
6. ESTRATÈGIES D'OPERACIÓ I CONTROL DE NUTRIENTS EN CULTIUS D'HIBRIDOMES.

6. ESTRATÈGIES D'OPERACIÓ I CONTROL DE NUTRIENTS EN CULTIUS D'HIBRIDOMES.

6.1. ESTRATÈGIES D'OPERACIÓ AMB CÈL·LULES ANIMALS.

Com ja s'ha comentat a la *Introducció*, l'optimització del procés passa per provar quin dels possibles modes d'operació és més indicat per al cultiu d'hibridomes. En aquest capítol es consideren les característiques dels quatre principals modes d'operació (esquematzats a la Figura 6.1) i s'apliquen al cultiu de cèl·lules d'hibridoma, utilitzant els equips de mesura i control desenvolupats en els anteriors capítols. L'estratègia de cultiu escollida com més apropiada serà la que permeti assolir l'objectiu desitjat. En aquest cas es tracta d'obtenir el major nombre de cèl·lules viables, d'una banda, i també mantenir el màxim de temps possible la durada del cultiu. Aquests dos factors són els que contribueixen a l'augment de la integral de cèl·lules viables, magnitud important, donat que la quantitat final d'anticòs produït és proporcional a la integral de cèl·lules viables obtinguda al llarg de tot el cultiu.

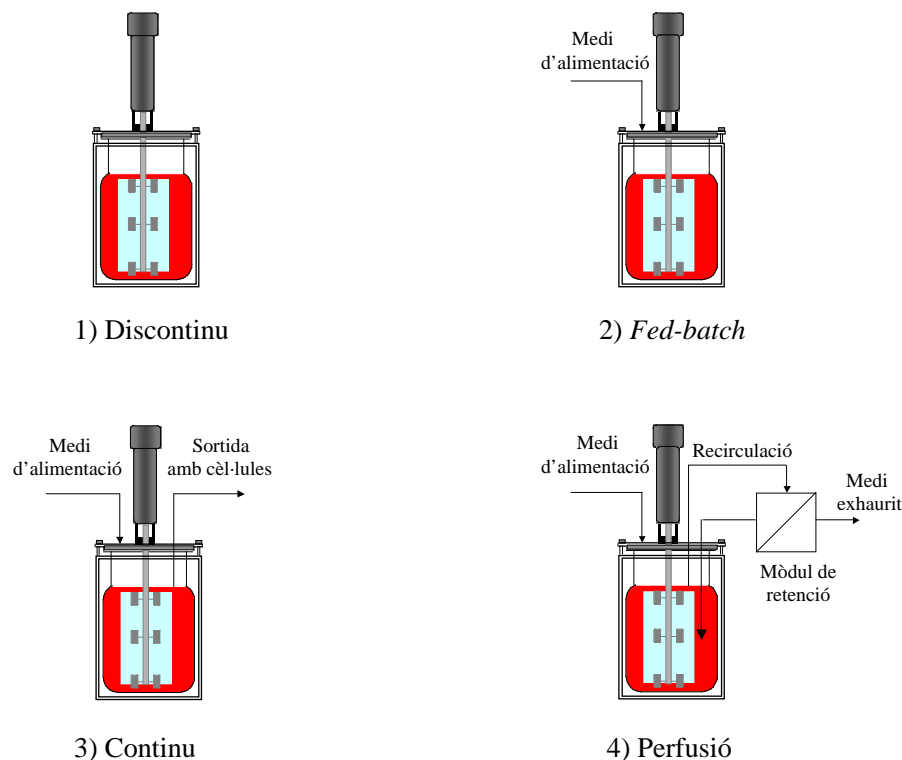


Figura 6.1. Diferents tipus d'operació amb reactors de tanc agitat per a cultius de cèl·lules animals. 1) Discontinuu o *batch*. Tots els components s'addicionen abans del cultiu. 2) Discontinuu alimentat o *fed-batch*. S'addiciona un corrent d'aliment concentrat durant l'operació. 3) Continu. S'addiciona un corrent d'aliment i s'extreu contínuament un corrent de producte amb cèl·lules. 4) Perfusió. S'addiciona un corrent d'aliment i s'extreu un corrent de producte, implementant-se un sistema de retenció per a les cèl·lules extern o intern.

Tal com s'ha comentat a l'apartat 2.3.5 d'aquesta memòria, els sistemes de cultiu *in vitro* emprats per a cèl·lules animals es poden separar bàsicament en dos tipus (Kearns, 1990): cultius homogenis en què les cèl·lules creixen en suspensió i cultius heterogenis en què les cèl·lules es troben immobilitzades. En aquest darrer cas s'acostuma a utilitzar el mode d'operació en continu, obtenint-se així els anomenats cultius de cèl·lules immobilitzades en perfusió. Per als cultius homogenis o en suspensió de cèl·lules animals els principals modes d'operació utilitzats són: discontinu o *batch*, discontinu alimentat o *fed-batch*, i continu. A la Figura 6.1 es visualitzen les principals característiques de cadascun d'aquests sistemes.

6.2. OPERACIÓ EN DISCONTINU.

Els sistemes en discontinu han estat des de sempre els més utilitzats per portar a terme processos de cultiu *in vitro* amb cèl·lules animals. La seva facilitat d'operació els ha convertit en els preferits en processos industrials, bàsicament per la seva baixa complexitat, alta versatilitat i baix cost. Però precisament aquesta simplicitat operacional ha motivat que es doni un baix grau d'optimització del sistema, ja que quan la concentració d'algun dels nutrients és massa baixa o algun subproducte s'acumula fins assolir nivells de toxicitat, la població cel·lular atura el seu creixement i el cultiu inicia una ràpida i irreversible fase de mort.

6.2.1. Funcionament i posta a punt del cultiu en discontinu.

L'operació en discontinu s'agafa com a sistema de referència amb el que s'aniran comparant amb les altres estratègies provades en aquest treball. Aquest tipus d'operació consisteix en introduir inicialment el medi de cultiu dins el reactor, ambdós estèrils, per evitar el possible creixement d'altres microorganismes existents en el medi o en el mateix reactor. Seguidament, s'inocula amb cèl·lules i es deixa transcórrer un cert temps durant el qual les cèl·lules aniran creixent fins a exhaurir algun dels substrats. Durant l'etapa de creixement cel·lular no s'extreu ni s'afegeix res, és a dir, cap nutrient és afegit o eliminat del bioreactor. Només quan es controla el pH s'afegeixen les quantitats necessàries de base per mantenir-lo en el rang consignat (7.02 ± 0.05).

Des d'un punt de vista del monitoratge i control, en aquest tipus d'operació s'adquireixen les dades d'evolució de les variables fisicoquímiques (pH, pO_2 , T, V_{CO_2} , V_{NaOH}), que també es controlen, i s'obtenen lectures turbidimètriques i de la demanda d'oxigen del cultiu, però amb aquestes dades no es realitza cap acció de control sobre el procés. Per aquesta raó es considera un sistema d'operació útil per determinar la validesa de les mesures de densitat i activitat cel·lular, com ja s'ha comprovat en el capítol 4, així com per estudiar el comportament del creixement cel·lular en el bioreactor. A la Figura 6.2 es presenta l'esquema

del muntatge experimental amb els diferents equips que es comuniquen amb l'ordinador de gestió i control per a l'operació en discontinu. Bàsicament hi ha dues línies d'informació: la que comunica l'ordinador de gestió i control amb la unitat de control digital (DCU) del Biostat MCD mitjançant el port sèrie RS-422-A, i la que connecta les electrovàlvules Sirai i la sonda turbidimètrica Aquasant a través de la placa d'adquisició de dades instal·lada a l'ordinador i la caixa de comunicacions, construïda aquesta última específicament per donar servei a tota la instrumentació utilitzada en aquest treball.

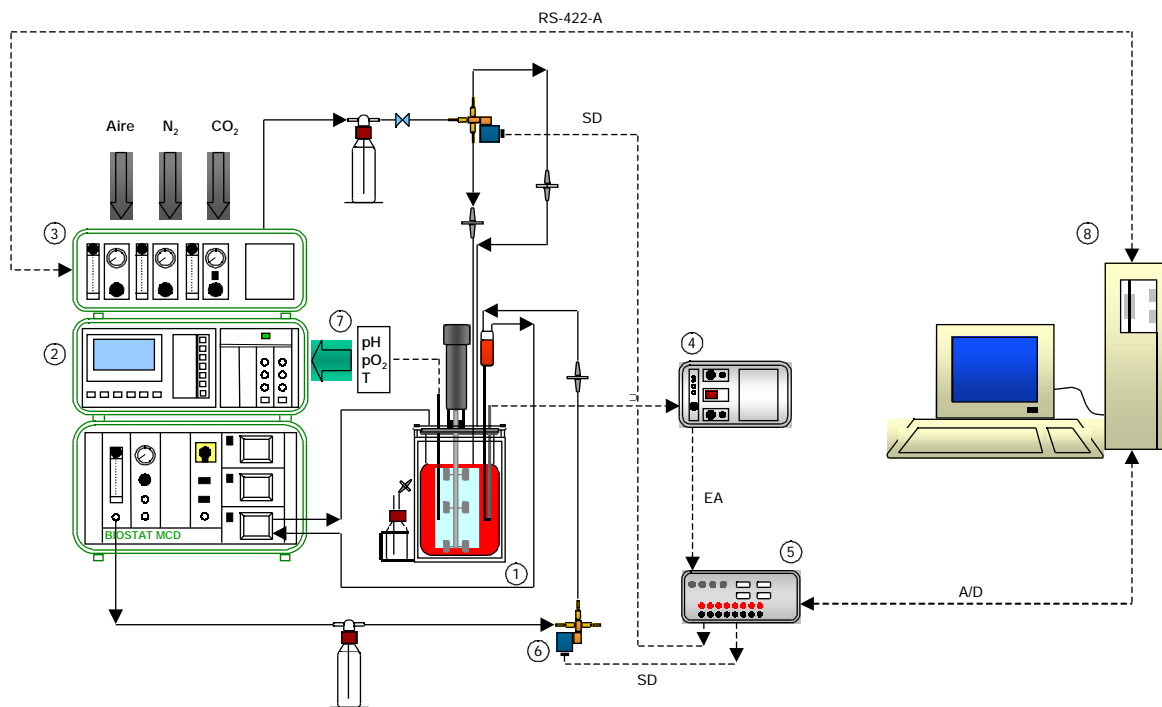


Figura 6.2. Esquema de l'adquisició de dades i control de l'operació en discontinu. 1) Bioreactor Braun Biostat MCD, 2) Unitat de control digital (DCU), 3) Estació de mescla de gasos pO_2 Gas-Mix, 4) Sonda Aquasant AF44 i transmissor AS82, 5) Caixa de comunicacions, 6) Electrovàlvula Sirai, 7) Sondes de temperatura, pH, i pO_2 , 8) Ordinador de gestió i control. A/D = Sortides i Entrades Analògiques/Digitals, EA = Entrada Analògica, SD = Sortida Digital, RS-422-A = port sèrie.

Un cop inoculat el bioreactor amb cèl·lules, es prossegueix executant a l'aplicació Sequen, descrita al capítol 5, l'arxiu de protocol anomenat BATCH.TXT descrit també al mateix capítol. Aquest arxiu conté les ordres necessàries per a l'adquisició de dades i gestió automàtica dels equips, així com per al processament de les dades que es requereixen del cultiu. A la Figura 6.3 es presenta el diagrama de flux del programa de gestió i control de l'operació en discontinu. Durant un determinat període de temps, normalment una hora, l'aplicació Sequen està adquirint dades dels diferents equips i executant les ordres de l'arxiu de protocol BUBFREE.TXT diverses vegades (seqüència d'ordres del circuit d'eliminació de microbombolles de la superfície del sensor turbidimètric). Un cop s'esgoten aquests cicles es

comença l'anàlisi de la OUR (procediment d'actuació experimental descrit al capítol 4). Quan es finalitza l'anàlisi de la OUR l'aplicació procedeix al càlcul en línia de la OUR (PROC CALCULA OUR), de la concentració cel·lular a partir del filtratge de les dades de la sonda turbidimètrica Aquasant (PROC CALCULA BIO) i a l'homogeneïtzació de l'interval temps per a les dades físico-químiques obtingudes de la DCU (PROC CALCULA VARDCU). Aquest processament de les dades DCU es a causa de que durant l'anàlisi de OUR la freqüència d'adquisició de dades s'incrementa a 1 s, mentre que en estat normal està consignada a 20 s, havent-se així de normalitzar l'interval per a un tractament posterior més còmode i àgil.

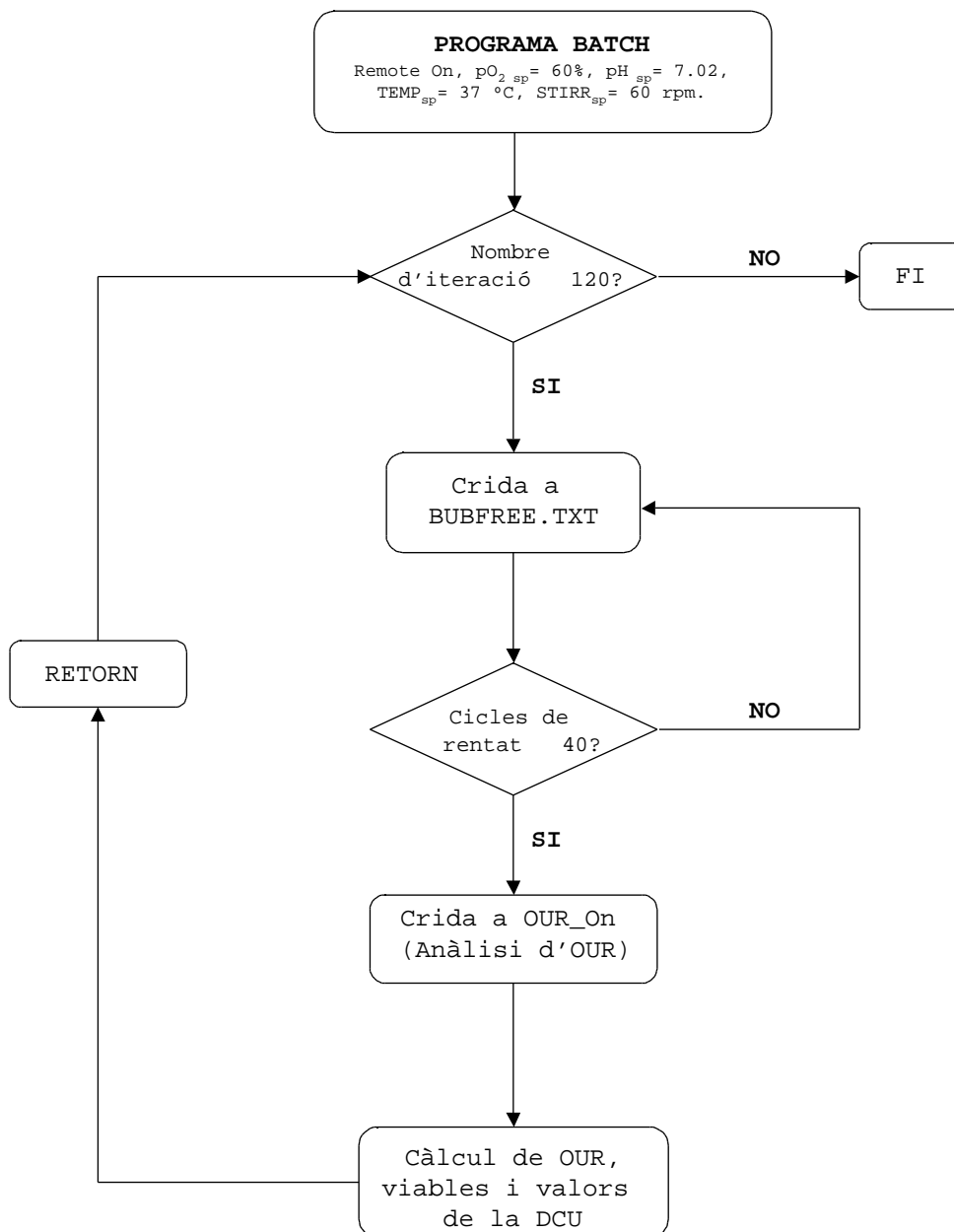


Figura 6.3. Diagrama de flux de l'arxiu de protocol BATCH.TXT per l'operació en discontinu.

Una vegada el cultiu arriba al final de la fase de mort cel·lular l'equip de cultiu i els aparells associats a aquest, s'aturen. Seguidament, es confecciona l'anàlisi exhaustiu de les dades obtingudes en el procés (tant les recollides en línia com les processades fora de línia).

6.2.2. Caracterització del cultiu d'hibridomes en discontinu.

El primer cultiu en discontinu esdevindrà el sistema amb el que es compararà el comportament obtingut amb altres estratègies, i que es denomina **cultiu de referència**. Per realitzar-lo s'utilitza el bioreactor de Braun Biostat MCD (descriu a l'apartat 8.1.3), cultivant les cèl·lules d'hibridoma en medi DMEM amb 23.8 mM de glucosa, 3.2 mM de glutamina i 2% de sèrum boví (FCS). Aquesta concentració de nutrients en el medi és l'estàndard per a cultius en discontinu de cèl·lules d'hibridoma en suspensió. El cultiu en bioreactor s'inocula amb cèl·lules a la meitat de la fase de creixement exponencial obtingudes d'un cultiu ressembla, a una concentració de 0.2×10^6 cèl·lules/ml. Els resultats del cultiu en discontinu es presenten a la Figura 6.4. Com es pot veure, les cèl·lules creixen exponencialment fins a una concentració màxima de cèl·lules viables de 2.0×10^6 cèl·lules/ml en aproximadament 47 hores. A partir d'aquest instant, tant la concentració de cèl·lules viables com el percentatge de viabilitat cauen dràsticament donant la característica corba de la fase de mort de l'hibridoma KB-26.5.

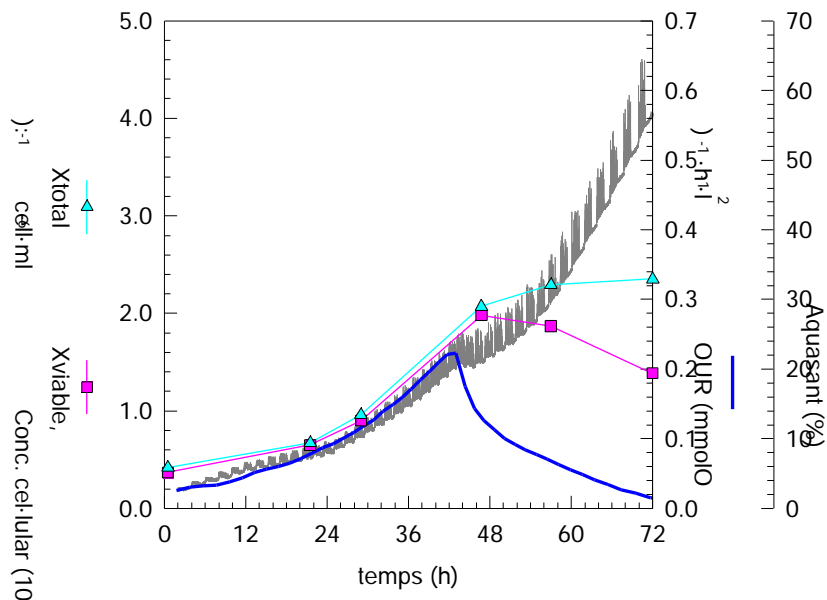


Figura 6.4. Evolució de la concentració de cèl·lules viables (X_{viable}) i totals (X_{total}) al cultiu en discontinu. També es mostren els perfils dels valors de OUR i de la terbolesa del medi obtinguts en línia i en temps real.

Pel que fa a la OUR, al principi de l'experiment té valors baixos degut al poc nombre de cèl·lules, fet que obliga a realitzar determinacions amb menys freqüència, i durant un temps bastant llarg. A mesura que avança el cultiu augmenta la OUR i disminueix el temps requerit per a la seva adquisició. El seu valor màxim és de $0.23 \text{ mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$. Després el perfil de la corba decreix ràpidament. Aquesta disminució en la OUR correspon al descens de la velocitat de creixement cel·lular, però es produeix abans que s'assoleixi el màxim de la concentració cel·lular de viables (al voltant de 4 hores abans). D'altra banda, el senyal turbidimètric, que es pren cada minut, segueix bé el comportament del creixement cel·lular en la zona d'alta viabilitat del cultiu i la resposta del sensor per a un canvi esglaonat en la concentració cel·lular és ràpida. En canvi, quan el cultiu entra en la fase de mort, el senyal turbidimètric augmenta més ràpidament que el recompte cel·lular i no es pot considerar com indicador vàlid de la dinàmica del cultiu. El canvi en la relació de cèl·lules viables amb les cèl·lules mortes, les quals exhibeixen diferent volum cel·lular, i el fenomen de residus cel·lulars poden contribuir a la ruptura de la correlació entre el senyal turbidimètric i la concentració de cèl·lules totals. Un altre fet important és la qualitat del senyal, ja que no és la més òptima, fet que fa necessari filtrar el senyal com s'ha explicat a l'apartat 4.4.2 i es veurà en les mesures dels propers experiments que es presentaran. En contrast amb les dades de OUR, que mostren l'activitat del procés de cultiu cel·lular directament, les dades de terbolesa determinen la concentració de les cèl·lules del cultiu. Ambdues mesures presenten una tendència similar en el creixement exponencial. No obstant, al voltant de les 43 h, mentre el senyal de la sonda Aquasant continua incrementant-se, la OUR assoleix el seu pic màxim i comença tot seguit a decreïxer. Aquest descens continu contrasta amb l'increment en el perfil de les dades de la sonda turbidimètrica. Per tant, la mesura de la OUR es pot considerar com un indicador més sensible de l'activitat del cultiu.

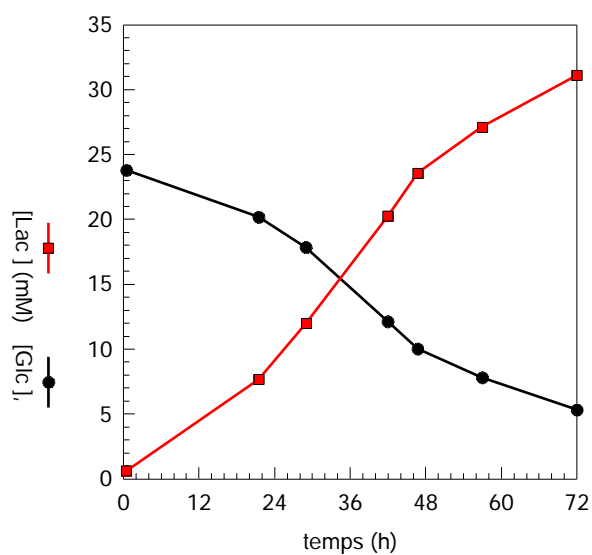


Figura 6.5. Evolució de la concentració de glucosa ([Glc]) i lactat ([Lac]) al cultiu en discontinu.

Pel que fa al consum de glucosa, a la Figura 6.5 es pot veure que aquest nutrient no és el factor limitant del cultiu, assolint una concentració final dins del bioreactor de 5.3 mM. Es consumeixen aproximadament 18.5 mM de glucosa, la majoria d'aquesta es converteix a lactat, que assoleix una concentració final de 31.1 mM (gairebé 1.7 vegades la concentració de glucosa consumida al finalitzar el cultiu).

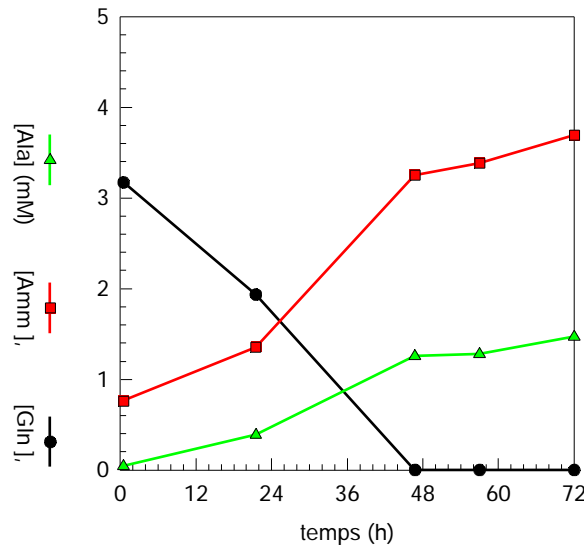


Figura 6.6. Evolució de la concentració de glutamina ([Gln]), amoni ([Amm]) i alanina ([Ala]) al cultiu en discontinu.

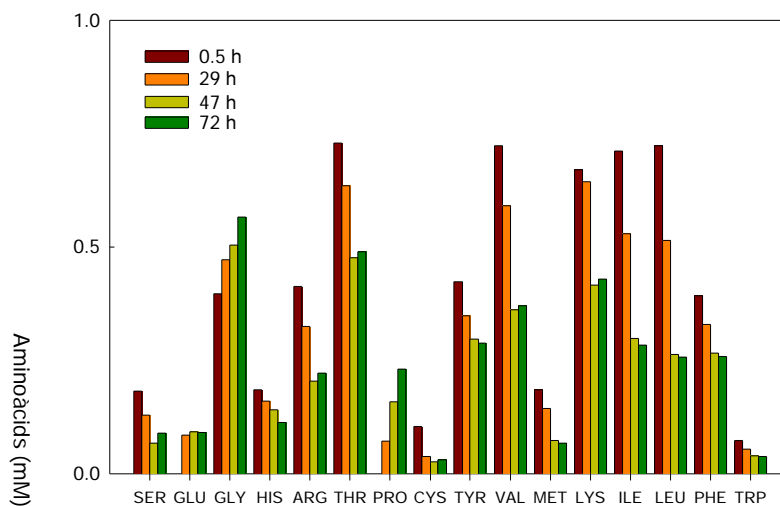


Figura 6.7. Evolució de la concentració dels aminoàcids restants al cultiu en discontinu.

La Figura 6.6 mostra com el factor limitant del creixement cel·lular en aquest experiment, pot haver estat l'esgotament de la glutamina a les 43 hores de cultiu, mentre que el consum de glucosa i la producció de lactat cessen al voltant de 24 hores més tard, coincidint amb el màxim del perfil de OUR. Aquest fet fa pensar que aquesta variable pot donar una valuosa informació en línia per al coneixement del que succeeix dins del bioreactor,

considerant-se aleshores com un paràmetre molt important sobre l'estat fisiològic del cultiu cel·lular. També es pot apreciar com les cèl·lules produeixen 1.4 mM d'alanina i es pot veure com per cada mmol de glutamina consumit es produeixen aproximadament 0.8 mmol d'amoni. A la Figura 6.7 s'observa com cap altre aminoàcid del medi s'esgota en el moment en què el cultiu inicia la fase de mort.

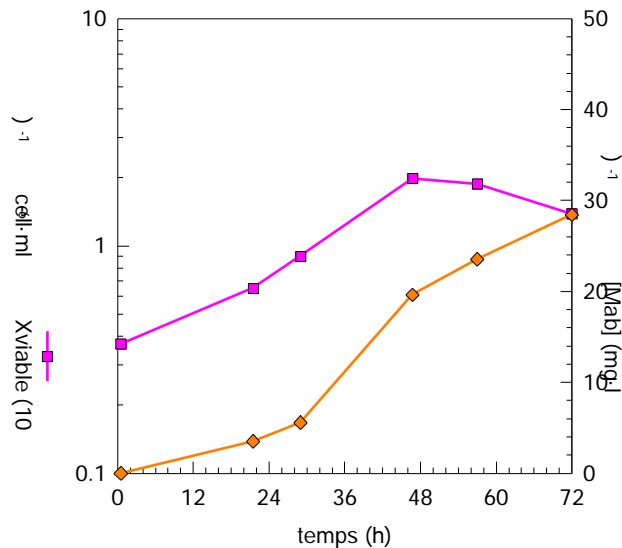


Figura 6.8. Evolució de la concentració de cèl·lules viables (X_{viable}) i de l'anticòs monoclonal ($[Mab]$) al cultiu en discontinuu.

A la Figura 6.8 s'observa com la concentració d'anticòs monoclonal produïda augmenta de manera proporcional amb la concentració de cèl·lules viables, i com la producció segueix després del màxim de concentració de cèl·lules de viables, però amb un perfil més atenuat. La concentració final d'anticòs present al medi és de 28.4 µg/ml. Encara que relativament baixa, aquesta és una concentració que es pot considerar normal en cultius en discontinuu d'hibridomes (Kurokawa i col., 1994; Zhou i col., 1995; Oh i col., 1996) i en concordança amb els resultats previs obtinguts amb la línia cel·lular KB-26.5. A banda de la concentració final de proteïna en el medi de cultiu, un dels paràmetres que descriuen millor el rendiment del procés és la productivitat volumètrica que es calcula segons l'expressió (Merten, 1988):

$$P_{vol} = \frac{[Mab]_{final}}{t_{batch}} \quad (\text{Eq. 6.1})$$

on P_{vol} és la productivitat volumètrica en unitats de µg/(ml·h), $[Mab]_{final}$ és la concentració del producte al final del cultiu en µg/ml, i t_{batch} és la durada del cultiu en hores. Si es considera que la durada del cultiu ha estat de 72 hores, s'obté per aquest cultiu discontinuu de referència una productivitat volumètrica de 0.40 µg/(ml·h).

La concentració final de producte assolida en aquest cultiu de referència, s'intenta millorar en un següent experiment en discontinu en què el medi de cultiu DMEM utilitzat conté una concentració de nutrients que eviti que el cultiu quedi limitat per l'esgotament de cap dels seus substrats, mesurables analíticament, durant la fase de creixement.

6.2.3. Fortificació del medi basal DMEM.

Per millorar els resultats de l'anterior cultiu en discontinu, es planteja el disseny d'un medi de cultiu en què s'augmenta la concentració de 25 components del medi DMEM (veure l'apartat 8.6.1). Aquesta opció es planteja, i en canvi no s'intenta fer un augment d'un component específic solament (per exemple la glutamina), per impedir l'esgotament d'un altre component.

En el cultiu que ara es presenta, s'ha utilitzat un medi basal concentrat 2x, és a dir, un medi que conté el doble de concentració que un medi DMEM estàndard per a tots els seus nutrients. Les concentracions d'aminoàcids i vitamines en el medi 2x es detallen a l'apartat 8.6.3, mentre que les concentracions dels substrats més importants són 47.8 mM per a la glucosa, 9.1 mM per a la glutamina i 4% per al FCS. Les concentracions tant de les sals inorgàniques com la del tampó carbonat es mantenen iguals a les ja definides pel medi DMEM estàndard (també anomenat 1x). L'inòcul utilitzat en aquest cultiu és més alt que en d'altres cultius, assolint en el reactor una concentració de 0.5×10^6 cèl·lules/ml, per evitar un possible perllongament de la fase de latència cel·lular. Aquesta pressuposició es fonamenta en que la utilització d'un medi més concentrat augmenta l'osmolaritat del cultiu, provocant una resposta de les cèl·lules, que provenen de la ressembla en medi 1x, d'un període d'adaptació més llarg en les noves condicions de cultiu del bioreactor. Els resultats obtinguts en l'operació en discontinu amb aquest medi i per a tots els paràmetres estudiats en l'apartat anterior es presenten a les figures 6.9, 6.10 i 6.11 d'aquesta memòria i es discuteixen seguidament.

A la Figura 6.9 s'observen els perfils del recompte cel·lular tant per a cèl·lules viables com per a totals juntament amb el perfil del senyal de la demanda d'oxigen obtingut en línia. Cal esmentar que per problemes operacionals, en aquest experiment no es va disposar de la mesura en línia de la sonda Aquasant. La concentració de cèl·lules viables assoleix un màxim de 3.2×10^6 cèl·lules/ml a les 68 hores de cultiu. El perfil de descens és semblant a l'obtingut al cultiu en discontinu de referència. En aquest punt la concentració de cèl·lules totals és de 3.5×10^6 cèl·lules/ml, i encara es manté el valor de viabilitat registrat al llarg de tota la fase de creixement exponencial (per sobre del 90%). Un altre valor a destacar és la durada del cultiu que s'ha incrementat en 24 hores més respecte al cultiu en discontinu de referència. Aquest fet juntament amb un increment significatiu de la concentració cel·lular en el bioreactor (superior al 70%) ha de significar un augment del producte. Així ho demostra l'increment de la

producció d'anticòs en aquest cultiu respecte a l'anterior, amb un valor final de producte de 44 $\mu\text{g/l}$. No obstant, l'increment de producte no està en proporció a la concentració de nutrients d'aquest medi basal. La producció volumètrica tampoc s'incrementa gaire respecte al cultiu discontinu de referència, tot i el perllongament del cultiu durant 24 hores més i el màxim cel·lular obtingut. El valor de la producció volumètrica és ara de 0.46 $\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$ que representa un increment del 15% respecte a la productivitat del cultiu de referència. En qualsevol cas, cal esmentar que en aquests processos és més important obtenir un augment en la concentració de producte que en la productivitat volumètrica.

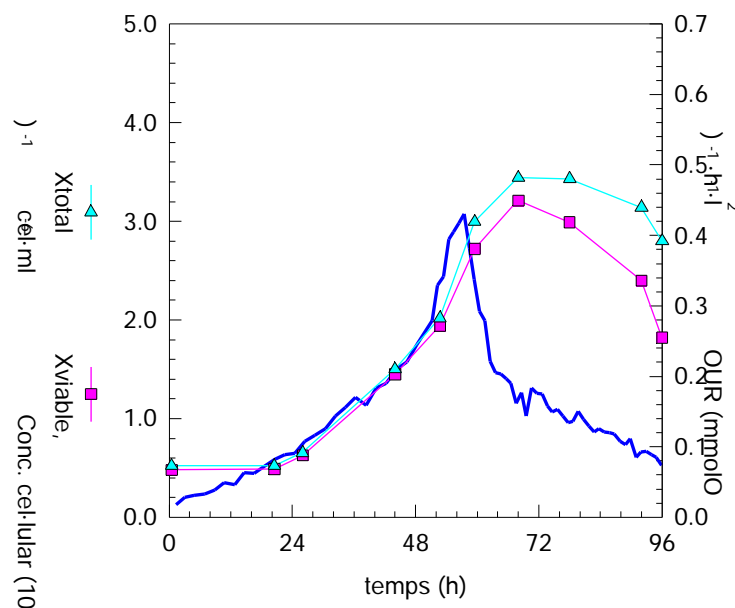


Figura 6.9. Evolució de la concentració de cèl·lules viables (X_{viable}) i totals (X_{total}), i la velocitat del consum d'oxigen (OUR) en línia al cultiu en discontinu amb medi fortificat.

Pel que fa a la OUR, es pot observar que aquesta augmenta de forma paral·lela al creixement cel·lular fins arribar a un màxim de 0.42 $\text{mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$. Un cop s'assoleix aquest valor, l'evolució d'aquesta mesura decreix ràpidament fins a velocitats de l'ordre de la meitat del valor màxim aconseguit. En aquest cultiu, el dràstic i ràpid descens de la demanda d'oxigen no es pot associar directament a l'exhauriment de cap dels nutrients mesurables del medi, com es pot observar a les figures 6.10 i 6.11. A la Figura 6.10a i 6.10b es pot observar com la glucosa i la glutamina no s'esgoten en el cultiu, restant finalment al bioreactor en concentracions de 10.7 mM i 2.3 mM respectivament. La glucosa i el lactat no s'aturen en el màxim cel·lular, i segueixen consumint-se i produint-se a una velocitat molt més baixa que l'observada en la fase exponencial. Els valors de concentració de glutamina i amoni resten estables des del punt del màxim cel·lular fins al final del cultiu.

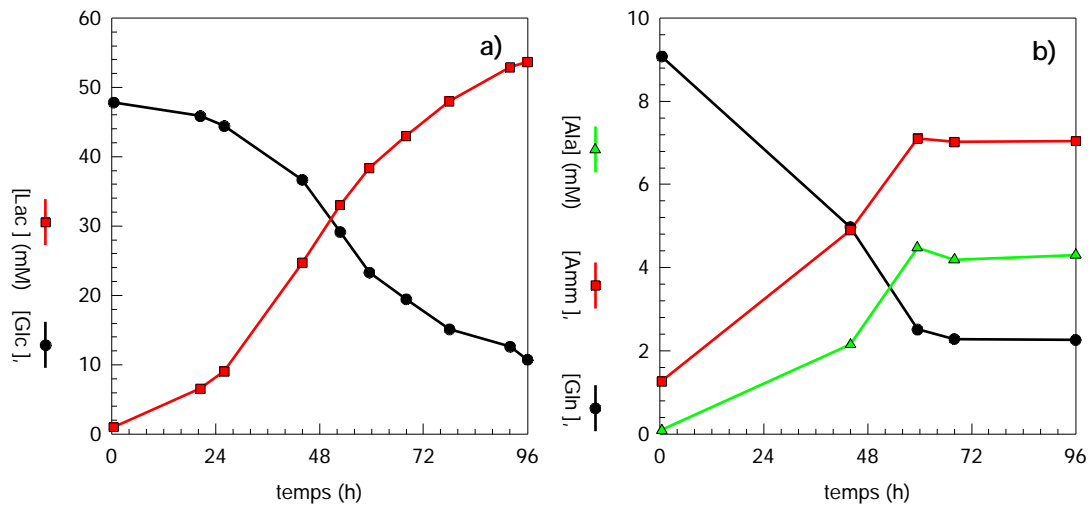


Figura 6.10. Evolució al cultiu en discontinu amb medi fortificat de les: a) Concentracions de glucosa ([Glc]) i lactat ([Lac]), b) Concentracions de glutamina([Gln]), amoni ([Amm]) i alanina ([Ala]).

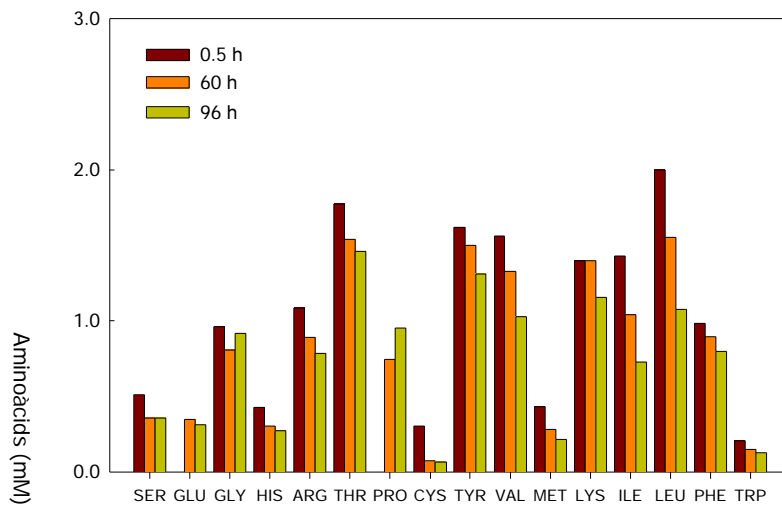


Figura 6.11. Evolució de la concentració dels aminoàcids al cultiu en discontinu amb medi fortificat.

D'altra banda, les concentracions que assolixen els metabolits del cultiu, com el lactat i l'amoni, reconeguts àmpliament en la literatura com inhibidors del creixement per aquest tipus de cèl·lules, i per tant tòxics, arriben a valors molt més alts del cultiu de l'apartat anterior; aquests són 53.7 mM per al lactat i 7.1 mM per a l'amoni. Tot i que aquests valors són alts, encara no assolixen els valors identificats com a tòxics en un treball anterior amb aquesta línia cel·lular (Sanfeliu, 1995), on el lactat i l'amoni s'addicionaren fins a concentracions de 70 mM i 12 mM respectivament. Tanmateix, alguns autors mantenen que no s'observa el mateix efecte afegint amoni o lactat exogen al cultiu, que quan es va produït per la pròpia cèl·lula. De totes formes, la seva acumulació en el medi de cultiu representa una pèrdua potencial dels substrats, que no s'utilitzen eficientment. Pel que fa a l'alanina

s'assoleix un valor de 4.4 mM al final del cultiu. En principi, l'acumulació de l'alanina en el medi de cultiu no interfereix amb el creixement cel·lular de l'hibridoma (Duval i col., 1991). A la Figura 6.11 es pot observar com cap aminoàcid del medi s'exhaureix al llarg del cultiu, destacant per sobre d'altres la producció de 0.98 mM de prolina, que se sintetitza directament a partir de l'excés de glutamat intracel·lular.

Així les raons de l'aturada del creixement s'haurien de buscar en la producció per part de la cèl·lula d'una o vàries substàncies tòxiques que inhibeixen el creixement cel·lular fins aturar-lo, o bé que l'osmolaritat del medi hagi assolit un valor excessivament alt. A més a més, aquesta última explicació vindria sustentada per l'addició al bioreactor d'un volum de 230 ml de solució de NaOH de concentració 200 mM (s'utilitza com element actuator per controlar el pH en el rang consignat quan se sobrepassa la capacitat del tampó del medi), que augmenta encara més l'osmolaritat final del medi de cultiu.

Per altra banda, al emprar el medi fortificat no s'ha observat cap inhibició inicial del creixement per cap dels substrats que ara es troben al doble de concentració, i la velocitat de creixement en la fase exponencial és la mateixa que en l'experiment anterior (0.044 h^{-1}). En canvi, altres autors han trobat situacions d'inhibició pel substrat al fortificar els medis de cultiu (Bibila i Robinson, 1995). Tanmateix, l'operació en discontinu amb medi fortificat per a l'hibridoma KB-26.5 aconsegueix un increment de la concentració final d'anticòs del 54% respecte al cultiu de referència. A la bibliografia es troben treballs que aconsegueixen increments per a les respectives línies cel·lulars d'entre 2 i 8 cops la concentració establerta en un cultiu en discontinu realitzat amb medi no-fortificat (Luan i col., 1987; Jo i col., 1990; Jo i col., 1993). De totes formes, per a la majoria de línies cel·lulars, la fortificació del medi de cultiu pot ser que no incrementi significativament la densitat cel·lular degut a l'augment de la formació de lactat i amoni, el qual està acompanyat de l'ús per part de la cèl·lula d'elevades concentracions de glucosa i glutamina (Xie i Wang, 1994).

Després d'aquests dos primers cultius, es planteja fer una anàlisi detinguda de les dades mesurades, així com de la relació entre elles, per tal d'obtenir un major coneixement del comportament cel·lular en les condicions de cultiu de l'operació en discontinu i, a més a més, establir paràmetres i relacions útils per a d'altres estratègies d'operació.

6.2.4. Relacions estequiomètriques i velocitats específiques.

Les dades obtingudes en els experiments anteriors es poden combinar, i permeten determinar una sèrie de paràmetres com el consum d'oxigen acumulat (OC), de glucosa acumulada (GC), de glutamina acumulada (GlnC), i la producció de lactat acumulada (LP), d'amoni acumulada (AmmP) i d'alanina acumulada (AlaP), així com els rendiments

lactat/glucosa ($Y_{\text{Lac/Glc}}$), oxigen/glucosa ($Y_{\text{O}_2/\text{Glc}}$), glutamina/glucosa ($Y_{\text{Gln/Glc}}$), amoni/glutamina ($Y_{\text{Amm/Gln}}$), alanina/glutamina ($Y_{\text{Ala/Gln}}$), entre d'altres paràmetres. També es poden considerar aquells rendiments que relacionen els substrats amb la concentració cel·lular ($Y_{\text{O}_2/X}$, $Y_{\text{Gln/X}}$ i $Y_{\text{Glc/X}}$). Les velocitats específiques de consum d'oxigen (q_{O_2}), de glucosa (q_{Glc}) i de glutamina (q_{Gln}), i les de producció de lactat (q_{Lac}) i d'amoni (q_{Amm}), així com la velocitat específica de creixement (μ) també es poden calcular a partir de les dades obtingudes. La utilització d'algunes d'aquestes variables permetrà tant monitorar la cinètica del creixement cel·lular com identificar en línia l'estat fisiològic del cultiu. A més, amb algunes d'aquestes mesures i càlculs en línia també es pot facilitar el desenvolupament de magnituds i criteris per controlar l'addició dinàmica de nutrients en les diferents operacions que així ho requereixin.

La concentració del consum d'oxigen acumulat es determina mitjançant la integració de la mesura d'OUR amb el temps. L'expressió matemàtica que pren aquesta variable es mostra a l'equació 6.2 (Zhou i Hu, 1994):

$$OC = \int_0^t OUR dt \quad (\text{Eq. 6.2})$$

on OC és el valor del consum d'oxigen acumulat en unitats de concentració (mM), OUR és la velocitat de consum d'oxigen en $\text{mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$ i t és el temps en hores. En canvi, el càlcul per al consum acumulat de glucosa (GC) o la producció acumulada de lactat (LP) és més senzill i només cal fer un balanç de matèria amb els punts obtinguts del mostreig fora de línia, per al GC entre la que hi havia a l'inici i la que resta finalment en el reactor, i per a la LP entre el total que s'ha produït i el que hi havia inicialment en el medi de cultiu. Ambdues variables s'expressen en unitats de concentració (mM). De la correlació lineal dels valors del OC i la LP vers el GC s'obtenen pendents que corresponen als rendiments mitjans d'oxigen/glucosa ($Y_{\text{O}_2/\text{Glc}}$) i lactat/glucosa ($Y_{\text{Lac/Glc}}$).

Per un bioreactor de tanc agitat en discontinu el balanç de matèria aplicat per a les cèl·lules d'hibridoma porta a l'equació:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Eq. 6.3})$$

on μ és la velocitat específica de creixement en h^{-1} , X és la concentració de cèl·lules viables en milions per ml i t és el temps en hores. Per a la fase de creixement exponencial, la representació de $\text{Ln}(X/X_0)$ vers el temps correspon a una línia recta amb pendent igual a μ_{max} , velocitat específica màxima de creixement.

Pel cas d'un component C_p , per exemple la glucosa (Glc) o el lactat (Lac), i menyspreant la variació del seu contingut intracel·lular es pot escriure:

$$q_{C_p} 10^{-3} X = \frac{dC_p}{dt} \quad (\text{Eq. 6.4})$$

on q_{C_p} és la velocitat específica de consum o producció del compost C_p , en $\text{nmol}/(10^6 \text{ cèl·lules} \cdot \text{h})$ i C_p és la concentració del component estudiat (mM). La integració de les equacions 6.3 i 6.4 entre un temps inicial igual a zero amb una concentració cel·lular inicial X_0 i de component C_{p_0} , i uns límits genèrics porta a les expressions:

$$X = X_0 \exp(\mu t) \quad (\text{Eq.6.5})$$

$$C_p = C_{p_0} + \frac{q_{C_p} 10^{-3} X_0}{\mu} [\exp(\mu t) - 1] \quad (\text{Eq.6.6})$$

Una de les formes de tractar les dades del cultiu per obtenir les velocitats específiques de consum de les cèl·lules (Zhou i col., 1997) consisteix en representar el consum acumulat dels substrats, o la producció acumulada del producte respecte la integral de cèl·lules viables (ICV), que té unitats de $10^6 \text{ cèl·lules} \cdot \text{h}/\text{ml}$, i que es defineix com (Bibila i col.,1994):

$$ICV = \int_0^t X dt = \sum_{i=0}^{n-1} [\bar{X}_i (t_{i+1} - t_i)] \quad (\text{Eq. 6.7})$$

on $\bar{X}_i = (X_{i+1} + X_i)/2$, X_{i+1} i X_i són les concentracions de cèl·lules viables ($10^6 \text{ cèl·lules}/\text{ml}$) en els temps t_{i+1} i t_i , respectivament, i \bar{X}_i és la concentració mitjana de cèl·lules viables per a l'interval de temps $(t_{i+1} - t_i)$. Al representar el consum acumulat de glucosa, glutamina, i la producció acumulada de lactat, amoni, respecte la ICV al llarg del cultiu, s'obtidran rectes de pendent constant en aquelles fases del creixement en què les velocitats específiques ho siguin.

En el cas de l'oxigen, del qual es disposa de mesures directes del seu consum al llarg del cultiu, es pot calcular la velocitat específica del consum d'oxigen (q_{O_2}) amb la següent equació:

$$q_{O_2} = 10^3 \frac{OUR}{X} \quad (\text{Eq. 6.8})$$

expressant-se en unitats de $\text{nmol}/(10^6 \text{ cèl·lules} \cdot \text{h})$.

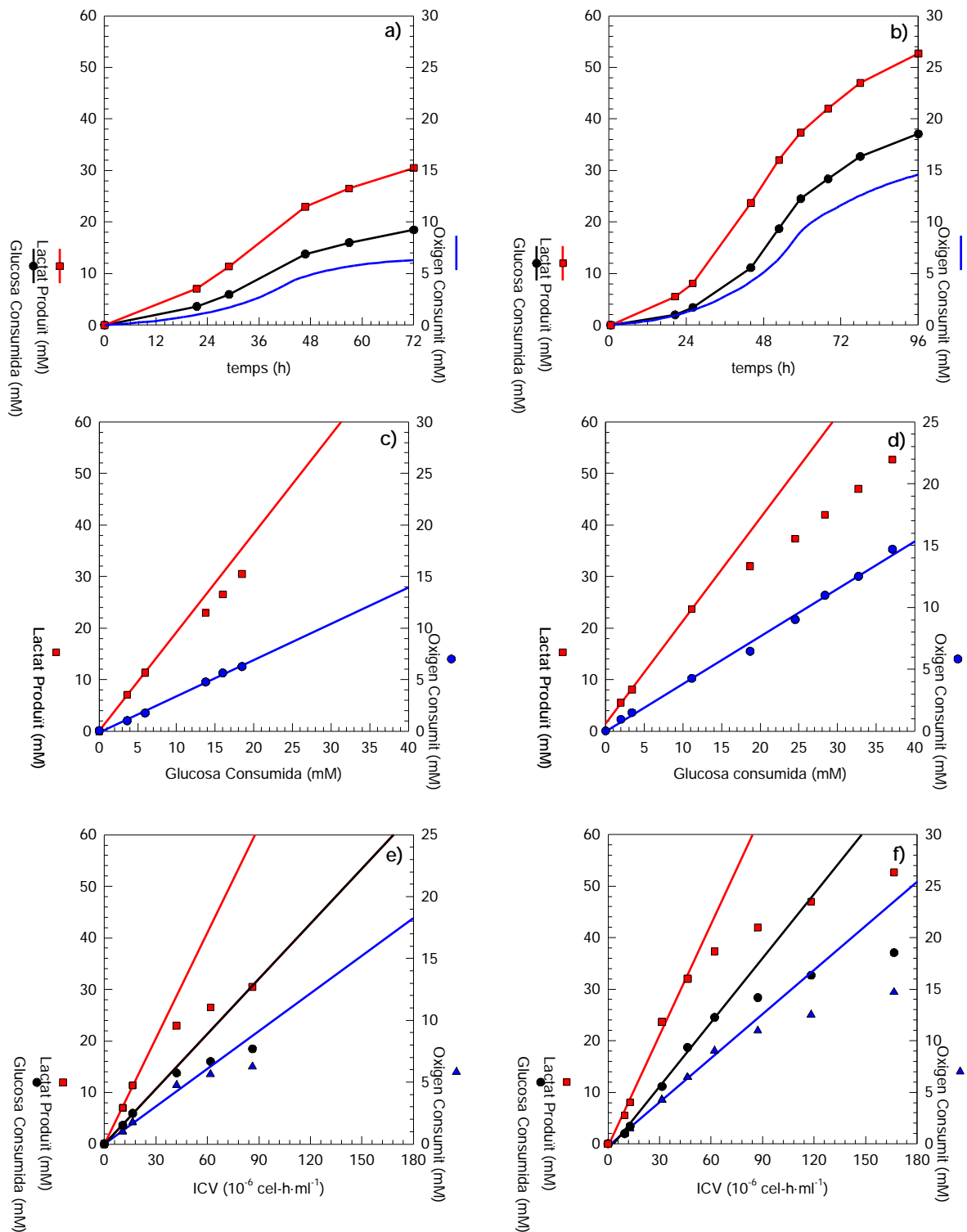


Figura 6.12. Evolució amb el temps del consum acumulat d'oxigen, OC, el consum acumulat de glucosa, GC, i la producció acumulada de lactat, LP: a) cultiu de referència i b) cultiu fortificat. Relacions entre el GC, la LP i el OC: c) cultiu de referència i d) cultiu fortificat. Relacions entre la integral de cèl·lules viables, ICV, i el OC, el GC i la LP: e) cultiu de referència i f) cultiu fortificat.

Tots els valors calculats que es comenten a continuació corresponen a la fase de creixement exponencial. La velocitat específica màxima de creixement per al cultiu de referència és de 0.044 h^{-1} i per al cultiu fortificat és de 0.0436 h^{-1} .

El consum acumulat d'oxigen (OC) es calcula integrant les dades d'OUR obtingudes en línia respecte el temps. El consum acumulat de glucosa (GC) i la producció acumulada de lactat (LP) s'obtenen integrant les mesures obtingudes fora de línia. Els resultats dels càlculs per als dos cultius presentats fins ara es mostren a la Figura 6.12. Tant a la Figura 6.12a com a la 6.12b, es pot observar que els perfils d'oxigen consumit són pràcticament paral·lels als de glucosa consumida i de lactat produït. Per al cultiu de referència (Figura 6.12a), les concentracions totals de glucosa i oxigen consumits són 6.3 mM i 18.5 mM respectivament, mentre que el total de lactat produït puja fins a 30.5 mM . En el cultiu fortificat (Figura 6.12b), els valors que s'assoleixen són superiors als anteriors, essent 14.6 mM per a l'oxigen consumit, 37.1 mM glucosa consumida i 52.7 mM lactat produït. A la Figura 6.12c (cultiu de referència) es pot observar una correlació lineal entre GC i LP, que es correspon al rendiment mig del lactat front la glucosa, obtenint-se un valor de $1.91 \text{ mmolLac/mmolGlc}$, i entre GC i OC, que es correspon al rendiment global de l'oxigen front la glucosa, obtenint-se un valor de $0.37 \text{ mmolO}_2/\text{mmolGlc}$. D'altra banda a la Figura 6.12d es presenten els diferents rendiments per al cultiu cel·lular fortificat. Les relacions estequiomètriques de la producció de lactat i del consum d'oxigen front el consum de glucosa prenen valors de $2.0 \text{ mmolLac/mmolGlc}$, i de $0.36 \text{ mmolO}_2/\text{mmolGlc}$ respectivament. De la Figura 6.12e es poden obtenir les velocitats específiques en la fase de creixement exponencial del consum d'oxigen i de glucosa (120 i $357 \text{ nmol}/(10^6 \text{ cèl}\cdot\text{lules}\cdot\text{h})$ respectivament), així com la velocitat específica de la producció de lactat ($683 \text{ nmol}/(10^6 \text{ cèl}\cdot\text{lules}\cdot\text{h})$). Els valors de q_{Glc} i q_{Lac} són típics per l'operació en discontinu i la línia d'hibridoma emprada, i similars als trobats en un altre treball realitzat prèviament (Paredes, 1998). Els valors del cultiu fortificat es calculen a partir de les dades de la Figura 6.12f. Aquests valors difereixen substancialment als obtinguts per al cultiu de referència, essent de $835 \text{ nmol}/(10^6 \text{ cèl}\cdot\text{lules}\cdot\text{h})$ per a la q_{Lac} , de $150 \text{ nmol}/(10^6 \text{ cèl}\cdot\text{lules}\cdot\text{h})$ per a la q_{O_2} i de $419 \text{ nmol}/(10^6 \text{ cèl}\cdot\text{lules}\cdot\text{h})$ per a la q_{Glc} . Tots els rendiments i velocitats específiques dels cultius de referència i fortificat es recullen a mode de resum a la Taula 6.1 i s'analitzen des del punt de vista del metabolisme cel·lular a continuació.

Les principals rutes del metabolisme central de les cèl·lules animals es representen a la Figura 6.13. La glucosa, un dels principals components del medi de cultiu, serveix com a font de carboni i energia. La seva metabolització té lloc per mitjà de la glucòlisi des de la qual el flux de carboni pot repartir-se en cinc rutes diferents: la ruta de les pentoses fosfat, les de formació de lípids, lactat i aminoàcids, i el cicle dels àcids tricarbòxílics. L'activitat glucolítica en cèl·lules ràpidament proliferants és molt elevada (Baggetto, 1992), i una bona prova d'això és la gran quantitat de lactat produïda en els cultius.

Paràmetre	Unitats	Cultiu Discontínu	
		Referència	Fortificat
Glc _{inicial}	mM	23.8	47.8
Gln _{inicial}	mM	3.2	9.1
X _{max}	10 ⁶ cel/ml	2.0	3.2
OUR _{max}	mmolO ₂ /(l·h)	0.23	0.42
ICV _{total}	10 ⁶ cel·h/ml	86	167
[Mab] _{final}	µg/ml	28.4	44
Durada	h	72	96
P _{vol}	µg/(ml·h)	0.40	0.46
Y _{Lac/Glc}	mmol/mmol	1.91	2.00
Y _{O₂/Glc}	mmol/mmol	0.37	0.36
Y _{Gln/Glc}	mmol/mmol	0.23	0.24
Y _{Amm/Gln}	mmol/mmol	0.79	0.92
Y _{Ala/Gln}	mmol/mmol	0.38	0.52
µ _{max}	h ⁻¹	0.0440	0.0436
q _{Glc}	nmol/(10 ⁶ cel·h)	-357	-419
q _{Gln}	nmol/(10 ⁶ cel·h)	-96	-101
q _{O₂}	nmol/(10 ⁶ cel·h)	-120	-150
q _{Lac}	nmol/(10 ⁶ cel·h)	683	835
q _{Amm}	nmol/(10 ⁶ cel·h)	60	93

Taula 6.1. Resum de tots els paràmetres calculats a partir de les dades dels cultius de referència i medi fortificat.

La glutamina, el segon substrat, actua com a font principal de nitrogen per a les cèl·lules animals en cultiu, així com a font complementària de carboni i energia. La glutamina és parcialment oxidada a glutamat i, posteriorment, a piruvat després de recórrer part del cicle dels àcids tricarboxílics (TCA o cicle de Krebs). Des de piruvat, els àtoms de carboni de la glutamina poden contribuir a la formació de lípids o lactat. Degut a la seva semblança amb l'oxidació parcial de la glucosa, aquesta ruta metabòlica s'ha anomenat glutaminòlisi. Al llarg d'aquesta ruta, la glutamina va contribuint a la formació de precursors per a l'obtenció dels principals constituents cel·lulars: aminoàcids i proteïnes, nucleòtids i lípids. La glutaminòlisi juntament amb la degradació de cossos cetònics provinents del sèrum i àcids grassos, pot aportar la major part de l'energia necessària pel creixement. S'ha estimat que entre el 30% i el 65% dels requeriments energètics de les cèl·lules animals es deriva del metabolisme de la glutamina encara que la glucosa es trobi disponible.

Al fer l'anàlisi des del punt de vista metabòlic de les dades obtingudes en els dos cultius presentats, cal tenir en compte que en experiments previs efectuats amb aquesta línia cel·lular (Sanfeliu i col., 1997), s'ha observat que el consum de glucosa i glutamina és més elevat quan la concentració d'aquests nutrients és més alta al medi de cultiu. Tanmateix aquesta tendència s'observa també en aquest cas, ja que s'obtenen valors de velocitats específiques del consum de glucosa i glutamina de 357 i 96 nmol/(10⁶ cèl·lules·h) pel cultiu de referència vers els valors de 419 i 101 nmol/(10⁶ cèl·lules·h) del cultiu fortificat

respectivament. L'augment del catabolisme cel·lular pels diferents substrats provoca un augment en el metabolisme, comportant un increment de les velocitats específiques de producció dels subproductes que són excretats per les cèl·lules, l'amoni i el lactat, i dels seus rendiments subproducte/substrat 1.91 mmolLac/mmolGlc i 0.79 mmolAmm/mmolGln pel cultiu de referència i 2.0 mmolLac/mmolGlc i 0.92 mmolAmm/mmolGln pel cultiu fortificat.

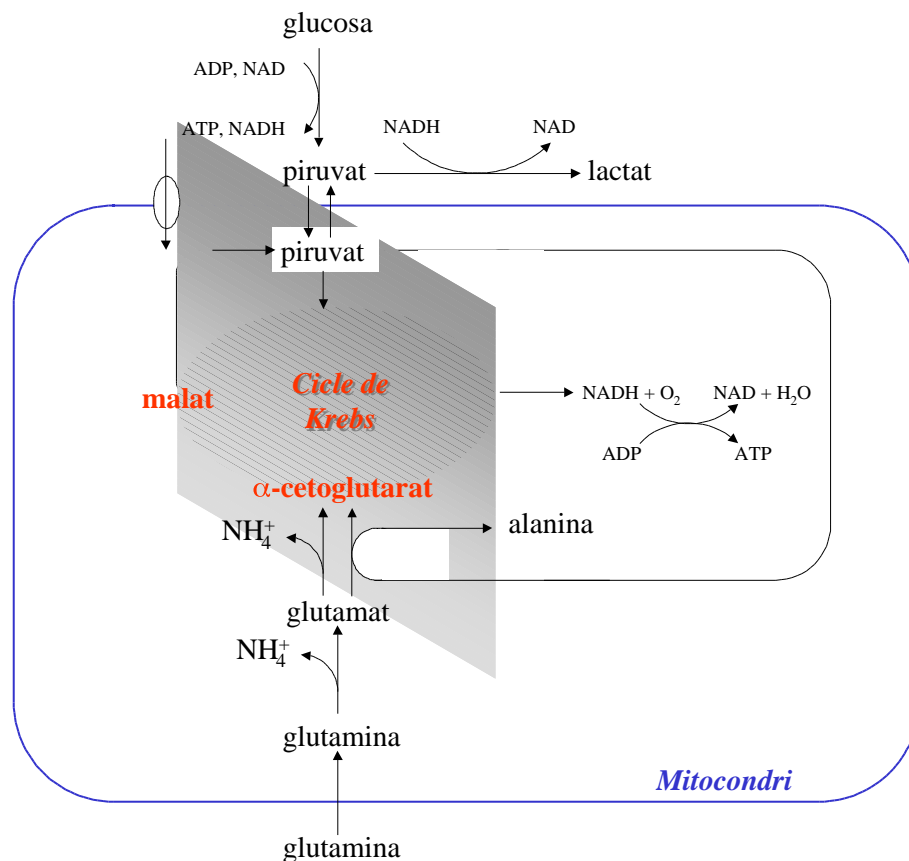


Figura 6.13. Presentació esquemàtica del metabolisme energètic de les cèl·lules d'hibridoma KB-26.5.

L'amoni es produeix durant la desaminació de la glutamina per tal de donar glutamat i en la subseqüent formació de α -cetoglutarat. El lactat és, com ja s'ha descrit abans, el producte final de la glucòlisi i la glutaminòlisi. Mentre que l'alanina és un dels subproductes principals de la infrautilització de la glutamina (Sanfeliu, 1995), estant també influenciat per la concentració dels substrats principals en l'entorn cel·lular. L'alanina es produeix en grans quantitats i es forma a partir del piruvat i glutamat. En els cultius cel·lulars presentats el rendiment alanina/glutamina s'incrementa un 37% en el cultiu fortificat, estant la seva producció relacionada amb el metabolisme de la glucosa i de la glutamina. En els cultius en discontinu, amb concentracions de substrats com les fins aquí presentades, el rendiment oxigen/glucosa es manté pràcticament constant i aproximadament igual a 0.36 mmolO₂/mmolGlc. El que varia és la velocitat específica del consum d'oxigen. Així, en la

fase exponencial del cultiu fortificat l'oxigen es consumeix més ràpidament que en la del cultiu de referència. La interpretació d'aquest comportament es pot atribuir a una desregulació entre la capacitat de la cèl·lula d'incorporar els substrats, glucosa i glutamina, i la capacitat per metabolitzar-los eficientment. El lactat seria el subproducte principal de la infrautilització de la glucosa que s'ha observat al llarg dels cultius realitzats en discontinu. Això podria explicar-se pel fet que tant el transport cap a l'interior de la cèl·lula, així com la seva conversió a piruvat, són processos molt ràpids per aquestes cèl·lules, produint-se com a conseqüència grans quantitats de NADH. D'altra banda, la llançadora malat/aspartat, que té com a funció transportar el NADH a l'interior del mitocondri perquè sigui regenerat a NAD amb una gran obtenció d'energia, és poc eficient i funciona a una velocitat inferior a la de producció del NADH a partir de la glucòlisi. Com a conseqüència d'aquesta desregulació, la cèl·lula utilitza l'enzim lactat deshidrogenasa per regenerar aquesta quantitat de NADH a NAD en el propi citoplasma, donant com a producte lactat a partir de la major part de piruvat generat en la glucòlisi. El subministrament en excés de glutamina i l'entrada de poc piruvat de la glucòlisi al TCA, té com a conseqüència una manca d'oxidació dels intermediaris metabòlics de la glutamina, que acaben sortint del cicle de Krebs en forma de malat i són transformats en passos posteriors també a lactat i alanina. Resumint, amb un excés dels nutrients principals en el medi de cultiu, les cèl·lules els metabolitzen a gran velocitat col·lapsant el cicle de Krebs tant per la via de la glucòlisi com per la ruta de la glutaminòlisi, tot i que no siguin estrictament necessaris per mantenir la població cel·lular, generant grans quantitats de lactat, amoni i certs aminoàcids com a subproductes.

Com ja s'ha descrit, la producció de subproductes s'ha incrementat notablement en el cultiu fortificat, i com a conseqüència de l'elevada concentració de lactat acumulada, pràcticament el doble a la del cultiu de referència, s'addiciona gran quantitat de base (NaOH 200 mM) dins del bioreactor per poder mantenir el pH en el valor de consigna. Aquest fet fa augmentar l'osmolaritat del medi, ja elevada des del principi, i juntament amb les altes concentracions de metabolits produïdes durant el cultiu, com el lactat i l'amoni, provoquen probablement l'aturada del creixement. Així, tant el creixement de les cèl·lules d'hibridoma, com la producció d'anticossos monoclonals, depenen en gran part dels nutrients i subproductes del metabolisme cel·lular, i de la seva concentració dins del reactor (Glacken i col., 1986; Ozturk i col., 1992; Martinelle i Häggström, 1993). En conclusió, encara que la fortificació del medi basal ofereix les avantatges del mode d'operació en discontinu i permet obtenir una certa millora, els possibles efectes inhibitoris per les altes concentracions d'alguns subproductes del metabolisme cel·lular limiten l'extensió de l'optimització que es pot realitzar amb aquesta estratègia. Per tant, en aquests casos, els nutrients s'haurien d'addicionar gradualment i en baixes concentracions en el cultiu, essent el *fed-batch* el mode d'operació més adequat per aquest propòsit.