

# Cultivos semicontinuos como una herramienta para la caracterización celular del hibridoma murino 1E10

✉ Svieta Vítores, Adolfo Castillo, Evelyn Faife, Yamilet Rabasa, Yaretnis Rodríguez, Luis E Rojas, Julio Palacios, Alvio Figueredo

Centro de Inmunología Molecular, CIM  
Calle 216 esq. 15, Atabey, Playa, PO Box 16040, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: svieta@cim.sld.cu

TÉCNICA

## RESUMEN

Los cultivos continuos constituyen una herramienta poderosa para la caracterización celular. Sin embargo, la configuración experimental necesaria en este modo de operación es más compleja, por lo que se dificulta su ejecución principalmente a pequeñas escalas. Considerando que en cultivos continuos de células de origen animal, las velocidades metabólicas y de crecimiento son menores, en esta investigación se explora el empleo de cultivos semicontinuos en frascos agitados con adiciones y extracciones puntuales diarias. Durante el estudio se crearon ambientes relativamente estables, caracterizados por pequeñas fluctuaciones en las concentraciones de las diferentes especies (glucosa, lactato, etc.), para las velocidades de dilución evaluadas, y se calcularon los parámetros cinéticos ( $m$ ,  $q_p$ ,  $q_{Glc}$ ) en cada fase estable en función de la velocidad de dilución. Los resultados fueron equivalentes a los de los cultivos continuos, por lo que el modo de operación se distinguió como una variante mucho más simple. Hasta el momento existen muy pocos reportes que describan el empleo de cultivos semicontinuos como una alternativa viable para simular el comportamiento cinético una vez alcanzados los estados estacionarios. Finalmente se confirmó el patrón de producción de anticuerpo no asociado al crecimiento, y se detectó la glutamina como el sustrato limitante en la formulación del medio usado. Los resultados se validaron mediante un análisis estadístico por una homogeneidad de varianza (ANOVA) y una distribución normal *t-Student*.

**Palabras clave:** células animales, cultivo semicontinuo, caracterización celular

*Biotechnologia Aplicada 2008;25:149-154*

## ABSTRACT

**Semicontinuous cultures as a tool for characterization of murine hybridoma 1E10 cells.** Semicontinuous cultures are a powerful tool for cell characterization. However, it is hard to be established at small scale due to the far more complex experimental configuration required. In this work, the use of semicontinuous culture in spinner flasks was explored with daily feeds and extractions, considering that metabolic and growth rates are lower in animal cells under continuous culture regimes. Relatively stabilized conditions were established, characterized by small fluctuations in the concentration of the different metabolic species (glucose, lactate, etc.) at the dilution rates evaluated, and the kinetic parameters ( $m$ ,  $q_p$ ,  $q_{Glu}$ ) were calculated as a function of the dilution rate for each phase. Results obtained were equivalent to those expected for a continuous culture, the semicontinuous operation mode being a much simpler variant. Up to now there are only scarce reports on using semicontinuous cultures as a feasible alternative to simulate the kinetic behavior at stationary states. Finally, the antibody production pattern was confirmed as growth independent, with glutamine as the limiting substrate in the medium. The results were validated by an statistical homogeneity of variance test (ANOVA) and with normally distributed data as evidenced by a Student's *t* test.

**Keywords:** animal cell, semicontinuous culture, cell characterization

## Introducción

El cultivo de células animales se ha usado extensamente como sistema de expresión de proteínas humanas complejas a escala industrial [1]. Entre estas proteínas están los anticuerpos monoclonales (AcM) utilizados con fines terapéuticos, de los cuales 19 se han registrado [2]. El Centro de Inmunología Molecular (CIM) tiene varios AcM en ensayos clínicos, y uno de ellos está registrado para cáncer de cabeza y cuello, cuya venta podría llegar a cientos de millones de dólares [3].

Es de importancia trascendental la reducción de los costos en la producción de proteínas recombinantes [4]. Para lograrlo, es vital el desarrollo de procesos y sobre todo, la caracterización celular. Los cultivos continuos son ideales para los estudios de caracterización celular. Estos permiten estabilidad en las condiciones de cultivo, lo cual garantiza que se determinen los parámetros celulares de forma confiable [5]. Sin

embargo, los estudios que evalúen un amplio espectro de velocidades de dilución son extremadamente caros. Además, se ha reportado que a bajas velocidades de dilución, la dispersión en los resultados son del mismo orden que los propios resultados, por lo cual se cuestiona la utilidad del método en estas condiciones [6, 7].

Los cultivos por lote se emplean también en estudios de caracterización, por lo atractiva que resulta la simplicidad de su configuración [8, 9]. Su desventaja es que los datos generados solo son reproducibles y confiables en la fase exponencial, en la que los nutrientes están por encima de las concentraciones limitantes y las sustancias inhibitorias son pequeñas. En cultivos por lote o continuos, en los cuales la concentración celular no supera generalmente los  $3 \times 10^6$  cel/mL, la carga metabólica es baja. En virtud de ello, en este tra-

1. Merten O. Introduction to animal cell culture technology-past, present and future. *Cytotechnology* 2006; 50:1-7.

2. Schaffner G, Toivonen M. Clinical Development of therapeutic antibodies beyond the routine. *Bioworld Europe* 2007; 1:2-5.

3. Lage A. Informe anual del CIM; 2006.

4. Chye L, John W, Nigel J, Titchener H, Suzanne S, Farid A. Computer-Aided Approach to Compare the Production Economics of Fed-Batch and Perfusion Culture Under Uncertainty. *Biotechnol Bioeng* 2006; 93:687-97.

5. Wei S, Gambhier A, Korke R, Lee J, Cheng P, Europa A. Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states. *J Biosci Bioeng* 2003; 95:317-27.

bajo se estudió el uso de cultivos por lote, repetidos con frecuencia diaria y velocidad de dilución constante (semicontinuos), como una opción interesante para la caracterización celular. El suministro de medio de cultivo fresco y la extracción de cultivo de manera intermitente, en cantidades e intervalos constantes, se aproximaría al cultivo continuo si esas cantidades e intervalos estuviesen cercanos a cero, o si pudieran garantizar que las variaciones en las concentraciones de las diferentes sustancias presentes no sufrieran cambios importantes.

## Materiales y métodos

### Línea celular

La línea celular empleada es el hibridoma murino 1E10 [10] obtenido en el CIM. Esta línea celular secreta un AcM antidiotipo del tipo IgG<sub>1</sub>, que reconoce específicamente al AcM P3, que a su vez reconoce al gangliósido NGcGM3.

### Medio de cultivo y suplementos

Medio control: medio de cultivo libre de proteínas PFHM-II (Gibco, EE.UU.) suplementado a 2 mM de L-glutamina (Sigma, EE.UU.), 13 mM de glucosa (Sigma, EE.UU.), 0.1% de Pluronic F68 (Gibco, EE.UU.) y 0.35 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma, EE.UU.).

Medio 1: medio control suplementado a 6 mM de L-glutamina (Sigma, EE.UU.).

Medio 2: medio 1 suplementado adicionalmente con un concentrado de aminoácidos (asparagina, metionina, prolina, leucina, cisteína).

Medio 3: medio 2 suplementado a 28 mM de glucosa (Sigma, EE.UU.).

Todos los medios se esterilizaron por filtración, con filtros Sartobran P (Sartorius) con una talla de poro de 0.22 µm.

### Metodología experimental

#### Cultivos por lote

En todos los casos la concentración inicial del inóculo fue de  $0.3 \times 10^6$  cel/mL. Se utilizaron frascos agitados (Integra Biosciencias) de 100 mL, que se mantuvieron en una incubadora con CO<sub>2</sub> (Revco). Las condiciones operacionales fueron: temperatura 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y velocidad de agitación de 100 rpm.

#### Cultivos semicontinuos

Se crearon iguales condiciones operacionales que para los cultivos en lote. Los cultivos se iniciaron por lote hasta que alcanzaron una concentración celular de  $1 \times 10^6$  cel/mL. En ese momento se empezaron a hacer diluciones puntuales con una frecuencia diaria. El volumen intercambiado ( $V_i$ : volúmenes extraídos y re-puestos) se calculó sobre la base de la dilución deseada de acuerdo a:

$$V_i = D \cdot V_{\text{Spinner}} \cdot \Delta t \quad (1)$$

donde:

$D$ : velocidad de dilución ( $\text{h}^{-1}$ ).

$V_{\text{Spinner}}$  (mL).

$\Delta t$ : intervalo entre adiciones.

El régimen de intercambio de fluido se mantuvo de 3 a 4 tiempos de residencia, y se calculó por la ecuación siguiente:

$$\tau = \frac{1}{D} \quad (2)$$

Pasado este tiempo y estabilizadas las variables, el cultivo se mantuvo por 5 días para hacer de 3 a 4 mediciones experimentales.

Se utilizaron cuatro velocidades de dilución: 0.12, 0.24, 0.42, 0.59  $\text{d}^{-1}$ .

### Determinaciones analíticas

La determinación de las concentraciones de glucosa y lactato se ejecutó mediante un analizador clínico DT 60 (Johnson & Johnson, Rochester, Nueva York, EE.UU.).

Se determinó la IgG<sub>1</sub> por el método inmunoenzimático ELISA y una placa Maxisorp (Nunc., EE.UU.) recubierta con un anticuerpo contra IgG murino. Luego se aplicaron las muestras y se añadió un anticuerpo anti-IgG murino conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma, EE.UU.). Posteriormente se reveló con el sustrato de la enzima para-nitrofenil-fosfato. La determinación se logró mediante la lectura de la intensidad luminosa en un lector de ELISA (Organo-técnica, Alemania).

Para determinar la concentración y la viabilidad celular de las muestras, se empleó el método de exclusión con el colorante tripán azul en cámara de Neubauer (PolyLabo™).

### Cálculos

#### Parámetros cinéticos

El cálculo de las velocidades específicas de producción y consumo para cualquier especie genérica en la zona de crecimiento exponencial en el cultivo por lote, se realizó mediante el método integral. Para ello se calculó la  $v_i$ , por medio del mejor ajuste lineal de la ecuación 3, en la cual  $v_i$  es la pendiente.

$$I = v_i \int X_v dt \quad (3)$$

donde:

$I$ : concentración de una especie genérica (células, productos o nutrientes).

$v_i$ : velocidad de consumo o producción específica de esa especie genérica.

$X_v$ : concentración de células viables.

$t$ : tiempo.

Para el cultivo semicontinuo se empleó el método diferencial aplicado a cada intervalo entre adiciones mediante la siguiente ecuación:

$$v_i = \frac{1}{X_v} \frac{dI}{dt} \quad (4)$$

### Rendimientos

Para el cálculo de los rendimientos biomasa-glucosa en el cultivo por lote se siguió la siguiente ecuación para la etapa exponencial:

$$Y_{x/glc} = \frac{\Delta X}{\Delta Glc} \quad (5)$$

6. Portner R, Schafer T. Modelling hybridoma cell growth and metabolism a comparison of selected models and data. *J Biotechnol* 1996; 49:119-35.

7. Birch JR, Racher AJ. Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58: 671-85.

8. Al-Rubeai M. Specific Monoclonal Antibody Productivity and the cell cycle. Comparisons of batch, continuous and perfusion cultures. *Cytotechnology* 1992; 9(1-3):85-97.

9. Francois L, Bertrand T, Sebastien C, JeanMarc G, Pierre C, Jean L, Annie M. Related effects of cell adaptation to serum-free conditions on murine EPO production and glycosylation by CHO cells. *Cytotechnology*. 2006;52:39-53.

10. Vázquez AM, Pérez A, Hernández AM, Macías A, Alfonso M, Bombino G, Pérez R. Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody. *Hybridoma* 1995;17:527-34.

Teniendo en cuenta que el cultivo semicontinuo se comporta como un cultivo por lote durante el tiempo que transcurre de una adición y extracción a la siguiente, se siguió la misma metodología y se promediaron los valores calculados para la etapa en que las condiciones fueron estables.

### Análisis estadístico

Los valores promediados para calcular los parámetros cinéticos se sometieron a las pruebas estadísticas siguientes, según el programa MINITAB: Aleatoriedad, Normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov), homogeneidad de varianza (ANOVA) y una distribución normal test t de Student.

El nivel de aceptación para todos los análisis estadísticos fue de 95%.

## Resultados

### Desempeño del cultivo semicontinuo

En la figura 1 aparece el perfil de concentración de células viables y de concentración del anticuerpo secretado de 3 réplicas correspondientes a dos de las diluciones estudiadas cuando las condiciones de cultivos fueron relativamente estables.

Todos los valores que aparecen corresponden a las muestras tomadas antes de hacer los recambios de medio, según la dilución empleada en cada caso. Los valores de concentración de anticuerpo (IgG) y de Xv representados muestran una relativa constancia. Este perfil se asemeja al esperable en un cultivo continuo puro. Las desviaciones interexperimento son pequeñas, como se aprecia en los errores representados. El evento del recambio provocó las mayores variaciones instantáneas de las concentraciones. Por ejemplo, los intervalos de concentraciones de glucosa residual alcanzado para las diferentes diluciones evaluadas antes y después de la adición de medio, se mantuvieron entre 3.5 y 1.3 mmol/L. Estos valores pueden considerarse pequeños teniendo en cuenta que la glucosa en el medio parte de un valor aproximado de 13 mmol/L. Como la glucosa es el nutriente que se consume más y con mayor velocidad [11], las variaciones son menores para el resto de los nutrientes. Es importante destacar que estas variaciones en las concentraciones son pequeñas pese a que los intervalos entre los recambios de medio son relativamente largos (24 h). Ello confirma la teoría inicial de este trabajo de que se podía mantener un ambiente relativa-

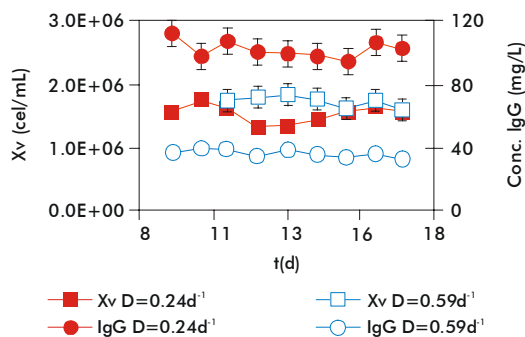


Figura 1. Perfiles de concentración de células viables y de anticuerpo en el tiempo, para dos de las diluciones evaluadas en cultivos semicontinuos.

mente constante por medio de los cultivos semicontinuos con recambios de medios diarios debido a la baja carga metabólica que existe en los cultivos de células animales.

En la figura 2 se muestran las medias de las velocidades específicas de crecimiento calculadas luego de estabilizarse las condiciones de cultivo. Además, se incluye la desviación estándar, y el tamaño de las muestras fue de al menos cinco puntos.

La desviación calculada es relativamente pequeña con respecto al valor absoluto de la media. Ello demuestra la reproducibilidad del comportamiento celular en estas condiciones, la constancia y adecuación para la caracterización. A bajas velocidades de dilución (0.005 y 0.01 h<sup>-1</sup>), el valor de la velocidad de crecimiento es muy cercano en magnitud a la velocidad de dilución, lo cual es propio de un cultivo continuo. Sin embargo, para velocidades de dilución más altas, los valores de la velocidad de crecimiento se alejan de esa tendencia y son apreciablemente mayores que los de la dilución.

### Caracterización celular

#### Patrón de producción

La figura 3 muestra tres réplicas de un cultivo por lote de los perfiles de IgG y Xv contra la integral de células viables. Esta figura es útil para calcular las velocidades específicas de producción y crecimiento mediante el método integral. Además, se incluyen los mejores ajustes de tendencia lineal, y muestra los parámetros ajustados a diferentes tramos y los coeficientes de regresión asociados.

De acuerdo con los coeficientes de regresión, algunos conjuntos de datos experimentales pueden ser ajustados linealmente, lo cual indica la constancia de las variables cinéticas en ese intervalo. Se constata que en la fase de adaptación, las células producen la proteína de interés con una velocidad específica ( $q_p$ ) de  $3 \times 10^{-7}$  mg/cel\*h. Al entrar a la fase de crecimiento exponencial, la velocidad específica de producción parece reducirse al disminuir hasta  $2 \times 10^{-7}$  mg/cel\*h.

La figura 4 muestra la relación entre la velocidad específica de producción ( $q_p$ ) y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en los cultivos semicontinuos. Además se incluye la etapa exponencial del cultivo por lote que corresponde a  $\mu = 0.054\text{h}^{-1}$ .

Los valores de  $q_p$  están en el orden de los que se reportan en la literatura [6] y tanto los del cultivo por lote como los valores de los semicontinuos, se encuentran en el mismo orden de magnitud. El valor de la

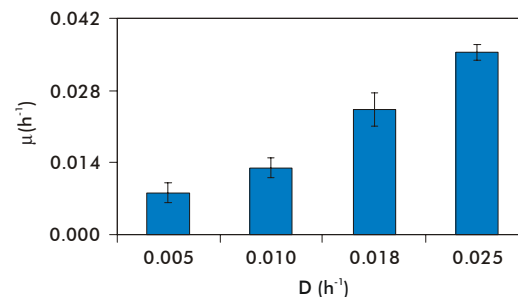


Figura 2. Velocidad de crecimiento frente a velocidad de dilución impuesta.

11. Cruz HJ, Moreira JL, Larrondo MJ. Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. *Biotech Bioeng* 1999; 66:104-13.

velocidad específica de producción tiene un máximo para la velocidad de crecimiento de  $0.012 \text{ h}^{-1}$ . Teniendo en cuenta los valores de velocidad específica de crecimiento, se observa una correlación inversamente proporcional entre  $q_p$  y  $\mu$ . En la literatura existen múltiples reportes que identifican este tipo de patrón como el más común entre crecimiento celular y producción de anticuerpo para células de hibridomas [6, 12, 13]. Según estos estudios, es más probable que la secreción de anticuerpo por parte de una población celular dependa en mayor medida de cuán retenido se encuentre el cultivo en una fase del ciclo celular. A bajas velocidades de dilución puede existir limitación de algún nutriente; por consiguiente, el ambiente es menos favorable para que las células se dupliquen con su velocidad de crecimiento habitual y un número importante de la población puede quedar retenido en alguna fase del ciclo celular con mayor productividad para la formación del producto. En diversas líneas celulares se ha comprobado que los genes responsables de la producción de anticuerpo se transcriben a mayor velocidad cuando las células están en fase  $G_0/G_1$  [14, 15]. En cambio, se evidenció un aumento de la producción en proteínas recombinantes expresadas en células CHO durante la fase S del ciclo celular, que indica que pueden existir otras fases del ciclo involucradas en el aumento de la productividad [16].

La figura 5 muestra los valores de las velocidades específicas de consumo de glucosa ( $q_{\text{Gluc}}$ ) y los rendimientos biomasa/glucosa ( $Y_{Xv/\text{Gluc}}$ ) para cada velocidad de crecimiento de los cultivos semicontinuos. Además se exponen los resultados en la fase exponencial del cultivo por lote ( $\mu = 0.054 \text{ h}^{-1}$ ).

Los valores de  $q_{\text{Gluc}}$  en los cultivos semicontinuos son comparables a los del cultivo por lote en cuanto a magnitud. Estos valores están también en consonancia con lo que se ha reportado sobre  $q_{\text{Gluc}}$  en células animales [17- 21]. Este consumo de glucosa fue superior en el cultivo por lote, ya que durante su fase exponencial las células crecen a una velocidad máxima y consumen los nutrientes esenciales a su máxima capacidad. Por el contrario, en los cultivos semicontinuos se controlan la velocidad de crecimiento, el metabolismo celular y el consumo de metabolitos críticos. Ello se confirma con que la menor  $q_{\text{Gluc}}$  se obtuvo para la  $\mu = 0.012 \text{ h}^{-1}$ .

Al analizar el comportamiento de los rendimientos biomasa-glucosa ( $Y_{Xv/\text{Gluc}}$ ), se evidenció un valor de rendimiento bajo para una  $\mu$  baja, que indica la existencia de un consumo de glucosa pequeño bajo estas condiciones, y revela un metabolismo menos eficiente para esta dilución. Para el resto de las diluciones (entre 0.018 y 0.038) los  $Y_{Xv/\text{Gluc}}$  se comportaron insensibles a los valores, y coinciden con la literatura en cuanto a orden de magnitud en un intervalo entre  $1 \times 10^8$  y  $3 \times 10^8$  (cel/mL). Por lo general, las referencias en la literatura son muy contradictorias, y muchas veces dependen de la velocidad de crecimiento de la línea celular y de la propia concentración de glucosa que tiene el medio de cultivo.

### Uso de cultivos semicontinuos para la búsqueda de limitaciones nutricionales

Cuando existe un sustrato limitante en un cultivo, por lo general la dependencia de la velocidad de crecimiento respecto a la concentración de sustrato puede describirse por la curva de Monod. La figura 6 muestra la

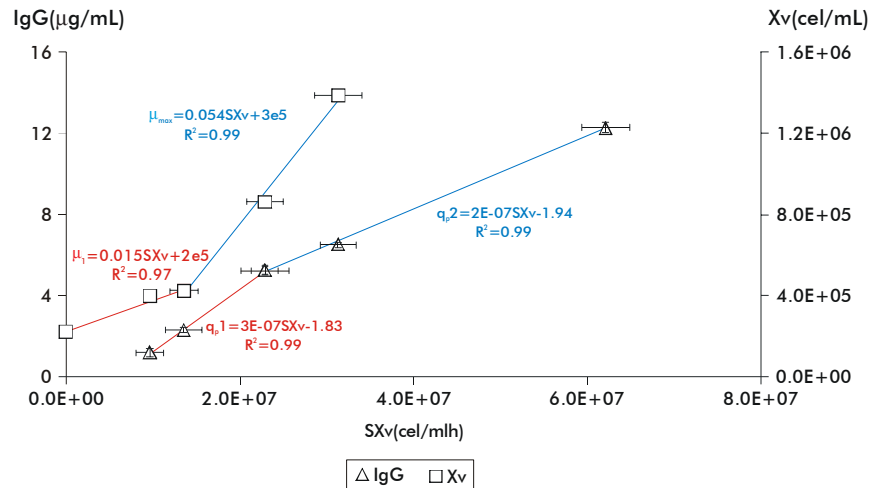


Figura 3. Perfiles de concentración de células viables ( $X_v$ ) y de producto (IgG) frente a integral de células viables del cultivo por lote.

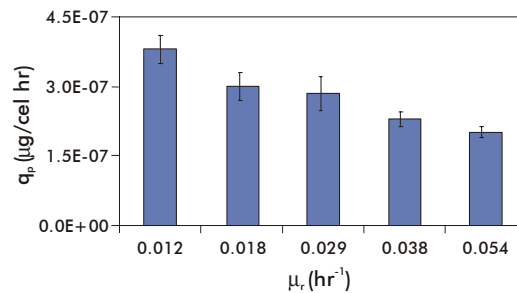


Figura 4. Relación de  $\mu_r$  con D en cultivos semicontinuos y fase exponencial del cultivo por lote.

dependencia de  $\mu$  contra la glucosa residual en cada velocidad de dilución.

Un modelo de saturación del tipo Monod no puede describir los puntos experimentales, tal como se evidenció en los datos. Ello pudiera interpretarse como que la glucosa no es el nutriente que limita el crecimiento en las condiciones testadas.

La figura 7 muestra las  $q_p$  y las  $\mu$  en cultivos semicontinuos con medios fortificados. El uso de los medios fortificados con determinados nutrientes generó un aumento de la velocidad de crecimiento con respecto a

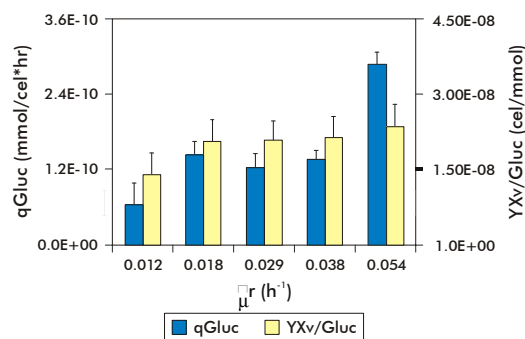


Figura 5. Velocidades específicas de consumo de glucosa ( $q_{\text{Gluc}}$ ) y rendimientos  $Y_{Xv/\text{Gluc}}$  en cultivo semicontinuo y fase exponencial del cultivo por lote ( $\mu = 0.054 \text{ hr}^{-1}$ ).

12. Al-Fageeh M, Marchant R, Carden M, Smales C. The cold-shock response in cultured mammalian cells: harnessing the response for the improvement of recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng* 2006;93:829-35.

13. Hu WS. Fluctuations in continuous mammalian cell bioreactor with retention. *Biotechnol Prog* 2006;8:397-403.

la presenciada para el medio control. La característica común entre todos los medios del 1 al 3, es que la concentración de glutamina aumentó 3 veces más con respecto al control. Cuando la disminución de algún nutriente lleve a una disminución del crecimiento, se dice que ese sustrato limita el cultivo cinéticamente. Para probar si existen o no diferencias significativas entre la  $m$  para el medio control y la  $m$  para el medio 1, se buscaron posibles indicadores de limitaciones nutricionales, y se analizaron los datos estadísticamente.

Primero se chequeó si la glutamina estaba limitando cinéticamente el cultivo o no. La prueba de hipótesis con respecto a los valores de  $m$  fue la siguiente:

$$H_0: \mu_{\text{Control}} = \mu_{\text{Medio1}}$$

$$H_1: \mu_{\text{Control}} \neq \mu_{\text{Medio1}}$$

Donde  $H_0$  y  $H_1$  son la hipótesis nula y la alternativa, respectivamente.

Del *test* de hipótesis se pudo determinar que la hipótesis nula es rechazada con un nivel de confianza de 95%, lo que demuestra las diferencias estadísticamente significativas entre los valores de  $m$  evaluados. La adición de L-glutamina provocó un aumento de la velocidad de crecimiento, y esto lleva a pensar que es posible que la glutamina sea la que esté limitando cinéticamente el cultivo en estas condiciones.

Se compararon las muestras correspondientes a los medios 1, 2 y 3 (entre sí), para explorar, además de la glutamina, si la glucosa o el suplemento de otros aminoácidos estaban limitando el cultivo también. La herramienta estadística en este caso fue el análisis de varianza. La hipótesis nula probada fue la de la igualdad de todas las medias.

De la aplicación de este análisis se constató que la hipótesis nula es aceptada, o sea que no hay diferencias significativas entre las  $\mu$ , y 95% de confianza. Por tanto, el incremento de concentración de glucosa o de otros aminoácidos que no sean la L-glutamina, no provocan un incremento de la  $\mu$ . Teniendo en cuenta que los nutrientes antes relacionados se consumieron más, la L-glutamina es el sustrato limitante en la formulación empleada como medio control para esta línea celular.

De la figura 7 también puede derivarse que la  $q_p$  disminuyó con el suplemento de glutamina y los aminoácidos.

En este trabajo se demostró anteriormente que la  $m$  de este híbrido había mostrado un comportamiento inversamente asociado a la  $q_p$ . Sin embargo observamos que en las condiciones 1, 2 y 3, en las que tuvo valores similares,  $q_p$  no siguió esta tendencia.

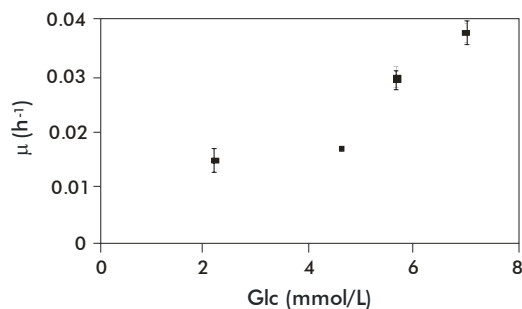


Figura 6. Velocidad específica de crecimiento frente a glucosa residual correspondiente a cada velocidad de dilución evaluada.

## Discusión

En los cultivos continuos la  $\mu_{\text{aparente}}$  es igual a  $D$ , tendencia esta que se observó en los cultivos semi-continuos, principalmente para bajas velocidades de dilución (Figura 2). Al ser las diluciones más pequeñas, las variaciones en las concentraciones fueron menores y se creó un ambiente relativamente constante. La constancia en las condiciones de cultivo hacen que el cultivo semi-continuo se acerque a la condición de continuo en la que  $dI/dt = 0$ . Por el contrario, para altas  $D$ , los valores de  $\mu$  se alejaron de esta tendencia y las variaciones asociadas al recambio de medio fueron mayores.

Los cultivos continuos no tienen un comportamiento fiable a bajas  $D$ . Teniendo en cuenta esto, los resultados parecen indicar que el uso de cultivos semicontinuos puede ser equivalente a los cultivos continuos para la caracterización de una línea celular principalmente a bajas velocidades de dilución.

En la figura 3 (cultivos por lote) se aprecia una tendencia a que cuando las células crecen en su máxima velocidad, la producción de proteína de interés es menor. Similar situación se evidencia en la figura 4, donde se observa una tendencia al aumento de  $q_p$  al disminuir  $\mu$ .

La posible existencia de un valor de  $m$  que maximiza la  $q_p$  puede tener implicaciones en el desarrollo de proceso. Por ello, la estrategia de alimentación de nutrientes en modo de cultivo en lote alimentado o en cultivo continuo con retención de biomasa, debería ser diseñada para mantener la  $m$  en ese valor máximo durante la etapa de producción.

El modelo de energía de mantenimiento [22] se ha usado para intentar explicar la dependencia de  $q_{\text{Gluc}}$  en función de  $\mu$ .

$$q_s = \frac{1}{Y_{x/s}} \mu + m \quad (6)$$

Puede observarse que para la velocidad de dilución de  $0.005 \text{ h}^{-1}$  la  $q_{\text{Gluc}}$  toma un valor de  $6 \times 10^{-11} \text{ mmol/cel h}$ . La disminución a un valor tan bajo puede considerarse como que a medida que disminuye  $D$ , las células solo consumen glucosa para mantenerse.

En un artículo de revisión sobre modelación en cultivos continuos, se reconoce sin embargo que los datos de  $q_{\text{Gluc}}$  en función de  $m$  reportados por mucho investigadores no pueden ser descritos usando el modelo lineal propuesto por Pirt para todo el rango de valores [6]. Ello hace dudar de la validez de la ecuación 6 para el cultivo de células animales.

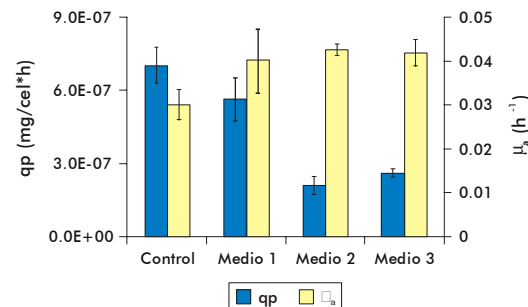


Figura 7. Velocidades específicas de crecimiento y producción en cultivos con diferentes formulaciones de medio a la velocidad de dilución  $D = 0.65 \text{ hr}^{-1}$ .

14. Bibila T, Flickinger MC. A structured model for monoclonal antibody synthesis in exponentially growing and stationary phase hybridoma cells. *Biotechnol Bioeng* 1989;37:210-26.

15. Carvalhal A, Santos S, Calado J, Haury M, Carrondo M. Cell growth arrest by nucleotides, nucleosides and bases as a tool for improved production of recombinant proteins. *Biotechnol Prog* 2003; 19:69-83.

16. Roshni L, Dutton A, Jenó S, Murray M. Cell cycle phase dependent productivity of a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology* 2006;52:55-69.

17. Miller WM, Wilke CR, Blanch HW. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture. Effect of nutrient concentration, dilution rate and pH. *Biotechnol Bioeng* 1988;32:947-65.

18. Bree MA, Dhurjati P, Geoghegan RF, Robnett B. Kinetic modelling of hybridoma cell growth and immunoglobulin production in a large-scale suspension culture. *Biotechnol Bioeng* 1988; 32:1067-72.

19. Hiller GW, Aeschlimann AD, Clark DS, Blanch HW. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum-free medium. *Biotechnol Bioeng* 1991; 38: 733-41.

20. Frame KK, Hu WS. Kinetic study of hybridoma cell growth in continuous culture: II. Behavior of producer and comparison to nonproducers. *Biotechnol Bioeng* 1991;38:1020-8.

21. Harigae M, Matsumura M, Kataoka H. Kinetic study on HBs-Mab production in continuous cultivation. *J Biotechnol* 1994; 34:227-35.

22. Pirt SJ. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell, Oxford; 1985.

El enfoque experimental usado a partir de la fortificación al medio de cultivo permitió identificar el sustrato limitante que en este caso fue la L-glutamina. Sería interesante utilizar en trabajos futuros un enfoque similar para intentar determinar posibles limitaciones simultáneas o inhibición en el crecimiento celular y/o producción de anticuerpo.

La novedad científica de esta investigación consistió en establecer una nueva metodología para el cultivo

de células animales con un bajo costo experimental, capaz de generar resultados a pequeña escala que permitieron caracterizar la línea celular 1E10. Además, predecir su comportamiento en cultivos en biorreactores que permitan trazar estrategias de desarrollo de procesos.

En la actualidad nuestro grupo realiza estudios en cultivos continuos reales, con el objetivo de validar los resultados alcanzados hasta el momento.

---

*Recibido en noviembre de 2007. Aprobado en junio de 2008.*