

6.4. OPERACIÓ EN CONTINU AMB PERFUSIÓ.

Com a conseqüència dels resultats obtinguts en el sistema de cultiu en *fed-batch*, es desprèn l'interès que pot tenir el desenvolupament i utilització d'una estratègia de cultiu en perfusió, en què es persegueixen dos objectius bàsics: augmentar la concentració cel·lular al reactor mitjançant la retenció de les cèl·lules al seu interior per algun sistema físic, i optimitzar l'addició de nutrients i l'eliminació de subproductes metabòlics mitjançant la circulació contínua de medi al reactor.

La posada a punt d'un sistema de perfusió requereix, per altra banda, un esforç en diferents aspectes, dels que cal destacar: l'elecció del mètode de retenció cel·lular com un dels paràmetres clau en el rendiment d'aquests sistemes, el sistema d'oxigenació que ara ha de permetre el subministrament a un nombre de cèl·lules superior, i el disseny del medi de cultiu. A més, en els bioreactors d'alta densitat cel·lular la variació de la concentració cel·lular, així com també de la demanda metabòlica, requereix l'ajust constant de la velocitat de perfusió per tal d'adaptar el subministrament de nutrients a les cèl·lules.

En les últimes dues dècades s'han desenvolupat diferents tipus de reactors basats amb aquest sistema d'operació que han estat considerats per fer la selecció d'un d'ells (De la Broise i col., 1992; Ozturk, 1996; Kong i col., 1999). Els anomenats *hollow-fibers*, tot i que permeten aconseguir altes densitats cel·lulars i que s'han desenvolupat molt a nivell comercial, són sistemes que produeixen moltes heterogeneïtats locals, que fan que el creixement pugui no ser homogeni, no permeten mesurar de forma directe el nombre de cèl·lules que hi ha al seu interior, i des del punt de vista del bioprocés són difícils d'escalar. L'encapsulació o immobilització cel·lular és atractiva per aconseguir altes densitats cel·lulars (Shirai i Hashimoto, 1989; De la Broise i col., 1992). No obstant, cal considerar que aquests sistemes presenten alguns inconvenients com són en primer lloc, la incorporació d'una nova etapa preliminar al sistema de cultiu, que n'augmenta la complexitat, i en segon lloc, el procés d'immobilització sol afectar la viabilitat cel·lular, apareixent limitacions degudes als fenòmens de difusió de substrats i productes a través del suport d'immobilització, de manera que el creixement i la producció cel·lular es veuen afectats (Tintó, 1999). Els sistemes d'adhesió cel·lular sobre una gran varietat de suports (Wang i col., 1992; Kong i col., 1999) s'han aplicat molt més a la producció comercial, en particular per a línies cel·lulars adherents on les cèl·lules requereixen créixer sobre una superfície. En aquest cas el desenvolupament dels anomenats *microcarriers* ha permès la intensificació d'aquests processos. Una altra aproximació molt diferent a la perfusió consisteix en emprar sistemes en què les cèl·lules creixen en suspensió, i el reactor té un sistema físic de retenció, bé intern o extern. L'avantatge fonamental d'aquests sistemes és que el cultiu està en condicions homogènies i que l'adaptació d'un fermentador a l'operació en perfusió és relativament simple des del punt

de vista dels equips necessaris i la metodologia. Per aquestes raons s'ha seleccionat aquest mètode.

Per tant, en aquest apartat es descriu la posta a punt d'un sistema de perfusió basat en acoblar un mòdul extern al reactor del que ja es disposa, adaptar un nou sistema d'aeració per microbomboleig d'aire, i desenvolupar una metodologia d'operació controlada, a partir de les mesures de què es disposa en aquest treball, i que es basarà en el subministrament de nutrients a les cèl·lules en funció de les seves característiques metabòliques.

6.4.1 Funcionament i posta a punt del cultiu en continu amb perfusió.

6.4.1.1. Elecció del sistema de retenció cel·lular.

La retenció de les cèl·lules dins del bioreactor requereix d'algun tipus de procés de separació. La majoria dels dispositius de retenció cel·lular actualment en ús són adaptacions dels mètodes convencionals de la separació sòlid-líquid. Aquests es divideixen en dos categories: aparells de filtració i de sedimentació. Més recentment s'ha desenvolupat la separació cel·lular ultrasònica (Trampler i col., 1994; Zhang i col., 1998) la qual reté les cèl·lules en base a les diferències de compressibilitat i densitat entre el medi i les cèl·lules. Els dispositius de sedimentació, com els sedimentadors (Laporte i col., 1995) i les centrífugues contínues (Jhonson i col., 1996), realitzen la separació en base a la diferència de densitat entre el medi i les cèl·lules. Cadascun d'aquests mètodes té avantatges i desavantatges (Woodside i col., 1998). Actualment, els més utilitzats són els mètodes de filtració, i permeten convertir els bioreactors que operen en discontinu, en bioreactors en continu amb perfusió d'una forma relativament directa. Les configuracions de filtració retenen les cèl·lules en base a la mida. Els diferents dispositius de filtració utilitzats són els *spin filters* (Yabannavar i col., 1994), els filtres *flat sheet* (De la Broise i col., 1992) i els filtres de fibres buides o *hollow-fibers* (Shi i col., 1992; Zhang i col., 1993; Kyung i col., 1994). Hi han dues opcions per col·locar un sistema de perfusió amb filtració en un bioreactor. Es poden muntar dins o fora del bioreactor. Els *spin filters* i els filtres de fibres buides tenen les dimensions adequades per col·locar-los dins de la majoria dels bioreactors. Els filtres *flat sheet*, com també els filtres de fibres buides, poden muntar-se fora del bioreactor i es connecten mitjançant un circuit extern de recirculació. Ambdós tipus de configuracions tenen avantatges i desavantatges. La col·locació del filtre dins del bioreactor elimina la necessitat de bombes per moure el contingut del cultiu a través del filtre i retornar-lo cap al bioreactor. L'inconvenient d'aquesta configuració és que no hi ha accés al cultiu una vegada s'ha iniciat l'operació. Si hi ha qualsevol problema amb el conjunt de filtració (com l'obturació dels porus), el bioreactor s'ha de desconnectar, aturant-se el procés de producció. A més, els *spin filters* són dispositius especialitzats que requereixen modificacions importants del sistema d'agitació i de la tapa del bioreactor, les quals poden

requerir un treball específic d'enginyeria industrial. D'altra banda, les configuracions de filtres externs es connecten al bioreactor a partir de les entrades ja existents en aquest, i no requereixen d'elements addicionals molt especialitzats. L'únic que requereixen és que les cèl·lules es puguin bombejar a través d'un circuit extern. Si un filtre de perfusió extern s'obtura (o passen d'altres problemes) es pot canviar, permetent així un període d'operació més perllongat. Un possible desavantatge d'aquests sistemes és l'estrès imposat a les cèl·lules en el mecanisme de bombolleig i circulació extern, tot i que aquest factor depèn en gran part del tipus de cèl·lules.

Un sistema de perfusió amb filtració necessita una retenció eficient de les cèl·lules dins del bioreactor, un sistema de filtració compacte, que es pugui canviar ràpidament quan esdevingui obturat i una porositat de membrana suficientment gran per permetre la recuperació del producte d'interès. De les diferents opcions de filtració disponibles, el filtre de fibres buides amb microporus és la que millor satisfà els requeriments per a un òptim rendiment del sistema de perfusió amb filtració. Aquests tenen grans relacions d'àrea de filtració per volum, són compactes, fàcils d'incorporar a la configuració del circuit de líquid i, si és necessari, es poden canviar durant l'operació. Un filtre amb 0.2-0.45 μm de mida de porus permet altes velocitats de flux, grans volums filtrats i la recollida contínua del medi exhaurit que conté el producte, lliure de cèl·lules. El filtre comercial finalment seleccionat per a realitzar aquest treball té el nom de CellFlo (Microgon) i les seves especificacions tècniques es detallen a l'apartat 8.2.3.

6.4.1.2. Elecció de la velocitat de recirculació.

Per dissenyar i operar el sistema de perfusió basat en el mòdul de filtració extern cal tenir en compte el volum del reactor, el cabal de medi que es vol fer passar pel mòdul de membranes, la superfície del mòdul de filtració i l'efecte d'estrès sobre les cèl·lules. D'aquests factors, el que és més important és la sensibilitat de la línia cel·lular a l'esforç de cisallament (*shear stress*). Totes les línies cel·lulars tenen diferent sensibilitat. Un dels mecanismes que causen l'esforç de cisallament en els cultius de cèl·lules animals que operen amb el mode de continu en perfusió és el bombejament del brou de cultiu al circuit de perfusió amb filtració. L'esforç de cisallament està directament relacionat amb el règim de circulació en el tub, essent més elevat quant més turbulent sigui aquest. Per tant, vindrà influenciat per la velocitat de recirculació necessària, el diàmetre del tub de silicona utilitzat al circuit i les revolucions, en rpm, de la bomba de recirculació.

Alguns estudis han examinat els efectes de l'esforç de cisallament sobre les cèl·lules animals que són bombejades a través d'un circuit de recirculació extern que conté un mòdul de microfiltració de fibres buides (Maiorella i col., 1991; Zhang i col., 1993), en una

configuració experimental bastant similar a la utilitzada en aquest treball. Aquests estudis varen mostrar que les cèl·lules poden tolerar una velocitat superficial de cisallament (*wall shear rate*), abans que es visualitzi una pèrdua de viabilitat cel·lular, de fins a 3000 s^{-1} (Maiorella i col., 1991) o de fins a 1300 s^{-1} (Zhang i col., 1993). Per a fluids newtonians, laminars i independents del temps que circulen per les fibres buides, la velocitat de cisallament (*shear rate*, $\dot{\gamma}$) es pot expressar com:

$$\dot{\gamma} = \frac{4Q}{\pi r_{fb}^3} = \frac{8V_M}{D_{fb}} \quad (\text{Eq. 6.21})$$

on $\dot{\gamma}$ té unitats de s^{-1} , Q és el cabal del líquid en unitats de l/s, r_{fb} és el radi de les fibres buides en m i V_M és la velocitat mitja del fluid en m/s. Si es considera que la velocitat mitjana del fluid és:

$$V_M = \frac{4Q}{\pi D^2 N} \quad (\text{Eq. 6.22})$$

on N és el nombre de fibres. Aleshores l'equació 6.21 resta com:

$$\dot{\gamma} = \frac{32Q}{\pi D^3 N} \quad (\text{Eq. 6.23})$$

A partir d'aquesta expressió es pot calcular la velocitat de cisallament dins del mòdul de microfiltració CellFlo a qualsevol cabal de recirculació. Coneixent la velocitat de cisallament es pot fixar la velocitat de recirculació pel continu amb perfusió. Els treballs previs que han quantificat aquests efectes recomanen no exercir un determinat valor de $\dot{\gamma}$, que se situa en 3000 s^{-1} en el treball de Maiorella i col. (1992), i 1300 s^{-1} en el de Zhang i col. (1993). Per tant, tenint en compte que el diàmetre intern de la fibra és igual a 1 mm i que el nombre de fibres és 120 pel cartutx en qüestió, es pot establir un límit superior per a la velocitat de recirculació, que és igual al rang 920-2100 ml/min. La resistència a l'esforç de cisallament varia enormement amb diferents condicions d'operació i d'una línia cel·lular a l'altra. Per tant, s'ha de consignar un valor de seguretat per a la velocitat de recirculació de com a mínim 3 vegades per sota la velocitat que s'ha considerat com la màxima (920 ml/min). El valor que finalment s'ha utilitzat per a la operació ha estat de 250 ml/min i un diàmetre de tub de silicona per al circuit extern de 5 mm. Aquest valors han de permetre que la recirculació del medi de cultiu no afecti negativament la viabilitat cel·lular.

6.4.1.3. Caracterització del nou sistema d'aeració.

Fins ara el sistema d'aeració utilitzat ha estat la membrana tubular de silicona. Aquest sistema ha estat suficient, degut al baix consum d'oxigen assolit per les cèl·lules a la fase de creixement exponencial. Tot i que el sistema de tub de silicona ha aconseguit mantenir l'oxigen dissolt consigna per les moderades densitats cel·lulars en els dos processos estudiats fins aquí, s'ha de destacar, però, que si el cultiu hagués consumit oxigen exponencialment per valors de densitat cel·lular superiors al rang de $2.2-2.5 \times 10^6$ cèl·lules vives/ml la capacitat del sistema de tub de silicona amb aire no hauria pogut mantenir el punt de consigna d'oxigen dissolt al bioreactor ($pO_2 = 60\%$), i s'hauria d'haver utilitzat una mescla enriquida d'aire amb oxigen pur. És a dir, en les condicions assolides fins ara el sistema d'aeració amb tub de silicona està a la vora del seu límit. Les densitats cel·lulars en la perfusió poden arribar a ser molt més altes a les aconseguides pels altres tipus d'operació. Per tant, es pot preveure que el sistema amb membrana tubular de silicona, inclòs enriquit amb oxigen pur, no és una bona solució. Per tant, a fi de subministrar suficient oxigen al cultiu, s'ha utilitzat un altre sistema d'aeració. Aquest nou sistema d'aeració de dinàmica molt més ràpida, conceptualment es basa en l'anomenat *microsparging* (microbombolleig). Es tracta d'utilitzar un cilindre d'acer sinteritzat amb infinitat de microporus, d'entre $10 \mu\text{m}$ i $20 \mu\text{m}$ de diàmetre, que generen un nombre elevat de bombolles de petit diàmetre, i per tant augmentant molt l'àrea interfacial de contacte gas-líquid. Així, amb el microdifusor d'acer sinteritzat es poden aconseguir velocitats de transferència d'oxigen més altes i, aleshores, si el tipus d'operació ho permet, elevades densitats cel·lulars. De totes formes, aquest tipus d'aeració està limitat pels processos de lisi cel·lular i pels problemes de formació d'escuma, essent el cabal d'aeració límit del sistema de 0.2 vvm (400 ml/min de cabal de gas per al volum de reactor emprat, 2 litres) i la velocitat d'agitació màxima de 120 rpm al bioreactor Biostat MCD.

En els cultius de cèl·lules animals amb una difusió directe de bombolles de gas, es recomana l'addició del polímer Pluronic F-68 i d'un agent antiescumejant per minimitzar els problemes de lisi cel·lular i de formació d'escumes relacionats amb l'aeració, a més d'augmentar la capacitat d'oxigenació del microdifusor de bombolles (Zhang i col., 1992). El Pluronic F-68 és un copolímer de poliètilè (POE) i polioxipropilè (POP) amb un pes molecular al voltant de 8400 . Té la següent estructura general:



on i són estadísticament iguals. Aquest polímer protegeix les cèl·lules del trencament de les microbombolles de gas, produït en la interfase líquid-gas i, a més a més, al disminuir la mida de bombolla, augmenta el coeficient volumètric de transferència d'aire ($k_L a$). A la bibliografia es recomana treballar entre el 0.02% i 0.2% de concentració final (p/v). En aquest

cas s'han utilitzat concentracions de Pluronic en el medi de cultiu inicial i el d'alimentació del 0.2% (la preparació de la solució es detalla a l'apartat 8.6.4). Per tal d'evitar la formació d'escumes en la part superior del bioreactor, deguda a l'intens bombolleig del medi de cultiu, s'ha addicionat un volum de solució d'antiescumejant al 1% (v/v), restant en el medi de cultiu una concentració final d'antiescumejant de 50 ppm. Aquesta mateixa quantitat s'ha addicionat als diferents medis concentrats utilitzats al llarg de la perfusió.

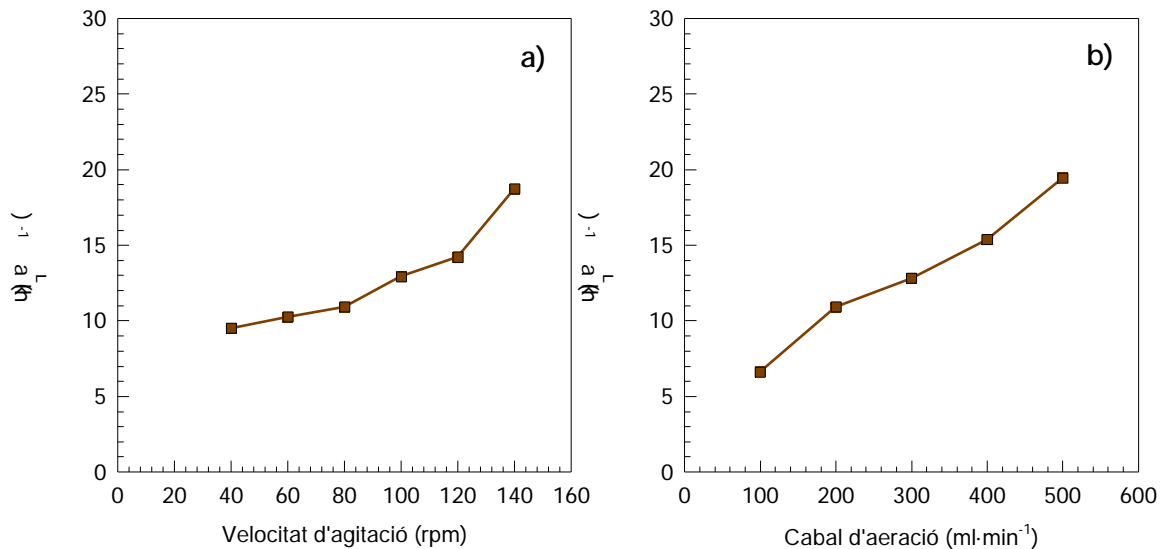


Figura 6.26. Valors del k_{La} per al microdifusor d'acer sinteritzat en medi DMEM amb el 0.2% de Pluronic F-68 i 50 ppm d'antiescumejant. a) Cabal d'aeració constant a 200 ml/min; b) Velocitat d'agitació constant a 80 rpm.

Una vegada s'ha definit el medi de cultiu (DMEM estàndard) i les addicions complementàries per tal d'evitar alguns problemes associats al nou sistema d'aeració, s'ha caracteritzat la capacitat de transferència d'aeració en una sèrie d'experiments, on es determina el k_{La} per a diferents condicions. El k_{La} es determina segons el mètode d'eliminació de gasos descrit a l'apartat 4.5.1. En una sèrie d'experiments per determinar el perfil de k_{La} , es tracta de variar la velocitat de l'agitador (40-120 rpm) amb increments de 20 rpm a un cabal d'aeració fixat (200 ml/min). En l'altra sèrie es tracta de variar el cabal d'aeració (100-500 ml/min) amb increments de 100 ml/min a una velocitat de l'agitador fixada (80 rpm). Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 6.26. En la sèrie d'experiments on el cabal d'aeració és constant (Figura 6.26a) es pot observar com el k_{La} augmenta amb l'increment de la velocitat d'agitació, des de valors de 10 h⁻¹ fins a valors al voltant de 20 h⁻¹. En la sèrie on la velocitat d'agitació és constant (Figura 6.26b) es pot observar com també el k_{La} augmenta amb l'increment del cabal d'aeració, des de valors de 6 h⁻¹ fins a valors al voltant de 22 h⁻¹. Per tant, combinant els efectes del cabal d'aeració i la velocitat d'agitació es poden tenir valors molt més alts del k_{La} assegurant un bon subministrament d'oxigen per a elevades densitats cel·lulars.

Per saber si el sistema d'aeració pot suportar una concentració cel·lular (X) de com a mínim de 10^7 cèl·lules viues/ml s'ha estimat un possible rang de $k_L a$ considerant un valor de consigna per al pO_2 del 60% ($C_b = 0.6 \cdot C^*$) que equival a 0.116 mM, assumint una concentració d'oxigen saturat en el medi de cultiu (C^*) de 0.194 mM i un rang de velocitats específiques de consum d'oxigen (q_{O_2}) per a l'híbridoma KB-26.5 de 100-170 $nmolO_2/(10^6 \text{ cèl·lules} \cdot h)$. Si aquests valors es substitueixen a l'expressió:

$$k_L a = \frac{10^{-3} X q_{O_2}}{(C^* - C_b)} \quad (\text{Eq. 6.23})$$

s'obté que per a densitats cel·lulars de l'ordre de 10^7 cèl·lules/ml es requereixen valors del $k_L a$ entre 13 h^{-1} i 22 h^{-1} , segons la velocitat específica d'oxigen consumit per les cèl·lules a l'operació en perfusió. En principi, aquests valors són possibles d'assolir per part del sistema directe d'aeració per microbombolles i si no ho fossin, s'hauria de connectar una línia suplementària d'oxigen pur per enriquir la mescla de gasos. Les restriccions que s'han imposat en aquest cultiu, per evitar l'efecte de l'esforç de cisallament, són de no sobrepassar un cabal d'aeració i una velocitat d'agitació de 350 ml/min i 120 rpm respectivament. De totes formes, a l'inici del cultiu en perfusió és recomanable treballar amb la membrana tubular de silicona per assegurar un bon creixement cel·lular amb el mínim estrès abans de començar l'operació en perfusió pròpiament dita. En les primeres hores de l'etapa de microfiltració, els cabals d'aeració i les velocitats d'agitació han estat baixos per evitar els possibles problemes amb l'esforç de cisallament, 200 ml/min i 80 rpm respectivament. A mida que la densitat cel·lular s'incrementa, es va augmentant el cabal d'aeració i la velocitat d'agitació fins als seus valors màxims.

6.4.1.4. Funcionament i connexions de l'operació en perfusió.

La configuració i procediment experimental emprat per l'operació en perfusió es presenten a l'apartat 8.8.3. A l'igual que l'operació en *fed-batch*, el cultiu en continu amb perfusió parteix d'una operació en discontinu per tenir una mínima quantitat de cèl·lules com a base per poder començar el nou mode d'operació. La solució d'aliment s'introdueix dins el bioreactor mitjançant una bomba dosificadora de membrana d'alta precisió (FE-211, Braun). El brou de cultiu es bombeja ininterrompudament a través d'un circuit que conté al mòdul de microfiltració (CellFlo, Microgon). A diferència de les operacions anteriors, en aquest muntatge la neteja dels sensor turbidimètric es realitza amb el mateix circuit de recirculació. Una de les connexions laterals del cartutx serveix per extreure, amb l'ajut del controlador de nivell, el medi exhaurit cap al recipient de recollida de líquid residual. L'altra dels connectors laterals s'utilitza per realitzar, de forma intermitent, rentats de la superfície interior de les membranes del mòdul, per així allargar la vida útil del cartutx. Quan les cèl·lules mortes es

comencen a acumular en quantitats considerables, s'activa un circuit de purga cel·lular per així intentar reduir aquesta acumulació a l'interior del bioreactor. A la Figura 6.27 es mostra l'esquema del muntatge experimental amb els diferents equips connectats a l'ordinador per a l'operació en perfusió. La bomba FE-211 està connectada a la DCU de l'equip de cultiu cel·lular per transmissió analògica/digital (A/D). Al mateix temps la DCU, com ja s'ha descrit abans, es comunica via port sèrie amb l'ordinador, permetent així la gestió remota de la velocitat de la bomba, entre d'altres variables. L'electrovàlvula, el sensor turbidimètric i la resta de bombes s'endollen a la caixa de comunicacions que a la seva vegada està connectada a l'ordinador mitjançant una targeta d'adquisició de dades, que permet convertir el senyal analògic a digital i el digital a analògic i, a més a més, proporciona sortides i entrades digitals.

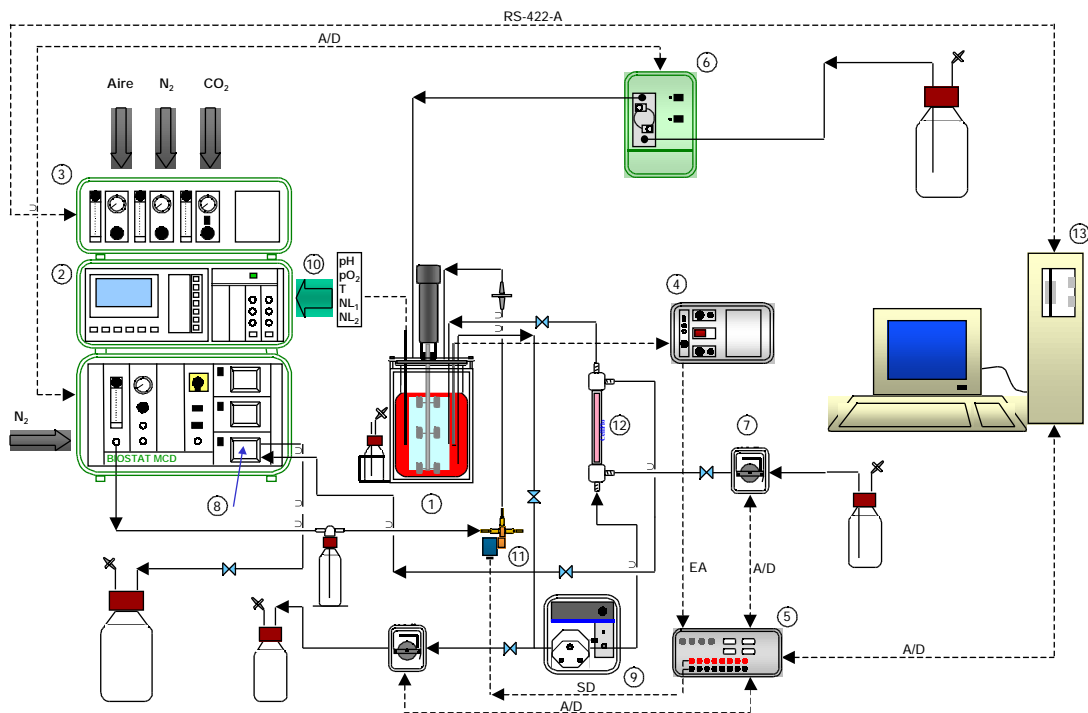


Figura 6.27. Esquema de l'adquisició de dades i control de l'operació en perfusió. 1) Bioreactor Braun Biostat MCD, 2) Unitat de control digital (DCU), 3) Estació de mescla de gasos pO_2 Gas-Flow, 4) Sonda Aquasant AF44 i transmissor AS82, 5) Caixa de comunicacions, 6) Bomba Braun FE-211, 7) Bomba Ismatec, 8) Bomba FOAM, 9) Bomba Masterflex L/S, 10) Sondes de temperatura, pH, pO_2 i nivell (NL_1 i NL_2), 11) Electrovalvula Sirai, 12) Mòdul de microfiltració Microgon CellFlo, 13) Ordinador de gestió i control. A/D = Sortides i Entrades Analògiques/Digitals, EA = Entrada Analògica, SD = Sortida Digital, RS-422-A = port sèrie.

6.4.1.5. Esquema de control de la velocitat de perfusió.

Com ja s'ha comentat abans, el creixement cel·lular és un procés canviant al llarg del temps, per tant es necessita automatitzar el procés de perfusió per garantir un mateix entorn nutricional i de subproductes al llarg de l'operació. En aquest sentit, s'ha dissenyat l'esquema de control per a la perfusió, que té com objectiu de control mantenir la concentració de

glucosa en un valor residual, no limitant, i a uns nivells moderats i estables de subproductes al llarg del cultiu, mitjançant la variació del cabal d'alimentació i en funció de la concentració cel·lular actual del cultiu. Fonamentalment, el que fa aquest sistema de control és calcular el cabal de d'alimentació per al pròxim interval de temps en funció de la resposta actual del sistema i d'un model de predicció. Aquesta configuració presenta diferències amb els esquemes de control proposats per a l'operació en *fed-batch*. La diferència bàsica és que aquí no s'alimenta al sistema amb dades per poder corregir la possible desviació del punt de consigna (Glc_{sp}). Aquest sistema de control presenta certes similituds amb l'anomenat control *feedforward* (Stephanopoulos, 1984).

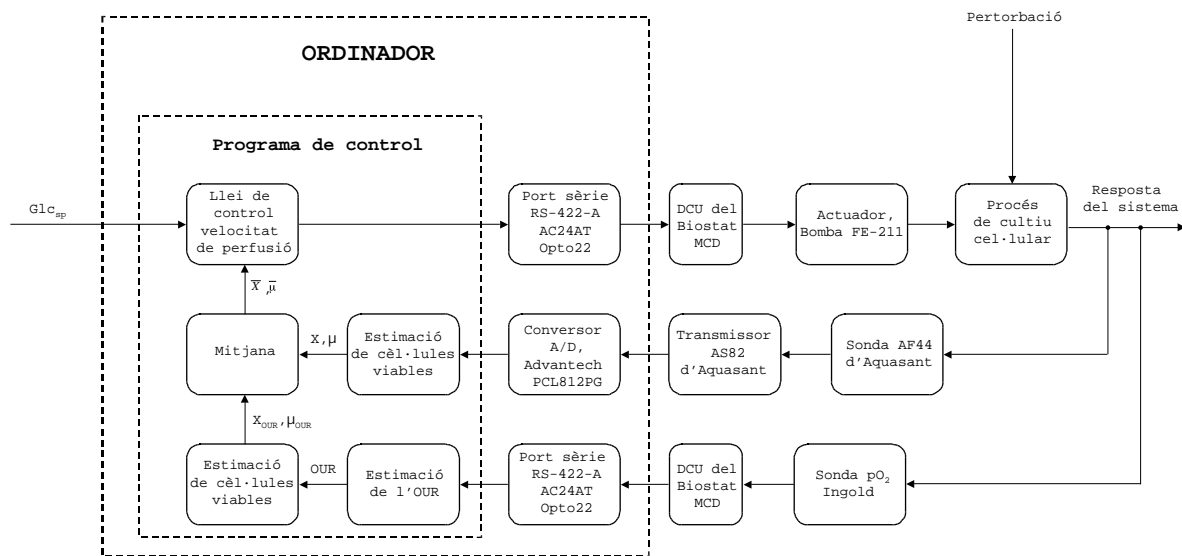


Figura 6.28. Esquema de la configuració del sistema de control utilitzat per mantenir constant l'entorn de creixement al cultiu en perfusió.

El sistema de control que s'esquematitza a la Figura 6.28 presenta un llaç de control amb dues entrades d'informació al model de predicció. Aquestes entrades són les mesures directa i indirecta de la concentració cel·lular, és a dir, la mesura de la terbolesa del medi de cultiu, i l'estimació de la densitat cel·lular a partir de les dades de la velocitat del consum d'oxigen. Es tenen en compte les dues senyals per obtenir un valor mitjà de concentració cel·lular que doni més fiabilitat a les mesures en l'etapa d'acumulació cel·lular (creixement exponencial). En la línia d'informació exterior de la Figura 6.28, s'estima la concentració cel·lular actual al bioreactor a partir de la mesura de OUR actual calculada (OUR_i) a partir de la relació d'aquesta amb la velocitat específica del consum d'oxigen, q_{O_2} , (Eq. 6.8) que es considera constant a la fase de creixement exponencial. En la línia d'informació interior de la Figura 6.28, es calcula la concentració de cèl·lules del bioreactor a partir de les dades del sensor turbidimètric. Els dos valors obtinguts s'amitjanen per donar més fiabilitat a l'esquema

de control proposat, obtenint-se un valor mitjà per a la concentració cel·lular actual al bioreactor (\bar{X}_i):

$$\bar{X}_i = X_i + \frac{10^3 OUR_i}{q_{O_2}} \Big/ 2 \quad (\text{Eq. 6.24})$$

on la OUR_i s'expressa en unitats de $\text{mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$, la q_{O_2} en $\text{nmolO}_2/(10^6 \text{ cèl}\cdot\text{lules}\cdot\text{h})$, la \bar{X}_i i la X_i en $10^6 \text{ cèl}\cdot\text{lules}/\text{ml}$.

Una vegada s'ha processat la informació, es realitza el càlcul del cabal d'alimentació ($Q_{add,i}$), en ml/min , per al pròxim interval de temps (Δt_{i+1}). Per tal propòsit es projecta la concentració cel·lular actual (\bar{X}_i) al temps de la pròxima mesura (t_{i+1}). L'expressió resultant és:

$$Q_{add,i} = \frac{q_{Glc} 10^3 \bar{X}_i \exp(\bar{\mu}_i \Delta t_{i+1}) V_r}{Glc_{aliment} - Glc_{sp}} \quad (\text{Eq. 6.25})$$

on l'interval de temps Δt_{i+1} es defineix com $\Delta t_{i+1} = t_{i+1} - t_i$ i s'expressa en unitats d'hores (h), q_{Glc} en $\text{mmol}/(10^6 \text{ cèl}\cdot\text{lules}\cdot\text{h})$, \bar{X}_i en $10^6 \text{ cèl}\cdot\text{lules}/\text{ml}$, $\bar{\mu}_i$ en h^{-1} , $Glc_{aliment}$ és la composició de glucosa en el medi d'alimentació i Glc_{sp} és la composició de glucosa prefixada en el medi de sortida exhaurit, i prenen valors de 23.3 mM i 8 mM respectivament, V_r és el volum del bioreactor que es manté constant al llarg del procés (2000 ml). La velocitat específica de creixement mitjana pel temps actual, $\bar{\mu}_i$, es determina amb els valors de les dues mesures, directa i indirecta, de concentració cel·lular. Una vegada es calcula el nou cabal ($Q_{add,i}$), el seu valor es converteix a llenguatge DCU per consignar la bomba FE-211 a la velocitat calculada durant el pròxim interval de temps.

El sistema de control proposat es transforma en llenguatge ANSI C dins del programa de gestió i control, l'aplicació Sequen, i en l'arxiu de protocol, PERFUSIO.TXT, que conté totes les ordres per poder realitzar l'estratègia d'alimentació contínua de nutrients. Aquest arxiu de protocol s'estructura d'acord al diagrama de flux que es presenta a la Figura 6.29, i el llistat d'ordres que conté es mostra a l'Apèndix B.

A continuació es presenta l'estudi realitzat per a un cultiu en continu amb perfusió, on es dóna especial atenció a l'operació del procés, l'eficiència de l'esquema de control i les condicions d'operació del cultiu que maximitzen la concentració de cèl·lules viables.

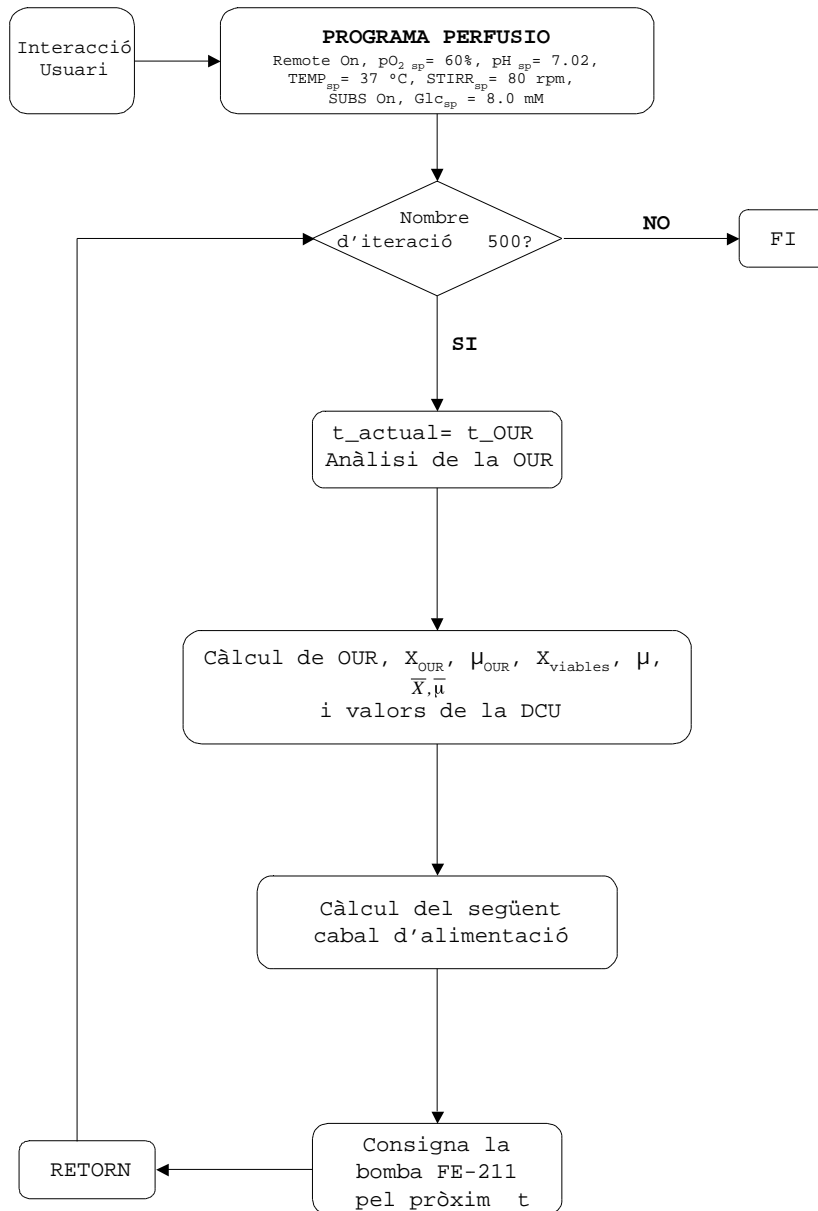


Figura 6.29. Diagrama de flux de l'arxiu de protocol PERFUSIO.TXT de l'operació en continu amb perfusió.

6.4.2. Control de l'entorn cel·lular mitjançant l'ajust de la velocitat de perfusió.

El cultiu en perfusió realitzat mostra dues parts clarament diferenciades. La primera part es denomina fase d'acumulació cel·lular (Figura 6.30a). Durant aquesta fase, el creixement cel·lular es maximitza mitjançant l'operació del reactor en condicions òptimes. Normalment aquesta fase queda limitada per algun factor de tipus tècnic. Les causes més habituals estan relacionades amb la capacitat del sistema d'aeració, la velocitat del medi d'alimentació o el mòdul de retenció cel·lular. Després d'establir una alta densitat cel·lular en el cultiu, el muntatge experimental es pot fer operar durant llargs períodes de temps per a la

recollida del producte pel circuit de medi exhaurit. Aquest període s'anomena fase de producció (Figura 6.30a). La descripció dels resultats del cultiu en perfusió es realitza per a cadascuna d'aquestes fases.

6.4.2.1. Fase d'acumulació cel·lular.

En aquesta fase s'ha aplicat l'esquema de control dissenyat a l'apartat 6.4.1.5, el qual pren com a criteri d'ajust de la velocitat de perfusió la concentració residual de glucosa al bioreactor. El cultiu s'ha iniciat en el mode d'operació en discontinu amb 2 litres de medi DMEM estàndard, on les concentracions de glucosa i glutamina a l'inici han estat de 23.3 mM i 4.7 mM respectivament, i amb els volums de solucions addicionals (Pluronic F-68 i antiescumejant) descrites a l'apartat 6.4.1.3. El bioreactor s'ha inoculat amb una concentració de cèl·lules viables de 0.48×10^6 cèl·lules/ml, utilitzant cèl·lules a la meitat de la fase de creixement exponencial d'un cultiu en flascó agitad. En el continu en perfusió pròpiament dit, s'ha iniciat manualment després que la concentració de cèl·lules viables estigués per sobre del milió de cèl·lules/ml (exactament 1.26×10^6 cèl·lules/ml), a les 45 hores d'iniciar-se el cultiu i a una concentració residual de glucosa al bioreactor de 9.1 mM. La composició del medi d'alimentació 1x, està descrita a l'apartat 8.6.1. En aquest punt, el programa de control ha començat a avaluar la velocitat de perfusió del cultiu segons la configuració de control dissenyada. L'usuari interacciona amb el programa de perfusió fixant a l'inici els valors de la q_{O_2} i la q_{Glc} (ambdues considerades constants sempre i quan el creixement sigui exponencial, i amb valors de $110 \text{ nmolO}_2/(10^6 \text{ cèl·lules}\cdot\text{h})$ i $350 \text{ nmolGlc}/(10^6 \text{ cèl·lules}\cdot\text{h})$), i els valor del Glc_{sp} (8.0 mM) i de la $Glc_{aliment}$ (23.3 mM). La recta de calibratge utilitzada per convertir el senyal turbidimètric a dades de concentració cel·lular es mostra a l'Apèndix C.

Les cèl·lules, en aquesta fase, han crescut exponencialment fins a un màxim cel·lular de 9.3×10^6 cèl·lules/ml després de 117 hores d'haver-se iniciat el cultiu (Figura 6.30a), mantenint-se la viabilitat en valors superiors al 80%. Com es pot observar a la Figura 6.30b i 6.30c, el cultiu al llarg de la fase d'acumulació cel·lular es manté a nivells no gaire alts de concentració de substrats, al voltant de 8.0 mM la glucosa i al voltant de 1.4 mM la glutamina. Els metabolits com el lactat, l'amoni i l'alanina al llarg d'aquesta fase s'han mantingut en uns rangs de concentració acceptables, per sota de 30 mM, 4 mM i 2 mM respectivament. Aquest valors són els normals al final de l'operació en discontinu. A la Figura 6.31 s'observa com no s'ha esgotat cap altre aminoàcid al llarg del procés d'acumulació de cèl·lules. A més a més, es pot observar com els nutrients necessaris per al creixement s'han mantingut en valors propers als que té definits el medi d'alimentació 1x. L'acabament de l'etapa d'acumulació cel·lular ve determinada per la limitació del cabal del circuit de medi exhaurit (5.0 ml/min), i correspon a una velocitat de perfusió de 0.15 h^{-1} (més de 5 vegades la μ_{max} , veure Figura 6.32).

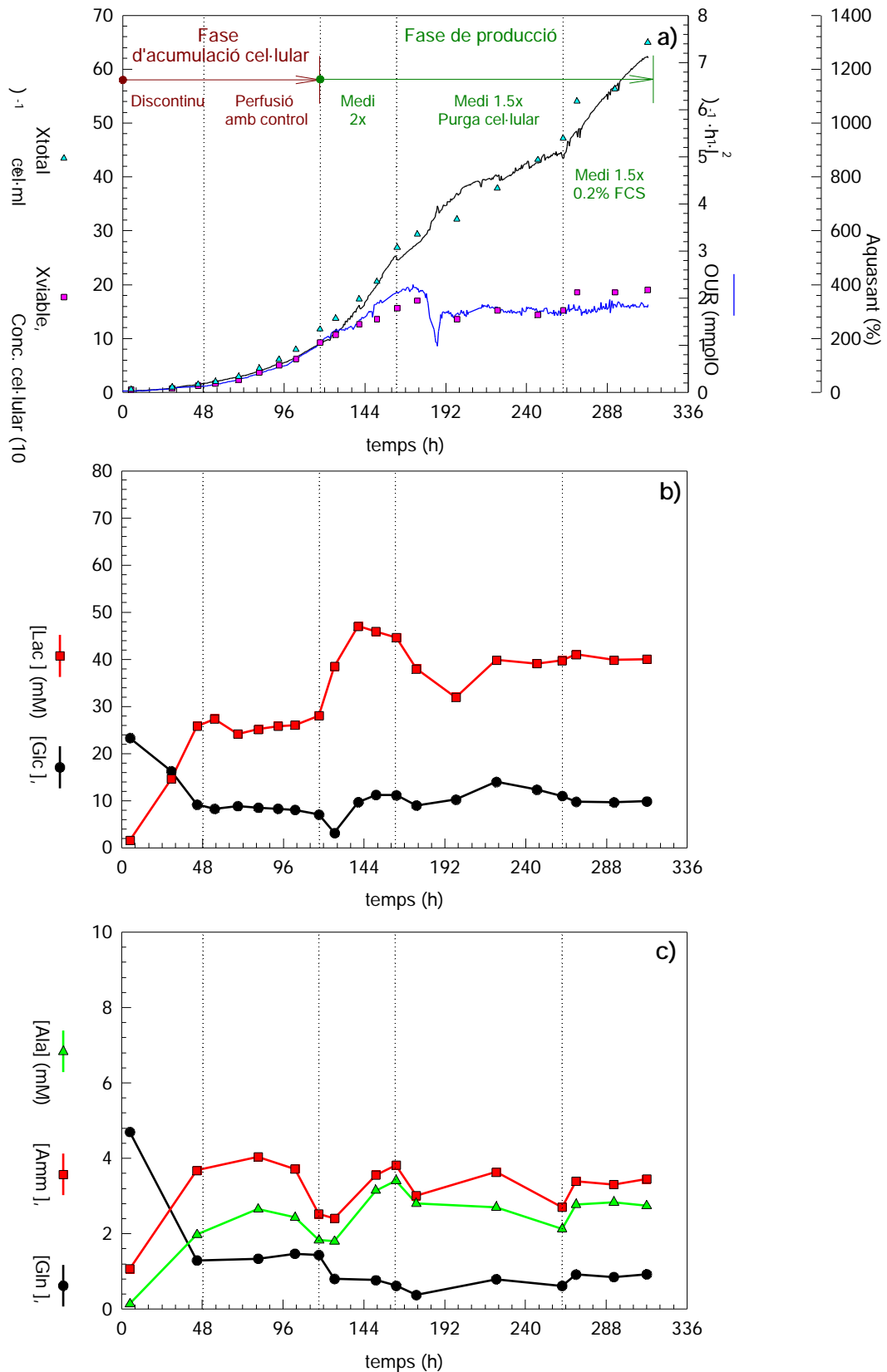


Figura 6.30. Evolució amb el temps de les diferents variables de l'operació en perfusió, a) de la concentració de cèl·lules viables (X_{viable}) i totals (X_{total}), de la OUR i del senyal del sensor turbidimètic; b) Concentracions de glucosa ([Glc]) i lactat ([Lac]) residuals al bioreactor; c) Concentracions de glutamina ([Gln]), amoni ([Amm]) i alanina ([Ala]) residuals al bioreactor.

En aquesta fase s'han realitzat mesures de OUR i de la terbolesa del brou cada hora. A la Figura 6.30a es pot observar com el valor de OUR augmenta al llarg del cultiu amb l'evolució del creixement cel·lular, arribant a un nivell màxim dintre de la fase d'acumulació cel·lular de $1.05 \text{ mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$ a les 117 h de cultiu. El màxim consum d'oxigen coincideix amb el de màxima densitat cel·lular. Al llarg de la fase estudiada, el cabal de gas del sistema d'aeració s'ha anat incrementant des de l'inici de la posta en funcionament (150 ml/min) fins al final de la fase, amb un valor final de 250 ml/min. De la mateixa forma s'ha operat amb la velocitat d'agitació, que s'ha augmentat des de les 80 rpm de l'inici fins a les 100 rpm finals. El volum de medi d'alimentació addicionat al cultiu arriba als 9900 ml de medi 1x, havent-se consumit un total de 105 mM de glucosa, 32 mM de glutamina i 35 mM d'oxigen. No s'han realitzat addicions d'àlcali per regular el pH, el que indica el bon entorn de creixement proporcionat al llarg de la fase. A la Figura 6.30a també es pot observar com la qualitat del senyal turbidimètric és bastant bona i com el perfil d'aquest senyal és paral·lel amb el del recompte fora de línia de la concentració de cèl·lules viables.

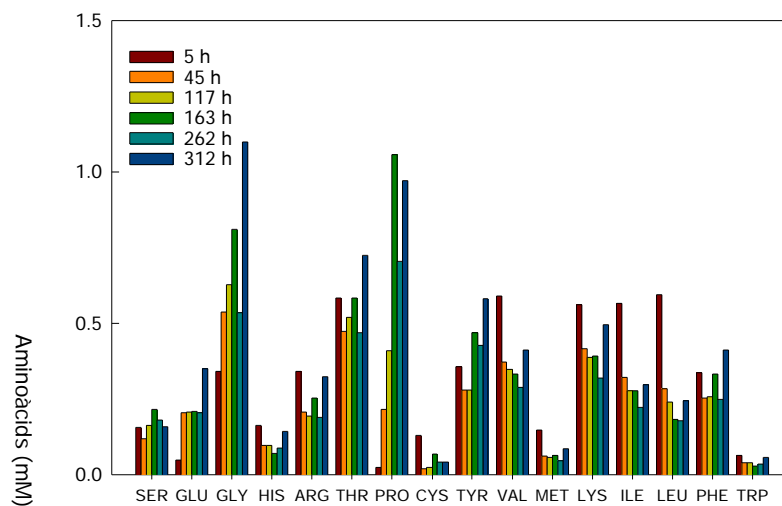


Figura 6.31. Evolució de la concentració dels aminoàcids restants al llarg del cultiu en perfusió.

Com es pot observar a la Figura 6.30b i 6.30c, el control de nutrients dissenyat ha mantingut satisfactòriament la concentració de glucosa al nivell consagrat (8.0 mM) i la de glutamina proporcionalment a aquest nivell (1.4 mM). Aquesta configuració de control també ha mantingut la resta de nutrients a concentracions semblants a les inicials sense produir-se ni una gran acumulació ni l'esgotament d'aquests (Figura 6.31). A la Figura 6.32 es pot observar com la velocitat de perfusió s'ha ajustat molt bé a la corba de la velocitat del consum d'oxigen. Aquest bon ajust indica la fiabilitat de l'esquema de control per fixar la velocitat de perfusió, i fa bones les suposicions que les q_{O_2} i q_{Glc} són constants al llarg de la fase de creixement exponencial. A més a més, es demostra que operant d'aquesta forma es manté l'entorn nutricional i residual constant i estable al llarg de la fase.

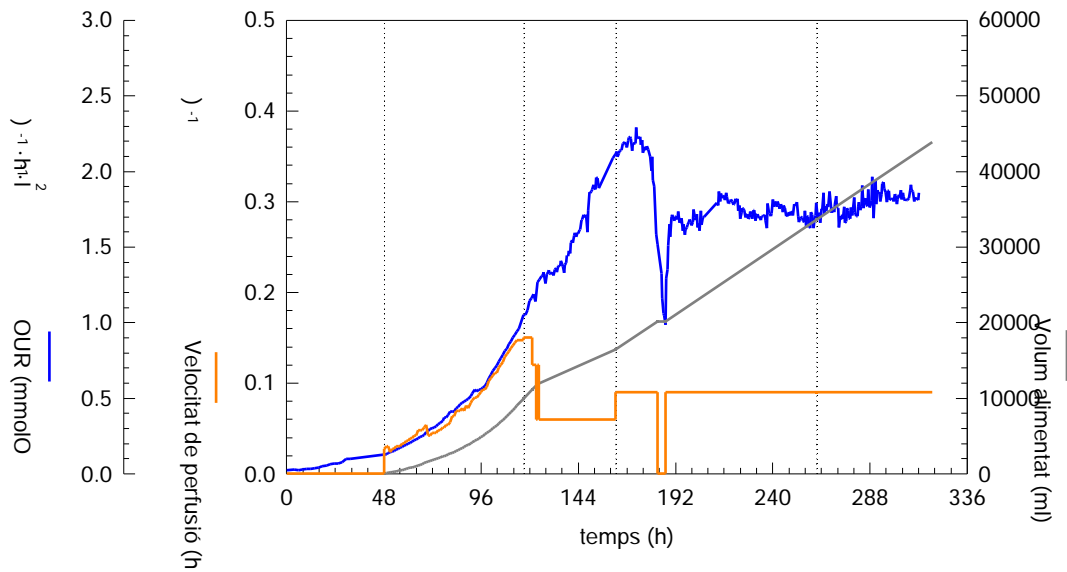


Figura 6.32. Evolució amb el temps de la velocitat de perfusió, del volum alimentat i la OUR.

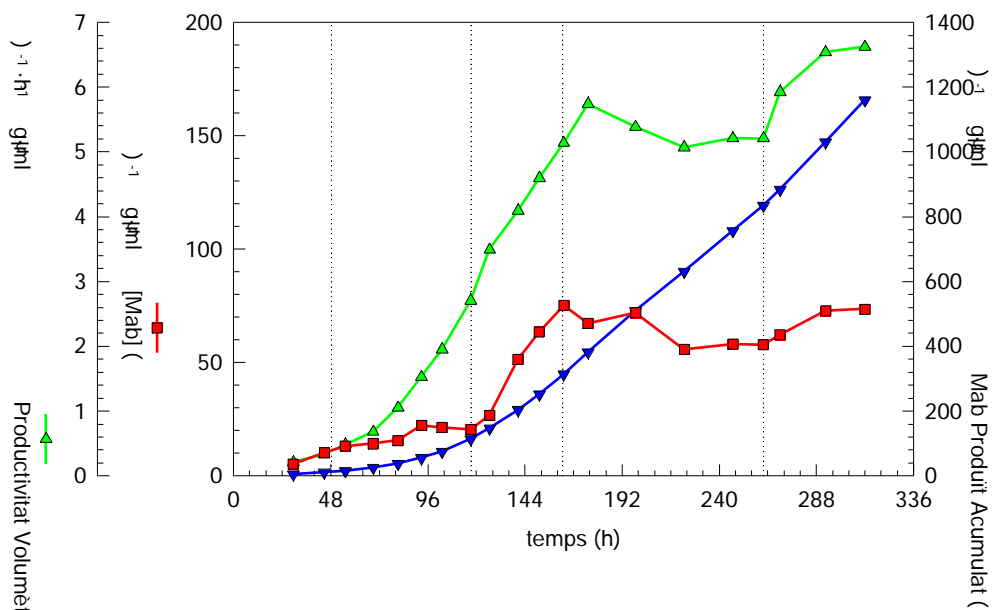


Figura 6.33. Evolució amb el temps de la concentració de producte a la sortida ([Mab]), de l'acumulació volumètrica de producte i de la productivitat volumètrica al cultiu en perfusió.

La fase d'acumulació ha representat un augment substancial de P_{vol} , no així de la concentració final de producte. En les últimes 24 h de la fase, la concentració d'anticòs en el medi exhaurit ha assolit un valor mitjà de concentració de $21 \mu\text{g/ml}$. El valor de la P_{vol} en aquesta fase ha estat variable, des de $0.33 \mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$ a l'inici de la perfusió (45 h) fins a un màxim a les 117 hores de cultiu de $2.7 \mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$, corresponent un valor mitjà per a la productivitat volumètrica, $\overline{P_{vol}}$, a tota la fase de $1.15 \mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$. Aquest augment de la productivitat del cultiu respecte als cultius realitzats anteriorment es pot atribuir directament a

l'augment de la densitat cel·lular. De totes formes, aquest increment no es reflecteix en el valor de concentració de producte final, i és comparable a les concentracions assolides al final d'un cultiu en discontinu. Per tant, encara que globalment s'han acumulat 113.4 µg/ml en tot el volum recollit del corrent de sortida, la dilució del producte en l'operació és molt important. Una anàlisi estimativa del producte durant la fase d'acumulació cel·lular ha permès plantejar la conveniència d'utilitzar altres medis d'alimentació més concentrats que permetessin subministrar els nutrients necessaris per al creixement i reduir la velocitat de perfusió, pel propòsit d'incrementar la concentració de producte a la sortida del bioreactor. Cal tenir en compte també que la utilització d'altres medis més concentrats comportarà un comportament cel·lular diferent al descrit pel medi 1x, pel que l'esquema de control utilitzat fins a aquest moment ja no tindrà validesa (fins que es caracteritzi el comportament en les noves condicions). Per tant, es passa de fixar la velocitat de perfusió d'una forma automàtica a manual, on l'usuari la fixa segons el seu criteri i a valor constant per tot el rang d'estudi. De totes formes, es segueix realitzant el monitoratge en línia de les dades de la velocitat del consum d'oxigen i de la concentració cel·lular, així com els cicles automàtics de neteja del cartutx de microfiltració i la comprovació de l'alarma de màxim nivell de líquid. A la Figura 6.34 es presenta el muntatge experimental operant en el mode de perfusió.



Figura 6.34. Detall del laboratori amb el muntatge experimental operant en el mode de perfusió.

6.4.2.2. Fase de producció.

Per mantenir la població cel·lular assolida en la fase d'acumulació cel·lular i no incrementar-la gaire més enllà s'ha decidit limitar metabòlicament el cultiu, i així evitar una altra limitació física al cultiu pel sistema d'aeració, a més de la limitació assolida amb la

velocitat de perfusió. Per a aquest propòsit primer s'ha mantingut la velocitat de perfusió a 0.15 h^{-1} durant 4 hores i, seguidament, s'ha reduït fins a 0.12 h^{-1} per limitar el cultiu per substrat amb el medi 1x a la fase de producció i augmentar així la concentració de producte. Després d'unes hores d'operació amb aquesta velocitat (9 h) s'ha pres la decisió de realitzar un canvi en la concentració del medi d'alimentació. A les 126 hores d'haver-se començat el cultiu s'ha addicionat un medi basal concentrat 2x (descriu als *Materials i Mètodes*), amb 45.3 mM de glucosa i 11.9 mM de glutamina i a una velocitat de perfusió de 0.06 h^{-1} .

A la Figura 6.30 es presenta la resposta del cultiu amb els perfils d'evolució de les diferents variables. Hi ha alguns aspectes que es volen ressaltar. En primer lloc, els aspectes relacionats amb el creixement cel·lular. Tot i que la velocitat de perfusió s'ha reduït, la densitat cel·lular s'ha anat incrementant, a una velocitat de creixement més lenta, però, assolint-se en aquest tram una densitat cel·lular màxima de 15.7×10^6 cèl·lules vives/ml a les 163 hores de cultiu. Aquest increment gradual es deu a que el medi de cultiu 1x no estava optimitzat per a la fase d'acumulació, fent així que un medi d'alimentació el doble de concentrat en nutrients i a una velocitat de perfusió 2.5 vegades inferior encara hagi donat marge per al creixement cel·lular. De totes formes, la concentració de cèl·lules totals s'ha incrementat i la viabilitat ha començat a decreixer. A més, la presència de subproductes tòxics com el lactat i l'amoni ha estat molt important al llarg del tram "Medi 2x" (al voltant de 46 mM i 3.8 mM respectivament) i s'han afegit un total de 220 ml de NaOH al bioreactor. Les condicions de l'entorn cel·lular han empitjorat respecte a la fase d'acumulació. D'altra banda, al generar-se més cèl·lules, el consum d'oxigen també s'ha incrementat havent-se de fixar tant el cabal d'aeració com la velocitat d'agitació als valors màxims establerts al principi del cultiu (350 ml/min i 120 rpm), i obtenint-se un valor màxim de OUR de $2.10 \text{ mmolO}_2/(1 \cdot \text{h})$ a les 163 hores.

L'empitjorament de les condicions del brou cultiu juntament amb unes condicions més fortes d'oxigenació provoquen l'aparició d'escumes a la part superior del bioreactor (Figura 6.35 i Figura 6.36 esquerra), les quals presenten un problema addicional en el bon funcionament del control de nivell de líquid del bioreactor. El nivell de brou al bioreactor no varia segons el nivell de líquid del cultiu, sinó que ho ha fet segons el gruix de la pel·lícula d'escuma. Aquest mal funcionament del control de nivell és a causa de que el sensor que mesura el nivell es basa en el fenomen físic de la conductivitat. Quan el sensor de nivell fa contacte amb medi o escuma estableix un pas pel corrent i el controlador de nivell s'activa. Per tant, un canvi de tipus de sensor assegurarà en operacions futures menys inconvenients que els presentats pels sensors utilitzats en aquest cultiu. El volum addicionat total de medi d'alimentació, en la seva majoria medi concentrat 2x, ha estat de 6550 ml. Cap nutrient s'ha exhaurit, com es pot observar als diferents gràfics de les figures 6.31 i 6.32. La glucosa total consumida ha estat de 111 mM, la de glutamina 38 mM i la d'oxigen 72 mM. El nivell de

glucosa en el bioreactor ha variat des de 3.0 mM a l'inici fins als 10 mM del final del tram "Medi 2x", mentre que el de glutamina ho ha fet des de 0.8 mM fins a 0.6 mM de concentració.

En segon lloc, s'ha de remarcar la productivitat volumètrica assolida en aquest tram de la fase de producció del cultiu amb un màxim de 5.1 $\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$ al final del tram. Com caldria esperar la P_{vol} s'ha incrementat respecte a la fase d'acumulació, així com també la concentració de producte en el medi exhaurit. La concentració de producte ha sofert un increment gradual fins arribar als 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ al final del tram de "Medi 2x". Aquest tram del cultiu posa de manifest la rellevància que té el disseny del medi d'alimentació per al creixement cel·lular i la producció.



Figura 6.35. Detall del bioreactor amb el problema de les escumes en la part superior.

La disminució en la viabilitat cel·lular i les condicions menys favorables de creixement amb el medi d'alimentació 2x varen determinar canvis en l'operació del cultiu (tram "Medi 1.5x"). Primer es va posar en marxa el circuit de purga cel·lular per intentar mantenir la viabilitat i no reduir encara més el seu valor, tot i que fos amb una petita pèrdua de cèl·lules viables (el cabal de purga cel·lular és igual al 10% el cabal del circuit de medi exhaurit). Simultàniament, es va substituir el medi d'alimentació 2x per un altre medi de concentració 1.5x i la velocitat de perfusió es va fixar a 0.09 h^{-1} . Els resultats obtinguts es mostren en el tram "Medi 1.5x, Purga cel·lular" de les Figures 6.30, 6.31, 6.32 i 6.33. Com es pot observar a la Figura 6.30a, la concentració de cèl·lules viables i el consum d'oxigen s'han incrementat durant algunes hores més, fins a màxims de 17×10^6 cèl·lules viables/ml i $2.3 \text{ mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$ respectivament, ja que el canvi de condicions no es reflexa immediatament al

bioreactor. Un fet remarcable és l'evolució de la OUR durant un accident, al voltant de les 183 hores de cultiu, on la bomba d'alimentació es va aturar degut a l'activació de l'alarma de màxim nivell d'escumes. L'alimentació es va restablir posteriorment (4 hores més tard). Es pot observar aquest fet en la caiguda pronunciada que té l'evolució de la OUR, i com es recupera el consum d'oxigen un cop solucionat l'imprevist. Per altra banda, tant el perfil de la OUR com l'evolució de la concentració de cèl·lules viables es mantenen estables al voltant dels valors mitjans de $1.72 \pm 0.06 \text{ mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$ i $15.1 \pm 1.3 \times 10^6$ cèl·lules viables/ml respectivament.

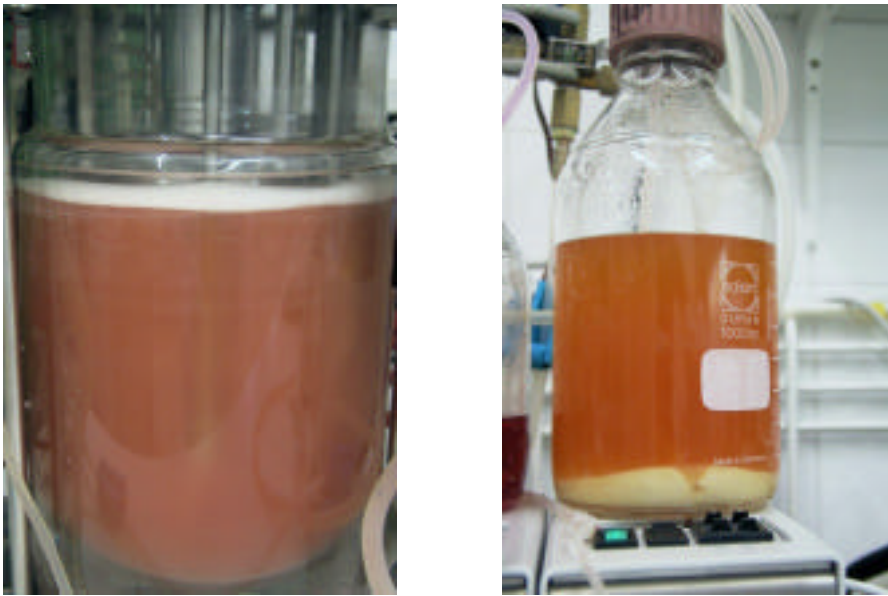


Figura 6.36. A l'esquerra detall del problema de la formació d'escumes, i a la dreta detall del recipient de recollida de la purga cel·lular.

Un altre aspecte a destacar en aquest tram de la fase de producció és com s'estabilitza la concentració de cèl·lules totals, gràcies a la purga de cèl·lules al bioreactor (Figura 6.36 dreta). El senyal turbidimètric s'ajusta bastant bé als valors mesurats de cèl·lules totals amb el recompte cel·lular fora de línia, arribant al final del tram a una concentració màxima de cèl·lules de 47.2×10^6 cèl·lules/ml. Aquest increment de la concentració de cèl·lules totals, implica un descens en el percentatge de la viabilitat del cultiu fins a valors mínims del 32%. Aquest fet es produeix ja que no hi ha nutrients perquè totes les cèl·lules es puguin duplicar. Una forma de mantenir en un estat de no divisió cel·lular les cèl·lules d'hibridoma KB-26.5 en els cultius en discontinu, però si de producció proteica, és disminuir el valor de sèrum a valors inferiors al 0.2%. Per tant, la reducció del sèrum es planteja com una possible estratègia per aturar el descens de la viabilitat cel·lular, així com una simplificació en el procés posterior de purificació de l'anticòs, ja que el medi de sortida tindrà un contingut baix en traces proteiques que dificulten la posterior obtenció del producte.

En aquest sentit es canvien les condicions del cultiu a les 262 hores d'haver-lo iniciat. Es planteja la mateixa formulació del medi concentrat d'alimentació 1.5x, però amb un contingut en sèrum al 0.2% (v/v), i es desconnecta el circuit de purga cel·lular per detectar el possible manteniment cel·lular sense producció de més cèl·lules mortes (tram "Medi 1.5x, 0.2% FCS" de la Figura 6.31a). Els resultats obtinguts no mostren el comportament desitjat. La concentració de cèl·lules viables augmenta en un 10% (s'ha de recordar que la purga era del 10% del cabal de sortida), assolint concentracions al voltant de 19×10^6 cèl·lules/ml per a les cèl·lules viables, i el nombre de cèl·lules totals també augmenta, ja que no es realitza purga, arribant a una concentració màxima de cèl·lules totals de 65×10^6 cèl·lules/ml. Els valors de OUR s'incrementen lleument amb respecte el tram anterior. L'únic fet remarcable és el de la reducció substancial en el contingut de sèrum, sense afectar irreversiblement al creixement cel·lular. Per tant, cal realitzar més recerca en aquest sentit, ja sigui amb la disminució del sèrum, o bé amb d'altres components del medi, ja que una inhibició de la divisió cel·lular a altes densitat cel·lulars implicaria tota una sèrie d'avantatges. Algunes d'elles són la millora del procés de filtració degut a la presència d'un menor nombre de cèl·lules mortes; la no proliferació dins del bioreactor de material provinent de la lisi cel·lular pot provocar menys soroll sobre el senyal turbidimètric, i per tant pot facilitar un millor control a partir d'aquesta mesura; metabòlicament el comportament cel·lular pot variar de tal forma que es poden emprar velocitats de perfusió més baixes amb el subseqüent augment de la concentració del producte en el corrent de sortida.

Per últim, s'ha de remarcar la productivitat volumètrica assolida en aquests dos trams de la fase de producció del cultiu amb un màxim de $6.6 \mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$ al final del cultiu. El valor de la P_{vol} s'ha incrementat respecte al valor de la fase d'acumulació, així com també la concentració de producte en el medi exhaurit fins arribar a un rang de concentració de 60-70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ al llarg de prop de 150 hores de cultiu. Per tant, l'objectiu d'incrementar la productivitat i la concentració final del producte amb una bona operació al bioreactor s'ha acomplert amb el medi d'alimentació 1.5x. D'altra banda, durant les 312 hores que ha durat el cultiu en perfusió s'han recollit un total de 2.3 g de producte en 45 litres de medi exhaurit, essent la $\overline{P_{\text{vol}}}$ de $3.60 \pm 2.26 \mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$ i la concentració mitjana a la sortida del bioreactor de $43.0 \pm 25.6 \mu\text{g}/\text{ml}$. Com es pot observar per les dades obtingudes, aquests valors són molt superiors als obtinguts en els altres dos modes d'operació estudiats en aquest treball.

Pel que fa al comportament metabòlic del cultiu, s'han comparat els resultats obtinguts a la fase d'acumulació cel·lular, alimentada amb "Medi 1x", i els obtinguts amb el "Medi 1.5x" a la fase de producció, tant per al tram amb purga cel·lular com per al tram de reducció de sèrum. El càlcul de les diferents velocitats específiques de substrats i subproductes així com el dels rendiments s'han efectuat d'acord al que s'ha descrit a l'apartat 6.2.4. A la Figura 6.37 es mostren els diferents gràfics dels que s'extreuen els valors de les variables anteriors.

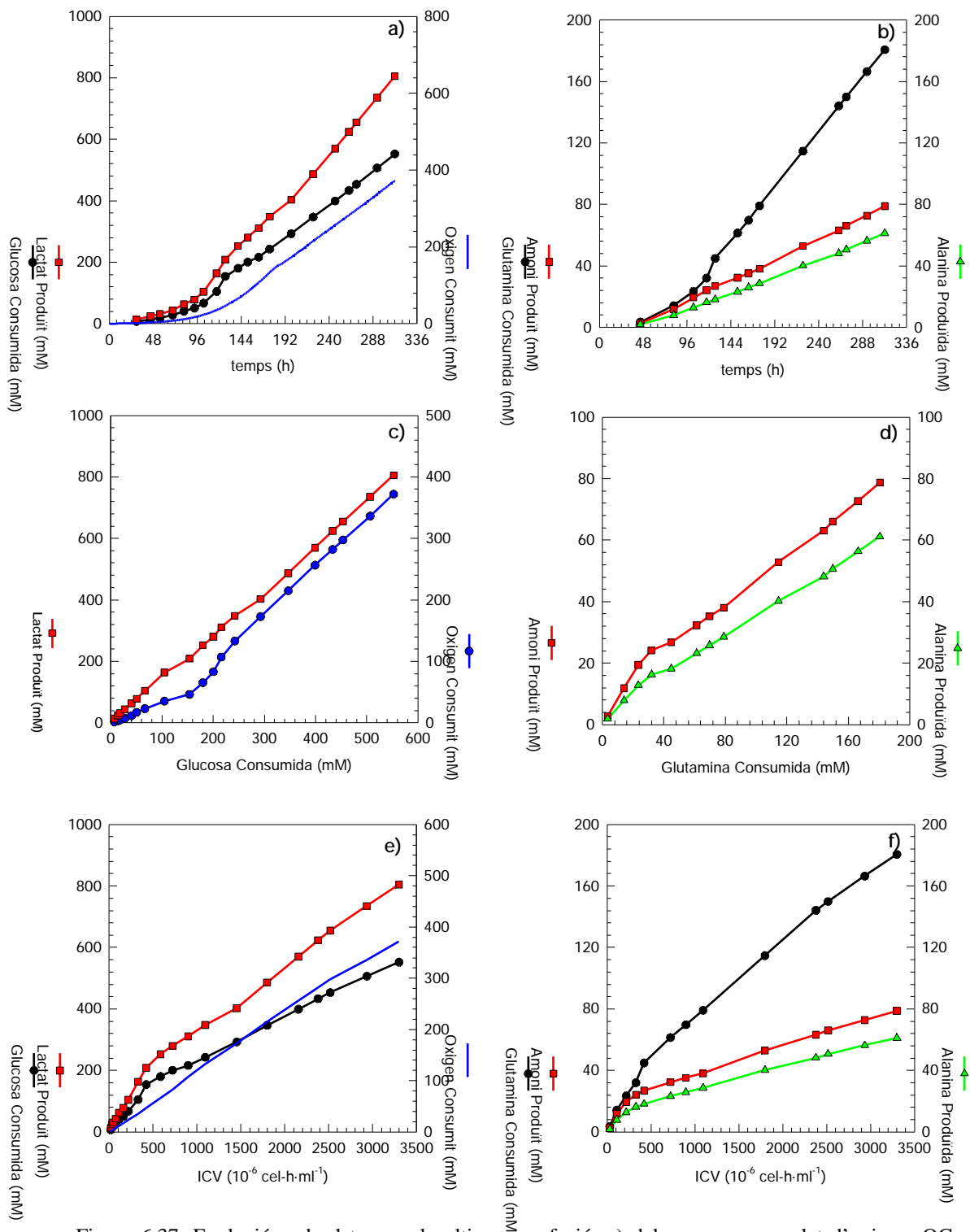


Figura 6.37. Evolució amb el temps al cultiu en perfusió: a) del consum acumulat d'oxigen, OC, el consum acumulat de glucosa, GC, i la producció acumulada de lactat, LP; b) del consum acumulat de glutamina, GlnC, la producció acumulada d'amoni, AmmP, i la producció acumulada d'alanina, AlaP. Relacions estequiomètriques c) entre el GC, la LP i el OC; d) entre el GlnC, la AmmP i la AlaP. Relacions entre la integral de cèl·lules viables, ICV: e) i el OC, el GC i la LP; i f) i el GlnC, la AmmP i la AlaP.

Per calcular les concentracions de substrats consumits acumulats amb el temps, com la glucosa (GC) i la glutamina (GlnC), i les concentracions de subproductes formats acumulats amb el temps com l'amoni (AmmP), el lactat (LP) i l'alanina (AlaP) s'han utilitzat les expressions cinètiques del continu en perfusió descrites en un treball publicat anteriorment per Seamans i Hu (1990) que s'expressen com:

$$Q_s(t')\Delta t = \frac{F_{t-t'}}{V_{perf}} (\text{Subs}_f - \overline{\text{Subs}})\Delta t - \Delta\text{Subs} \quad (\text{Eq. 6.26})$$

$$Q_p(t')\Delta t = \Delta\text{Prod} + \frac{F_{t-t'}}{V_{perf}} \overline{\text{Prod}}\Delta t \quad (\text{Eq. 6.27})$$

on $Q_s(t')$ i $Q_p(t')$ són les velocitats volumètriques del consum de substrat i de la formació de producte respectivament i tenen unitats de mmol/(l·h); $\Delta t = t - t'$, és la variació del temps entre la mostra actual (t) i l'anterior (t'), i tenen unitats d'hores; ΔSubs i ΔProd representen el canvi entre el valor actual i el valor de la mostra anterior pel substrat i el producte respectivament (mM), mentre que $\overline{\text{Subs}}$ i $\overline{\text{Prod}}$ són els valors mitjans de substrat i producte de dues mostres consecutives (mM). El paràmetre Subs_f és la concentració de substrat en el medi d'alimentació i té unitats de mM, V_{perf} és el volum de l'operació en unitats de litres, i $F_{t-t'}$ és el cabal de la bomba d'alimentació fixat entre el temps actual (t) i el pròxim temps de mostreig (t'), expressat en unitats de l/h. El consum acumulat de glucosa i glutamina, i la producció acumulada de lactat, amoni, i alanina s'obtenen després de sumar els valors de $Q_s(t')\Delta t$ i de $Q_p(t')\Delta t$ per a tots els temps en què s'han processat mostres del cultiu. Els resultats es mostren a la Figura 6.37 i els valors obtinguts a partir dels diferents gràfics, així com d'altres paràmetres de l'operació es poden observar a la Taula 6.5.

Primer de tot, s'ha d'indicar que la cinètica de creixement de la línia cel·lular al cultiu en perfusió no ha estat igual a la descrita en d'altres cultius estudiats. La causa principal ha estat que en aquesta operació s'han descongelat cèl·lules d'hibridoma KB-26.5 d'un nou criotub. A més a més, el sèrum emprat en aquesta operació pertany a un altre lot de producció. La combinació de cèl·lules provinents d'una nova ressembla amb un nou estoc de sèrum, ha provocat que la velocitat específica de creixement màxima a l'operació en perfusió hagi estat més baixa ($\mu_{\max} = 0.0286 \text{ h}^{-1}$) comparada a les obtingudes anteriorment en els altres cultius presentats en aquest treball (valor mitjà de $\mu_{\max} = 0.044 \text{ h}^{-1}$).

Una reducció de la μ_{\max} comporta un descens de les relacions substrats/subproductes (Xie i Wang, 1997), és a dir, del $Y_{\text{Lac/Glc}}$ i del $Y_{\text{Amm/Gln}}$. En aquest cas, la μ_{\max} s'ha reduït substancialment amb respecte a l'obtinguda en els cultius en discontinu, així com també ho

han fet els rendiments, s'ha passat d'uns valors en el cultiu de referència de 1.91 mmolLac/mmolGlc i 0.90 mmolAmm/mmolGln, a uns valors en la fase d'acumulació cel·lular de la perfusió de 1.53 mmolLac/mmolGlc i 0.76 mmolAmm/mmolGln. Per tant, aquesta velocitat de creixement afecta a les relacions estequiomètriques, pel que els valors de la perfusió no es poden comparar de forma directa amb els obtinguts en d'altres tipus operacions. Per aquest motiu, l'anàlisi del comportament cel·lular s'efectua en relació a les diferents condicions d'operació provades dins del mateix cultiu en perfusió.

Paràmetre	Unitats	Perfusió	
		Medi 1x	Medi 1.5x
Glc _{aliment}	mM	23.3	36.5
Gln _{aliment}	mM	4.7	8.8
Glc _{sortida}	mM	~8.0	9-12
Gln _{sortida}	mM	~1.4	0.6-0.9
X _{max}	10 ⁶ cel/ml	9.3	19.0
ICV _{total}	10 ⁶ cel-h/ml	328	2402
Mab _{Acumulat}	µg/ml	113.4	846
Durada	h	117	149
\bar{P}_{vol}	µg/(ml·h)	1.15	5.68
Y _{Lac/Glc}	mmol/mmol	1.53	1.55
Y _{O₂/Glc}	mmol/mmol	0.36	0.77
Y _{Gln/Glc}	mmol/mmol	0.31	0.33
Y _{Amm/Gln}	mmol/mmol	0.76	0.40
Y _{Ala/Gln}	mmol/mmol	0.51	0.32
q _{Glc}	nmol/(10 ⁶ cel·h)	-337	-143
q _{Gln}	nmol/(10 ⁶ cel·h)	-94	-46
q _{O₂}	nmol/(10 ⁶ cel·h)	-108	-111
q _{Lac}	nmol/(10 ⁶ cel·h)	510	212
q _{Amm}	nmol/(10 ⁶ cel·h)	71	18
V _{NaOH}	ml	0	120
V _{alimentat}	ml	9900	26180

Taula 6.5. Resum de tots els paràmetres calculats a partir de les dades del tram "Medi 1x" i del tram "Medi 1.5x" del cultiu en perfusió.

Cal remarcar una diferència molt important de comportament entre el que s'ha observat en el trams "Medi 1x" i "Medi 1.5x". En el tram "Medi 1x" no hi hagut cap limitació per substrat o entorn cel·lular desfavorable per al creixement, pel que les velocitats específiques de consum i de producció, així com els rendiments han assolit valors normals per a la línia cel·lular. En canvi en el tram del "Medi 1.5x" s'observa com la glutamina a la sortida del bioreactor està en concentracions que es poden considerar veritablement limitants per a les cèl·lules d'hibridoma KB-26.5 - en un continu efectuat amb aquesta mateixa línia cel·lular (Sanfeliu i col., 1997), la concentració mínima de glutamina a la sortida necessària per mantenir 0.5x10⁶ cèl·lules viables/ml fou 0.6 mM. Per tant, s'han d'esperar canvis en la

resta de paràmetres cel·lulars amb la limitació d'aquest aminoàcid. Mentre que les relacions glutamina/glucosa i lactat/glucosa són similars al tram anterior, la relació oxigen/glucosa augmenta a més del doble en el tram "Medi 1.5x" i les relacions de l'amoní i l'alanina amb la glutamina disminueixen substancialment a les obtingudes en el tram "Medi 1x", un 48% i un 32% respectivament. Aquesta influència de la limitació de la glutamina s'observa també en les velocitats específiques tant les de consum de substrats, q_{Glc} i q_{Gln} , com les d'obtenció de subproductes, q_{Lac} i q_{Amm} . En canvi, la q_{O_2} es pot considerar constant entre els dos trams. Aquest comportament més oxidatiu per part de la cèl·lula afavoreix la no acumulació de l'amoní i l'alanina al bioreactor, a més d'aprofitar més eficientment els recursos nutricionals i, per tant, de crear un millor entorn cel·lular per al creixement. No obstant, es necessita realitzar més treball al voltant del disseny dels medis d'alimentació per a l'operació en perfusió, per extreure així un coneixement més clar del divers comportament cel·lular provocat per l'alimentació de medis fortificats amb diferents concentracions de nutrients.

6.4.3. Comparació amb d'altres modes d'operació en bioreactor.

Amb les dades obtingudes al llarg de l'estudi es pot realitzar una comparació entre els diferents tipus d'operació estudiats, i determinar quin és el tipus d'operació que proporciona una productivitat volumètrica i una concentració de producte final en el brou més altes. A la Figura 6.38 es mostra l'evolució de la concentració de cèl·lules viables per a totes les estratègies provades durant el treball i a la Taula 6.6 es mostra un resum de les dades obtingudes pel que fa al producte.

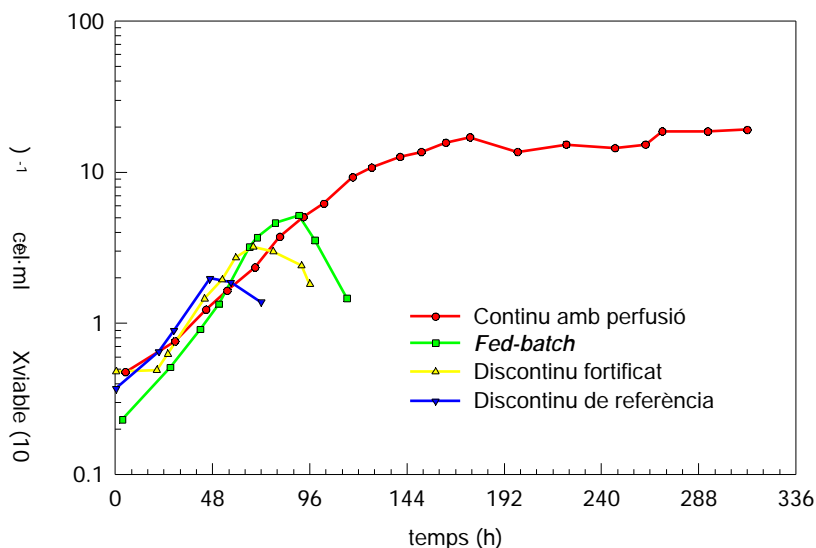


Figura 6.38. Evolució amb el temps de les concentracions de cèl·lules viables (X_{viable}) obtingudes als cultius en discontinu, de referència i fortificat, al cultiu *fed-batch* FB03 i al cultiu en continu amb perfusió per a l'hibridoma KB-26.5.

Quant a la productivitat volumètrica, l'estratègia òptima és el continu en perfusió, obtenint-se una $\overline{P_{vol}}$ a la fase de producció de l'ordre de 10 vegades superior a la P_{vol} obtinguda tant al *fed-batch* com al discontinu fortificat. Quant a la concentració final de producte al brou, si al continu amb perfusió es treballa amb medis no concentrats, per exemple medi 1x, la quantitat de producte a la sortida està molt diluïda, per això és preferible operar en mode *fed-batch* ja que és millor tenir el producte el màxim de concentrat per a la seva recuperació posterior en el procés de purificació. De totes formes, a la fase de producció de la perfusió s'ha demostrat que amb la utilització de medis fortificats la concentració de producte a la sortida del bioreactor es pot tenir a les mateixes concentracions que les assolides en el millor dels *fed-batch* presentats. A més, l'estratègia en perfusió es pot millorar encara més aprofundint en la definició de medis més òptims, tant per no diluir massa el producte com per regular la població de cèl·lules mortes mitjançant la supressió o disminució d'algun component del medi de cultiu.

Línia cel·lular	Discontinu		<i>Fed-Batch</i>		Perfusió		Referència
	[Mab] µg/ml	P_{vol} µg/(ml·h)	[Mab] µg/ml	P_{vol} µg/(ml·h)	[Mab] µg/ml	P_{vol} µg/(ml·h)	
Hibridoma KB-26.5	44	0.46	60	0.52	60-70	5.1-6.6	aquest treball
Hibridoma	120	0.63	220	1.13	400	27.5	Reuveny i col., 1986
Hibridoma NS0	145	0.88	1800	2.67	450	7.9	Bibila i Robinson, 1995
Hibridoma Sp2/0-Ag14 (*)	112	1.17	120	1.25	150	6.25	Yang i col., 2000

Taula 6.6. Dades obtingudes en cultius en discontinu, *fed-batch* i continus amb perfusió per a diferents línies cel·lulars i realitzats en bioreactors de tanc agitat. [Mab] = concentració de producte al brou de cultiu, i P_{vol} = productivitat volumètrica. (*) [Mab] en unitats de U/L i P_{vol} en unitats de U/(L·h) .

En el cultiu en perfusió també cal millorar altres aspectes, en particular de tipus operacional. Entre aquests es troba dissenyar un nou controlador per a l'oxigen dissolt, que permeti adaptar-se a les noves condicions de demanda d'oxigen a mesura que avanci el cultiu, consignant en funció de la OUR nous valors de velocitat d'agitació i cabal d'aeració sense assolir els seus límits màxims. Si s'arriben als límits, el control adaptatiu ha de ser capaç d'introduir al procés una mescla d'aire enriquit amb oxigen pur per mantenir el punt de consigna d'oxigen dissolt, i poder així mantenir més altes densitats cel·lulars al bioreactor. Un altre aspecte a estudiar és la caracterització del comportament cel·lular en el medi d'alimentació final de la fase de producció, per així poder dissenyar una estratègia de control de l'entorn cel·lular que permeti l'ajust automàtic de la velocitat de perfusió en l'operació, i

que respongui a les possibles perturbacions del comportament cel·lular. En aquest sentit, la incorporació de les mesures d'espectroscòpia d'impedància al sistema de control poden aportar informació molt valuosa tant de la viabilitat del cultiu com de la densitat cel·lular, ja que en la fase de producció aquestes són altes i les condicions de l'entorn cel·lular romanen constants, al contrari dels processos en discontinu, que assoleixen concentracions cel·lulars baixes i l'entorn cel·lular és variable al llarg del creixement (grans variacions en la conductivitat). Aquestes últimes són les raons principals per les quals no s'han utilitzat aquestes tipus de mesures durant la realització de l'estudi, però es creu que la seva aplicació als nivells i condicions assolits pels cultius en perfusió seria necessària i positiva.

Normalment, els treballs publicats a la bibliografia de comparació de cultius en *fed-batch* amb cultius en discontinu, realitzats amb altres línies cel·lulars d'hibridoma, han mostrat un increment substancial en els cultius en *fed-batch* tant en la concentració final de producte com en la productivitat volumètrica, tot mantenint la relativa simplicitat i fiabilitat de l'operació en discontinu de tanc agitat. D'altra banda, comparant des d'un punt de vista industrial alguns dels diferents aspectes entre els processos en discontinu (incloent el *fed-batch*) vers els processos en continu (incloent la perfusió) alguns autors han arribat a les següents conclusions (Werner i col., 1992; Griffiths, 1992):

- 1) La decisió entre procés discontinu o continu no està enormement influenciada pels aspectes d'inversió de capital.
- 2) El procés en continu té com a resultat un augment del volum recollit, incrementant els costos analítics i els propis del processament (esterilització, etc.) d'un volum més gran de medi, i els problemes potencials de la regulació i l'atorgament de llicències.
- 3) Les operacions en discontinu i en *fed-batch*, són més flexibles i fàcils de fer operar en les instal·lacions industrials existents.
- 4) El desenvolupament del procés en continu amb perfusió i la seva validació requereix períodes de temps substancialment més llargs.

A la Taula 6.6 es mostra un resum de les dades obtingudes en d'altres publicacions on els diferents sistemes presentats en aquest treball estan comparats entre si. Les densitats cel·lulars aconseguides en aquests cultius en perfusió (10^7 - 10^8 cèl·lules/ml) són entre un i dos ordres de magnitud més grans que les aconseguides en els cultius en *fed-batch* ($1\text{-}5 \times 10^6$ cèl·lules/ml). En general, es pot observar com les P_{vol} obtingudes a la perfusió són entre 5 i 20 vegades més grans que les aconseguides en els processos en *fed-batch*. Així, el volum de reactor requerit per a una determinada velocitat de producció es pot reduir aproximadament en la mateixa proporció. A més a més, els sistemes en perfusió allarguen el temps d'operació, minimitzen el temps de residència del producte (fet crític en el cas que el producte en qüestió sigui poc estable), s'elimina l'exposició del producte a potencials adverses condicions del

cultiu, es redueix la desaminació i s'exposa a les cèl·lules contínuament a medi d'alimentació fresc, mentre que s'eliminen els subproductes inhibitoris. Es poden obtenir beneficis econòmics més grans ja que els cultius en perfusió poden operar durant setmanes o mesos i, per tant, es redueixen les necessitats de manipulació i el temps per realitzar un cicle complet (càrrega, creixement, producció, i posteriorment neteja). De totes formes, també s'ha de dir que és un tipus d'operació més complexa, tant pel que fa al disseny com a l'operació, tenint més possibilitats d'accidents al llarg del cultiu. A més, degut al més llarg període d'operació hi ha més possibilitats de modificacions genètiques en la línia cel·lular com també de possibles contaminacions. Quant més fiable, robust i desenvolupat estigui el mode d'operació en perfusió, menys dubtes es tindrà sobre l'elecció de l'estratègia de cultiu a emprar per obtenir el màxim rendiment del procés de cultiu cel·lular.