) la tasa de agitación,
- i) el coeficiente de transferencia de masa volumétrica para oxígeno (kLa) del depósito,
- j) la tasa de flujo de entrada de gas total y/o la tasa de flujo de entrada de O₂ y/o la tasa de flujo de entrada de N₂ y/o la tasa de flujo de entrada de CO₂,
- k) la entrada de potencia,
- l) la presión en el depósito,
- m) el tiempo de retención de burbujas de gas en el medio,
- n) el tamaño de burbujas de gas y distribución en el medio,
- o) la velocidad superficial,
- p) un parámetro calculado como derivado de uno o más de los parámetros a)-o);
- q) la localización geográfica de los dos depósitos.

20. Una unidad de comparación (130) configurada para:

- recibir (202), una primera concentración de CO₂ y un primer valor de pH, siendo la primera concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un primer volumen de gas por encima de un medio (M1) en un primer depósito, midiéndose la primera concentración de CO₂ y el primer valor de pH en un primer tiempo, siendo el primer tiempo un tiempo cuando el medio en el primer depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el primer volumen de gas a una temperatura y presión predefinidas, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, siendo el primer valor de pH un valor medido proporcionado por el primer dispositivo de medición de pH (108; 146);

- recibir (202) una segunda concentración de CO₂ y un segundo valor de pH, siendo la segunda concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un segundo volumen de gas por encima del mismo tipo de medio (M1) contenido en el segundo depósito, midiéndose la segunda concentración de CO₂ y el segundo valor de pH en un segundo tiempo, siendo el segundo tiempo un tiempo cuando el medio en el segundo depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el segundo volumen de gas a la temperatura y presión predefinidas, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, siendo el segundo valor de pH un valor medido proporcionado

por el segundo dispositivo de medición de pH (142);

– comparar (206) los primer y segundo valores de pH y comparar las primera y segunda concentraciones de CO₂ para determinar si el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por el problema de medición de pH.

21. Una unidad de comparación (130) configurada para:

– recibir (202) una primera concentración de CO₂ y un primer valor de pH, siendo la primera concentración de CO₂ una concentración de CO₂ de un primer volumen de gas por encima de un medio (M1) en un primer depósito, midiéndose la primera concentración de CO₂ y el primer valor de pH en un primer tiempo, siendo el primer tiempo un tiempo cuando el medio en el primer depósito está en estado de equilibrio pH-CO₂ con el primer volumen de gas a una temperatura y presión predefinidas, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, siendo el primer valor de pH un valor medido proporcionado por el primer dispositivo de medición de pH (108; 146);

– calcular (204) un segundo valor de pH como función de la primera concentración de CO₂, siendo el segundo valor de pH el valor de pH previsto para dicho tipo de medio (M1) cuando dicho medio está en estado de equilibrio pH-CO₂ con un segundo volumen de gas por encima de dicho medio (M1) a la temperatura y presión predefinidas, teniendo el segundo volumen de gas en dicho equilibrio una segunda concentración de CO₂ que es idéntica a la primera concentración de CO₂, no viéndose afectado dicho estado de equilibrio por el metabolismo de ningún cultivo celular, comprendiendo el cálculo del segundo valor de pH:

– leer, por la unidad de comparación (130), una relación específica del medio (136) de un medio de almacenamiento de datos (114), siendo la relación específica del medio específica para el medio (M1) e indicar una relación entre el valor de pH del medio (M1) y una fracción respectiva de gas CO₂ en un volumen de gas cuando dicho medio está en estado de equilibrio pH-CO₂ con dicho volumen de gas y carece de un cultivo celular;

– introducir la primera concentración de CO₂ en la relación específica del medio para calcular un valor de pH absoluto esperado para el medio en equilibrio pH-CO₂ a la temperatura y presión predefinidas y en ausencia de un cultivo celular, usándose el valor de pH absoluto como el segundo valor de pH calculado;

– comparar (206) los primer y segundo valores de pH para determinar si el primer dispositivo de medición de pH se ve afectado por el problema de medición de pH.

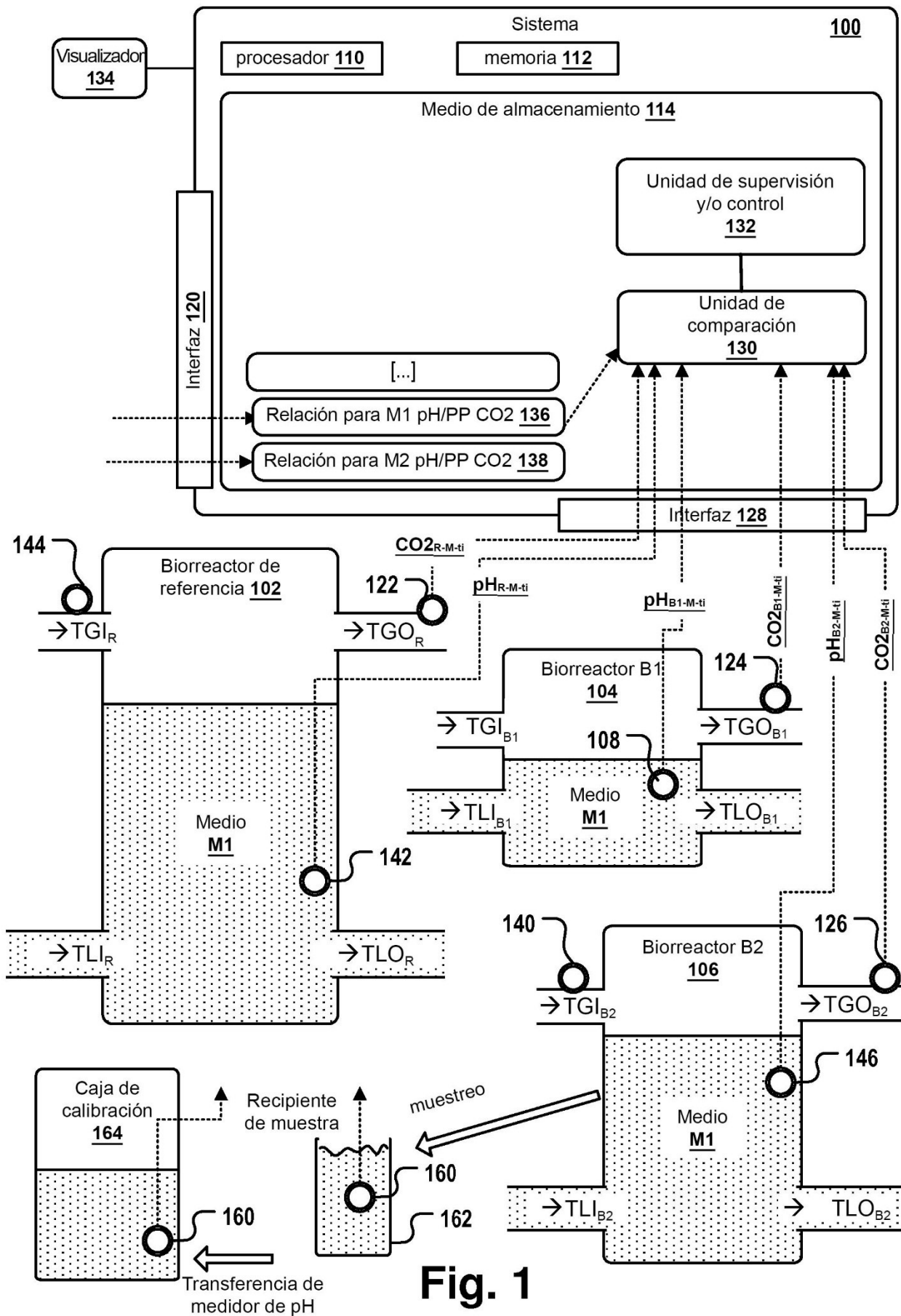
22. Un sistema (100) configurado para supervisar y/o controlar un estado de un primer depósito, comprendiendo el sistema:

– la unidad de comparación (130) de la reivindicación 20 o 21;

– una unidad de control (132) acoplada de forma operativa a la unidad de comparación (130); y

– el primer depósito (104, 106) y el primer dispositivo de medición de pH;

– estando configurada la unidad de control para supervisar y/o controlar un estado de un cultivo celular en el primer depósito, usando de este modo los valores de pH medidos repetidamente por el primer dispositivo de medición de pH como entrada.



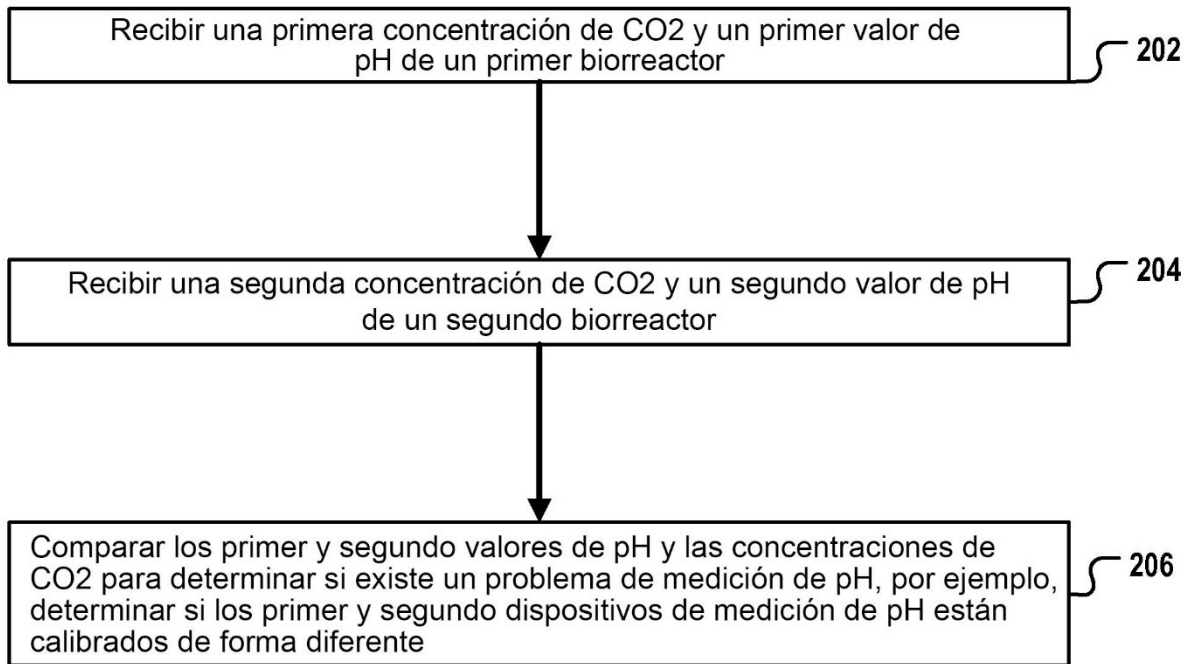


Fig. 2

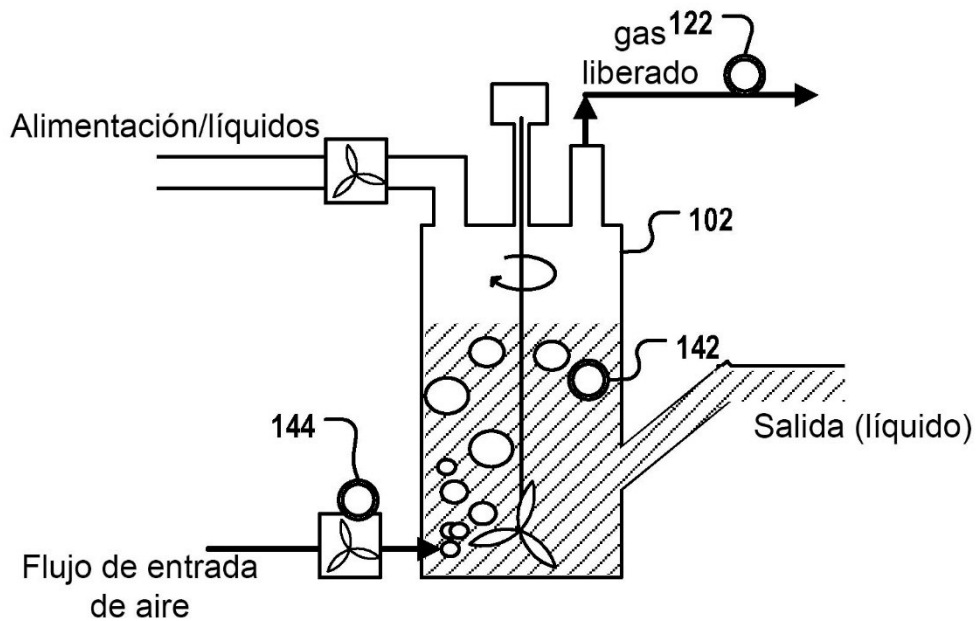


Fig. 3

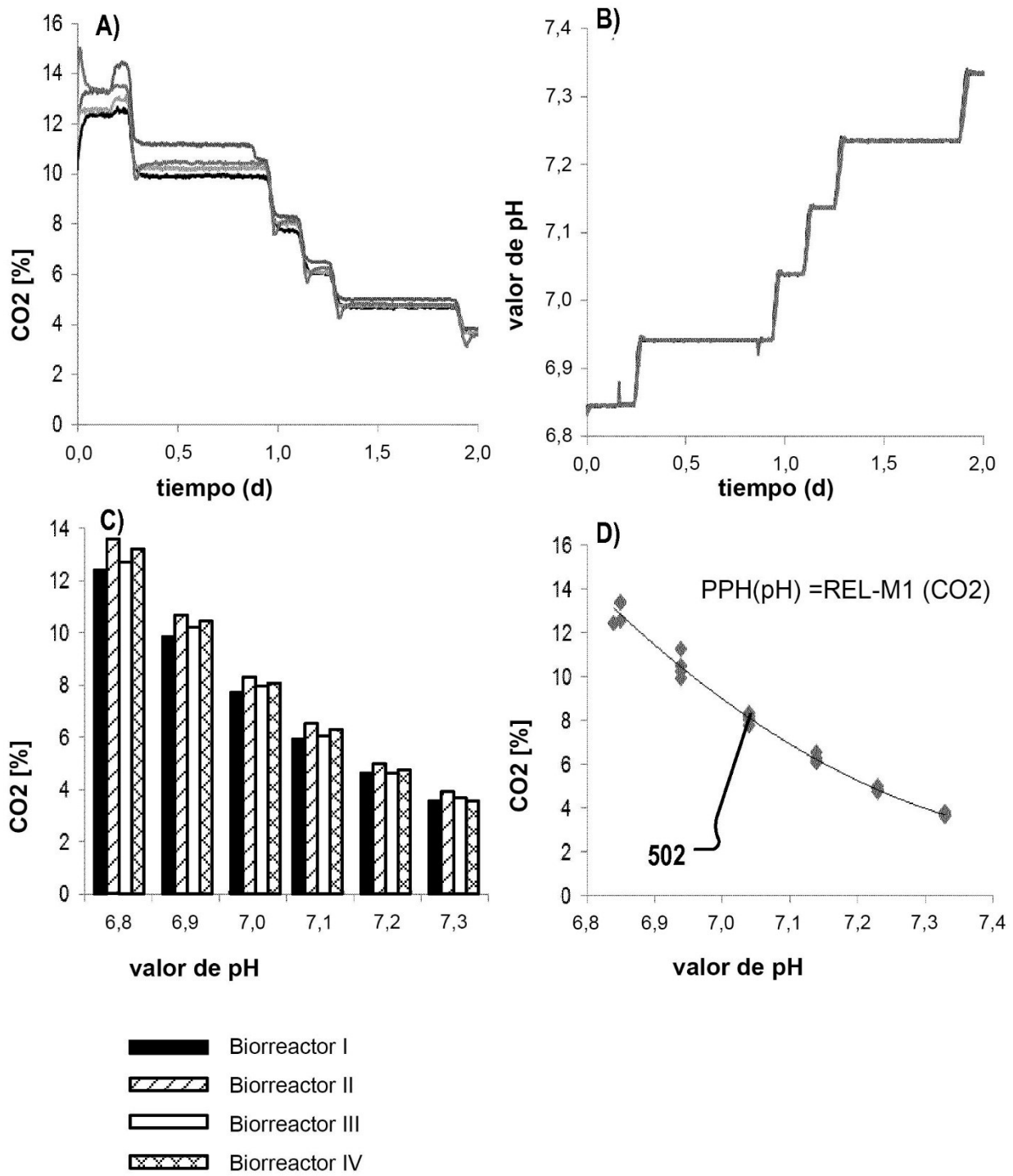


Fig. 4

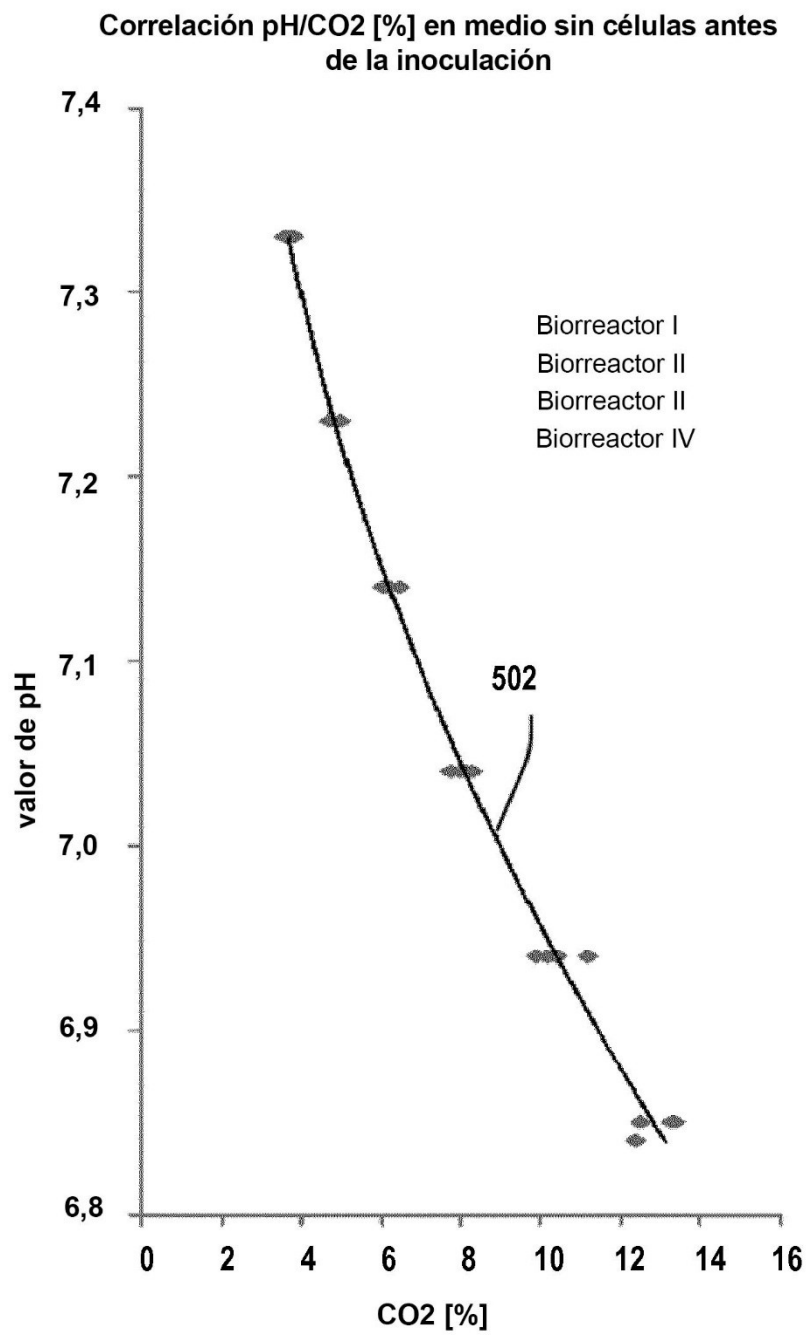
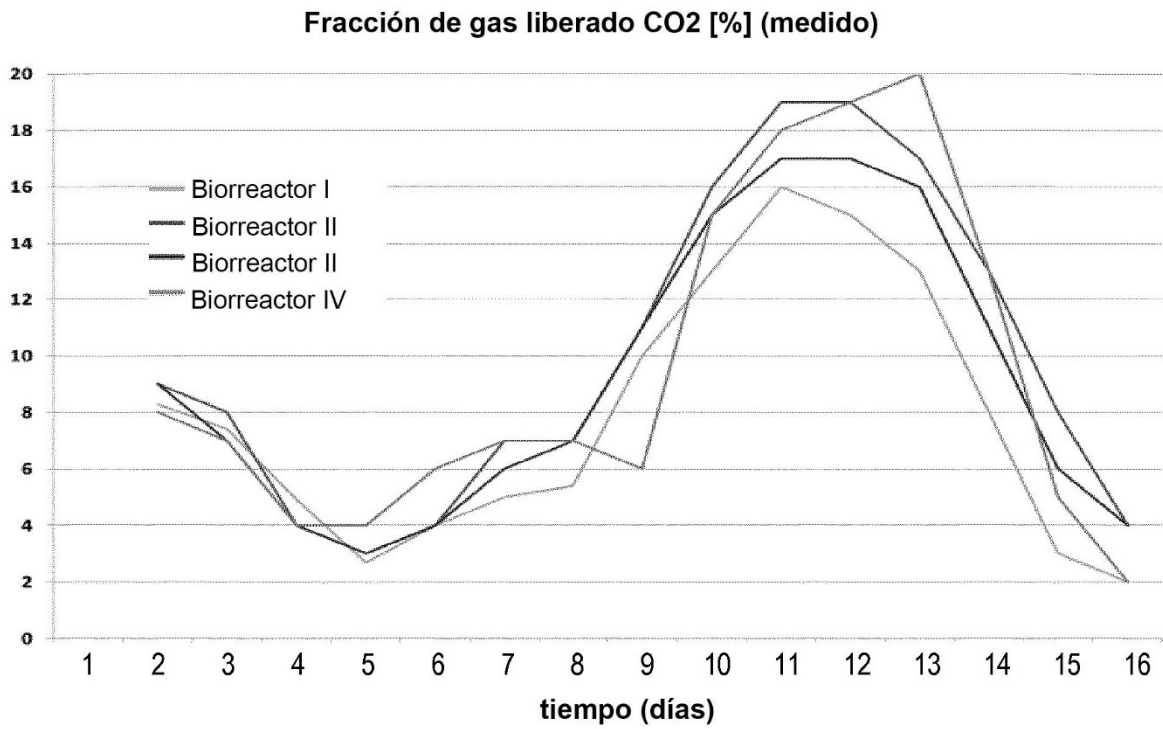
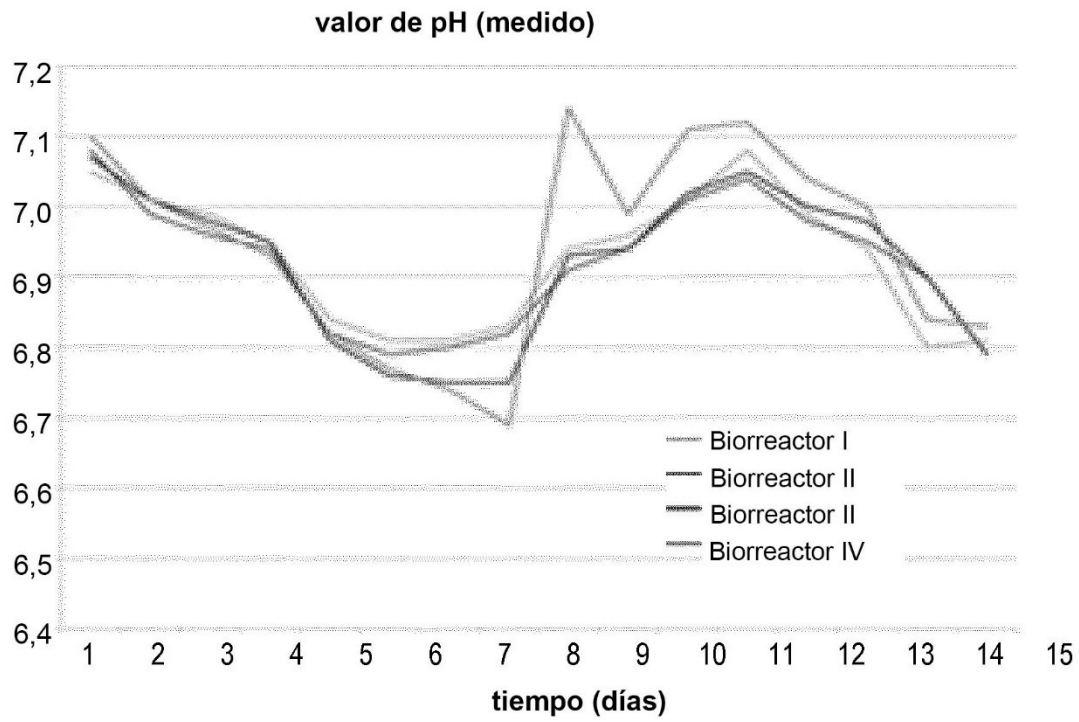


Fig. 5



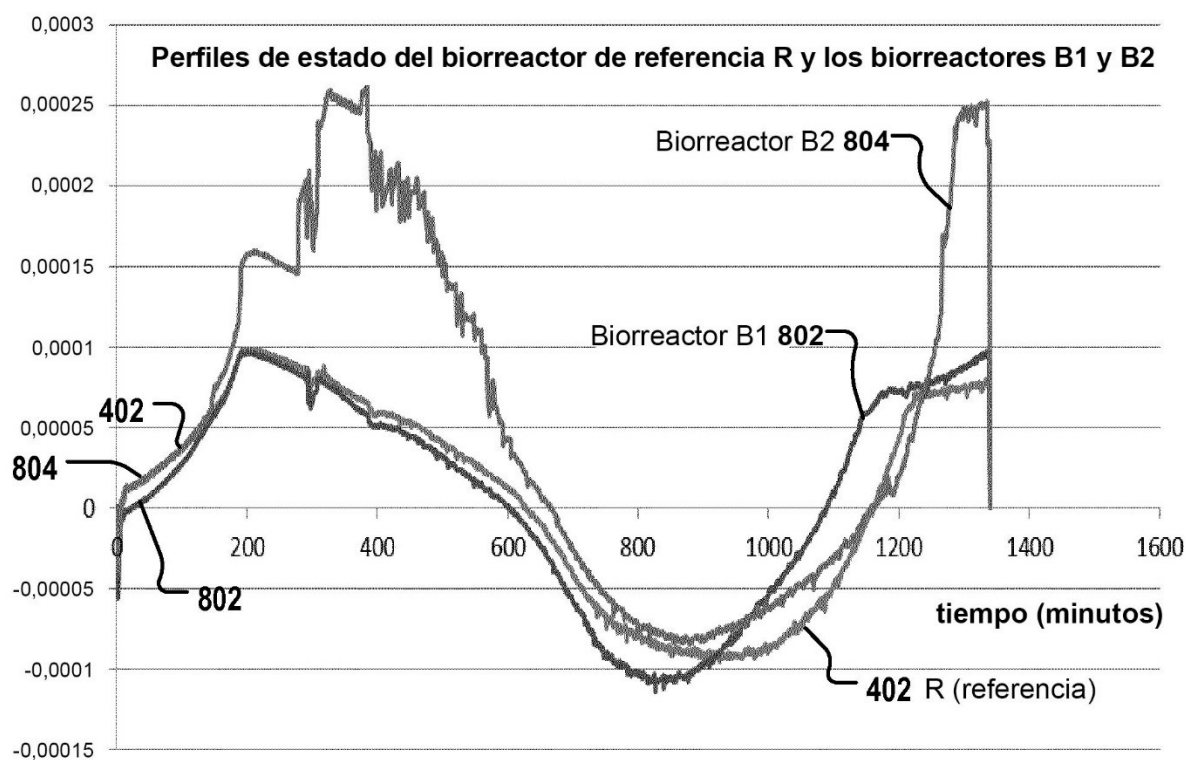


Fig. 8a

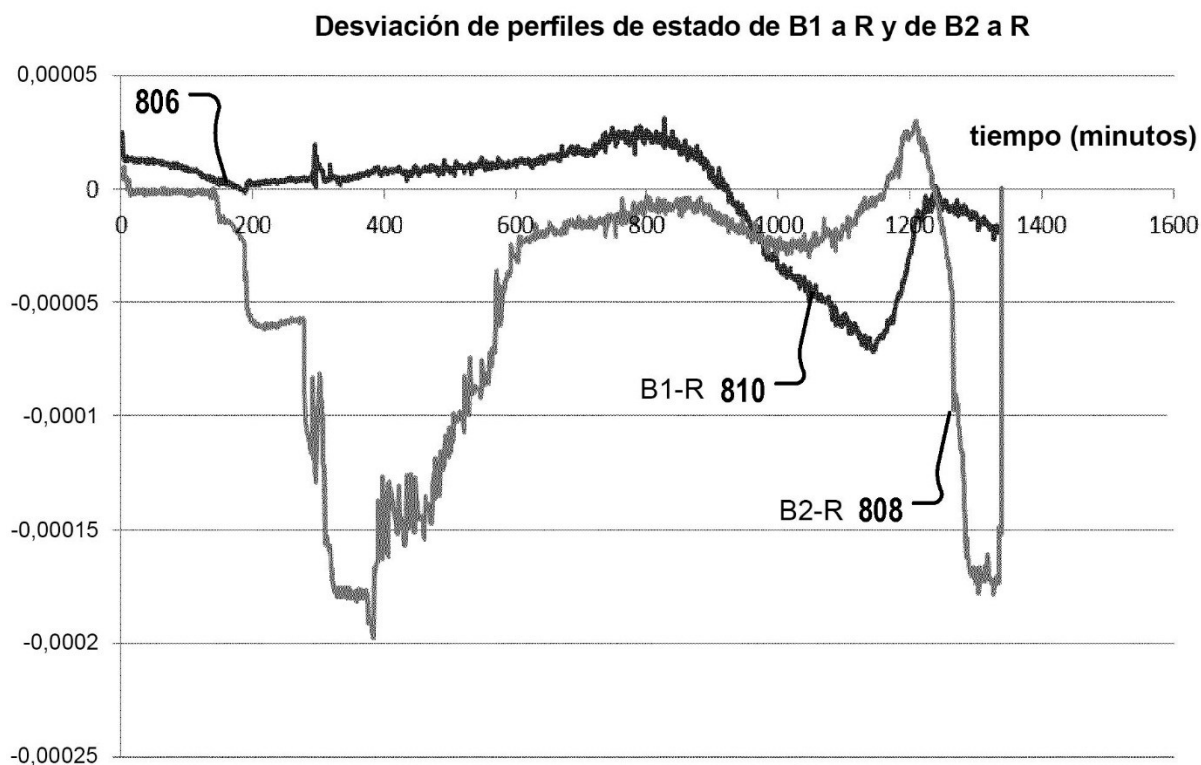


Fig. 8b

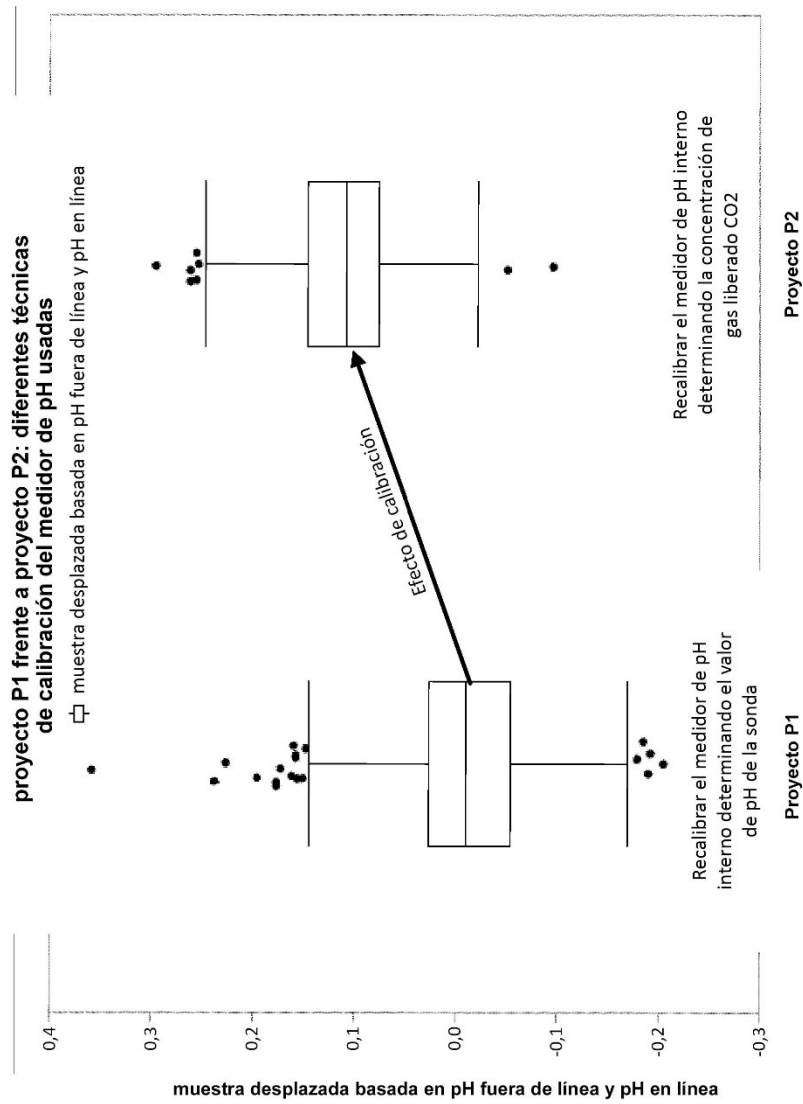


Fig. 9