

03072 12
2 eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



Unidad Académica de los Ciclos
Profesional y de Posgrado del C.C.H.

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ESTRATEGIAS PARA OPTIMIZAR LA
PRODUCCION DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES POR CULTIVO DE
HIBRIDOMAS EN SUSPENSION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

I.Q. ANA EDITH HIGAREDA MENDOZA

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE 1994

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MARCO

DEDICATORIAS

A mi esposo:

Marco Aurelio

Por su amor e incondicional apoyo.

A mi hija:

Anafs

Por todo el amor y las enseñanzas que nos dejó en su corta estancia.

A mis Padres:

Mariana y José Luis

Por su amor, confianza, dedicación y ayuda. Por inculcarnos y enseñarnos el bien, la lucha y la superación. Por motivarnos a seguir estudiando y por enseñarnos a amar.

A mis hermanos:

José Luis, Ignacio, Judith y David

Por todo lo que hemos compartido y seguiremos compartiendo.

A mis abuelos, tíos y primos:

Por su cariño y apoyo.

A mis suegros, cuñados y agregados:

Por su amistad.

A mis amigos y amigas:

Por su amistad.

A Cary y Shara:

Por su fiel e incondicional cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez

Mi más sincero agradecimiento por el gran apoyo que me ha brindado a lo largo de estos años. Por sus enseñanzas y su preocupación en mi formación profesional, por su amistad y su integridad, gracias.

Al los Dres. Jean L. Charli y Enrique Galindo F.

Mi agradecimiento por su interés y participación en este trabajo, especialmente durante los comites tutoriales.

Al Dr. Lourival D. Possani

Gracias por su apoyo e interés en este trabajo, así como por su amistad.

A mis sinodales

Los Dres. Yolanda López Vidal, Lourival D. Possani, Jean L. Charli, Enrique Galindo F. y Octavio Tonatiuh Ramírez.

Gracias por su apoyo, interés y participación en este trabajo.

A mis profesores

Gracias por sus enseñanzas durante mi formación profesional.

A Arturo Aguilar-Aguila

Por su amistad y su enorme apoyo, especialmente en el área de computación.

A Maribel Flores Martínez

Mi más sincero agradecimiento por su gran apoyo técnico.

Al apoyo técnico y administrativo

Mi agradecimiento a Timoteo Olamendi Portugal, Jesus Martínez Dorantes y Ma. Elena Zamora Varona.

A mis compañeros y amigos

Un profundo agradecimiento por el gran apoyo que siempre me han brindado y por su amistad.

A la Universidad

Por lo que representa y por lo que me ha brindado.

A Dios

Por darme vida para realizar este trabajo.

El presente trabajo fué realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatihu Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN300991, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto 1105-N9201 y de la Beca Crédito 81244, así como la beca de alimentación y hospedaje otorgada por el Instituto de Biotecnología, a quienes agradezco sinceramente.

INDICE GENERAL

	INDICE DE FIGURAS	v
	INDICE DE TABLAS	vii
	ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA	viii
		página
	RESUMEN	1
CAPITULO I.	INTRODUCCION	3
1.1	DEFINICION E HISTORIA DE LOS HIBRIDOMAS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES	3
1.2	APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	4
1.3	EL CULTIVO DE HIBRIDOMAS	5
1.4	MODELO DE TRABAJO	7
CAPITULO II.	ANTECEDENTES	9
2.1	CULTIVO DE HIBRIDOMAS <i>in vivo</i>	9
2.2	CULTIVO DE HIBRIDOMAS <i>in vitro</i>	9
2.3	METABOLISMO DE HIBRIDOMAS	10
2.3.1	Metabolismo de glucosa	12
2.3.2	Metabolismo de glutamina	15
2.3.3	Metabolismo de aminoácidos	16
2.4	EFFECTO DE DESECHOS METABOLICOS: LACTATO Y AMONIO	18

2.5	POTENCIAL REDOX DE CULTIVOS	19
2.6	ESTRATEGIAS DE OPTIMIZACION	21
CAPITULO III.	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GENERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
CAPITULO IV.	MATERIALES Y METODOS	27
4.1	LINEA CELULAR	27
4.2	MEDIO DE CULTIVO	27
4.3	CONGELACION DE CELULAS	28
4.4	INOCULO	28
4.5	SISTEMA DE CONTROL Y ADQUISICION DE DATOS	28
4.6	CULTIVOS ESTATICOS POR LOTE	29
4.7	CULTIVOS EN BIOREACTOR	30
4.7.1	Cultivos con exceso de glutamina y glucosa, bajo limitación de glutamina, y bajo limitación de glucosa	30
4.7.2	Cultivo suplementado selectivamente con glutamina	30
4.7.3	Cultivo suplementado selectivamente con glucosa	31
4.7.4	Otros cultivos	31
4.8	METODOS ANALITICOS	32
4.8.1	Determinación de la concentración celular	32
4.8.2	Determinación de glucosa y lactato	32
4.8.3	Determinación de amonio, glutamina y otros aminoácidos	33
4.8.4	Determinación de anticuerpo monoclonal	35
4.9	CONSIDERACIONES MATEMATICAS	36
4.9.1	Determinación de la velocidad específica de crecimiento, rendimientos, coeficientes metabólicos y productividades en cultivos estáticos y agitados por lotes o suplementados.	36

4.9.2	Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno en cultivos agitados	37
4.9.3	Corrección y cálculo del potencial redox en cultivos agitados	39
CAPITULO V.	RESULTADOS Y DISCUSION	40
5.1	CARACTERIZACION DE LA LINEA BCF2	40
5.1.1	<i>Cultivos estáticos por lote</i>	40
5.1.1.1	Cultivo con exceso de glutamina y glucosa	40
5.1.1.2	Cultivo limitado de glutamina	42
5.1.1.3	Cultivo limitado de glucosa	46
5.1.2	<i>Cultivos agitados por lote</i>	48
5.1.2.1	Cultivo con exceso de glutamina y glucosa	48
5.1.2.2	Cultivo limitado de glutamina	50
5.1.2.3	Cultivo limitado de glucosa	59
5.1.3	<i>Cultivos agitados y suplementados</i>	65
5.1.3.1	Cultivo suplementado selectivamente con glutamina	65
5.1.3.2	Cultivo suplementado selectivamente con glucosa	72
5.2	DISTINCION ENTRE EVENTOS METABOLICOS Y EVENTOS OPERACIONALES	81
CAPITULO VI.	CONCLUSIONES	94
	BIBLIOGRAFIA	96
	APENDICES	101
A	FORMULACIONES	102
A1	Composición del medio de cultivo DMEM	102
A2	Composición de la solución de aminoácidos no esenciales	102
B	SISTEMA DE CONTROL Y ADQUISICION DE DATOS	103
B1	Diagrama de componentes del sistema de control y adquisición de datos	103

C	ANALISIS DE AMINOACIDOS Y AMONIO	104
C1	Ejemplo de cromatograma de estándares de aminoácidos y amonio	104
C2	Curvas patrón de estándares de aminoácidos y amonio	105
D	ANALISIS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	106
D1	Curva patrón de anticuerpos monoclonales	106
E	CINETICAS DE CULTIVOS ESTATICOS CON EXCESO DE GLUTAMINA Y GLUCOSA	107
E1	Cinéticas de crecimiento, consumo y producción de metabolitos en cultivos estáticos con exceso de glutamina y glucosa	107
F	CINETICAS DE CULTIVOS ESTATICOS BAJO LIMITACION DE GLUTAMINA	108
F1	Cinéticas de crecimiento, consumo y producción de metabolitos en cultivos estáticos bajo limitación de glutamina	108
G	CINETICAS DE CULTIVOS AGITADOS BAJO LIMITACION DE GLUTAMINA	109
G1	Cinéticas de crecimiento, consumo y producción de metabolitos en cultivos agitados bajo limitación de glutamina	109
G2	Estimación en línea del agotamiento de glutamina	110
G3	Perfiles de variables adquiridas y de control en cultivos agitados bajo limitación de glutamina	111
H	EFECTO DEL SUERO FETAL BOVINO	112
H1	Perfiles de concentración celular a diferentes concentraciones de suero fetal bovino	113
H2	Perfiles de viabilidad a diferentes concentraciones de suero fetal bovino	114
H3	Efecto de la concentración de SFB sobre la velocidad específica de crecimiento aparente y sobre el índice de viabilidad	115
H4	Efecto de la concentración de inóculo, en cultivos sin SFB, sobre el crecimiento celular	117
I	CULTIVOS EXPONENCIALMENTE ALIMENTADOS	119
I1	Artículo "Metabolic and kinetic studies of hybridomas in exponentially fed-batch cultures using T-flasks" por A.E. Higuera, L.D. Possani y O.T. Ramírez	120
I2	Complemento del artículo	143

INDICE DE FIGURAS

	página
1. Diagrama esquemático del metabolismo de glucosa y glutamina	11
2. Cultivo estático por lote con exceso de glutamina y glucosa	41
3. Cultivo estático por lote bajo limitación de glutamina	43
4. Cultivo estático por lote bajo limitación de glucosa	47
5. Cultivo agitado por lote con exceso de glutamina y glucosa	49
6. Cultivo agitado por lote bajo limitación de glutamina	53
7. Estimación en-línea del agotamiento de glutamina en cultivos por lote	54
8. Perfiles de aminoácidos y amonio durante el cultivo por lotes bajo limitación de glutamina	56
9. Perfiles de variables adquiridas y de control en cultivos por lote bajo limitación de glutamina	60
10. Cultivo agitado por lote bajo limitación de glucosa	61
11. Estimación en-línea del agotamiento de glucosa en cultivos por lote	62
12. Perfiles de aminoácidos y amonio durante el cultivo por lotes bajo limitación de glucosa	63
13. Perfiles de variables adquiridas y de control en un cultivo por lote bajo limitación de glucosa	67
14. Cultivo agitado y suplementado selectivamente con glutamina	69
15. Perfiles de crecimiento y producción de AcM en cultivos bajo limitación de glutamina y en un cultivo suplementado selectivamente con glutamina	70
16. Perfiles de aminoácidos y amonio durante el cultivo agitado y suplementado selectivamente con glutamina	73
17. Perfiles de variables adquiridas y de control en un cultivo suplementado selectivamente con glutamina	75
18. Cultivo agitado y suplementado selectivamente con glucosa	77
19. Perfiles de crecimiento y producción de AcM en un cultivo bajo limitación de glucosa y en un cultivo suplementado selectivamente con glucosa	78
20. Perfiles de variables adquiridas y de control en un cultivo suplementado selectivamente con glucosa	80

21.	Perfiles de consumo específico de oxígeno para cultivos limitados	82
22.	Efecto del oxígeno disuelto y pH sobre el potencial redox del cultivo	84
23.	Perfiles de una acción de control y de una eventualidad operacional	85
24.	Perfiles de eventos metabólicos en cultivos por lote	86
25.	Perfiles de eventos metabólicos en cultivos suplementados	87
26.	Perfiles de cultivos perturbados con rotenona o 2,4-dinitrofenol	91
27.	Efecto del agua, amonio y lactato sobre el potencial redox del cultivo	92
B1	Diagrama de componentes del sistema de control y adquisición de datos	103
C1	Ejemplo de cromatograma de estándares de aminoácidos y amonio	104
C2	Curvas patrón de estándares de aminoácidos y amonio	105
D1	Curva patrón de anticuerpos monoclonales	106
E1	Cinéticas de crecimiento, consumo y producción de metabolitos en cultivos estáticos con exceso de glutamina y glucosa	107
F1	Cinéticas de crecimiento, consumo y producción de metabolitos en cultivos estáticos bajo limitación de glutamina	108
G1	Cinéticas de crecimiento, consumo y producción de metabolitos en cultivos agitados bajo limitación de glutamina	109
G2	Estimación en línea del agotamiento de glutamina en cultivos por lote	110
G3	Perfiles de variables adquiridas y de control en cultivos agitados bajo limitación de glutamina	111
H1	Perfiles de concentración celular a diferentes concentraciones de suero fetal bovino	113
H2	Perfiles de viabilidad a diferentes concentraciones de suero fetal bovino	114
H3	Efecto de la concentración de SFB sobre la velocidad específica de crecimiento aparente y sobre el índice de viabilidad	115
H4	Efecto de la concentración de inóculo, en cultivos sin SFB, sobre el crecimiento celular	117
I2.1	Cultivo exponencialmente alimentado a una tasa de dilución de 0.02 h^{-1}	143
I2.2	Cultivo exponencialmente alimentado a una tasa de dilución de 0.03 h^{-1}	144
I2.3	Cultivo exponencialmente alimentado a una tasa de dilución de 0.04 h^{-1}	145
I2.4	Cultivo exponencialmente alimentado a una tasa de dilución de 0.05 h^{-1}	146

INDICE DE TABLAS

	página
1. Parámetros del Sistema Beckman	34
2. Resumen de parámetros cinéticos y estequiométricos para cultivos estáticos por lote	45
3. Resumen de parámetros cinéticos y estequiométricos para cultivos estáticos por lote y cultivos agitados por lote	51
4. Tendencia general de los perfiles de aminoácidos en cultivos limitados de glutamina	58
5. Tendencia general de los perfiles de aminoácidos en cultivos limitados de glucosa	66
6. Resumen de parámetros cinéticos y estequiométricos para cultivos estáticos por lote, cultivos agitados por lote y cultivos suplementados selectivamente	71
7. Tendencia general de los perfiles de aminoácidos en un cultivo suplementado selectivamente con glutamina	74
8. Resumen de reglas para la distinción entre eventos metabólicos y eventualidades operacionales	89
A1 Composición del medio de cultivo DMEM	102
A2 Composición de la solución de aminoácidos no esenciales	102

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

AcM	Anticuerpo Monoclonal o Concentración de anticuerpo monoclonal [mg/l]
ΔAcM	Anticuerpo monoclonal total [mg]
AMM	Amonio o Concentración de amonio [mmol/l]
C*	Concentración de oxígeno a la saturación [mmol/l]
C _{H₂O}	Concentración molar del agua [mol/l]
C _L	Concentración de oxígeno en el medio [mmol/l]
DMEM	Medio de Cultivo "Dulbecco's Modified Eagle's Medium [DME] Base"
GLC	Glucosa o Concentración de glucosa [g/l]
GLN	Glutamina o Concentración de glutamina [mmol/l]
H	Constante de Henry [mm Hg]
Ig	Inmunoglobulina
k _{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno [h ⁻¹]
LAC	Lactato o Concentración de lactato [g/l]
OD	Oxígeno Disuelto
PFK	Fosfofructocinasa
PK	Piruvato Cínasa
P _{O₂}	Presión Parcial de Oxígeno a la entrada [mm Hg]
PRC	Potencial Redox del Cultivo
PRG	Proteínas Reguladas por Glucosa
P _T	Presión total [mm Hg]
q _{AcM}	Velocidad específica de producción de AcM [mg/célula-h]
q _G	Velocidad específica de consumo de glucosa [mol/célula-h]
q _I	Coefficiente metabólico del sustrato o producto "I" [mol/célula-h] o [g/célula-h]
q _L	Velocidad específica de producción de lactato [mol/célula-h]
q _{O₂}	Velocidad específica de consumo de oxígeno [mmol/célula-h]
r _{AcM}	Velocidad volumétrica de producción de AcM [mg/l-h]
SFB	Suero Fetal Bovino
t	tiempo [h]

TA	Temperatura Ambiente
VCO	Velocidad de Consumo de Oxígeno [mmol/l-h]
x	Concentración celular viable [células/ml]
X_{max}	Concentración Celular Viable Máxima
$Y_{i/x}$	Rendimiento de sustrato o producto "i" sobre biomasa [g/g]
Y'_{LAG}	Rendimiento molar de lactato sobre glucosa [mol/mol]
y_{O_2}	Fracción mol de oxígeno [mol/mol]
2,4-DNP	2,4-dinitrofenol
μ	Velocidad específica de crecimiento aparente [h^{-1}]
μ_{max}	Velocidad Específica de Crecimiento Máxima
%V	Porcentaje de viabilidad [%]

Subíndices

o	al inicio
f	al final

RESUMEN

El potencial terapéutico de los anticuerpos monoclonales (AcM) ha hecho de la tecnología de hibridomas una de las más prometedoras de la "Nueva Biotecnología". Sin embargo, los métodos actuales para el cultivo de hibridomas presentan serias desventajas, incidiendo negativamente en la calidad y costo de los AcM. Este trabajo presenta el desarrollo de estrategias de control para la optimización de la producción de AcM secretados por hibridomas. La línea de hibridomas BCF2 fué utilizada como modelo para este trabajo. Esta línea celular produce un AcM que es específico y neutraliza *in vivo* a la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann.

Se realizaron cultivos por lote y cultivos suplementados selectivamente con glutamina (GLN) o glucosa (GLC) en bioreactor. Se utilizó un sistema computarizado de control y adquisición de datos con el que se monitoreó continuamente la velocidad de consumo de oxígeno (VCO), el oxígeno disuelto (OD), el pH y el potencial redox del cultivo (PRC). El OD y el pH fueron controlados manipulando la composición de oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂), respectivamente, en el cabezal del bioreactor. Se mostró que a OD constante, el tiempo de agotamiento de GLN o GLC puede ser inferido a través de la VCO y del comportamiento dinámico del PRC. Usando esta información, se establecieron estrategias de alimentación, mediante las cuales se alimentó GLN o GLC al momento del cese en la respiración celular. El uso de estas estrategias resultó en el restablecimiento de la VCO previo al agotamiento de GLN o GLC.

Se mostró que la adición repetida de GLN a concentraciones por debajo de 2 mM resulta en, por lo menos, un incremento del doble en la concentración celular máxima y un incremento entre 3 y 8 veces en la concentración máxima de AcM y en la productividad de AcM, comparado con cultivos limitados de GLN. Además, se mostró que la adición repetida de GLC, a concentraciones superiores a cero pero inferiores a 0.6 g/l, resultó en una concentración máxima de AcM que fué 6 veces mayor que en el cultivo limitado de GLC. Asimismo, una productividad que fué también mayor en más de 2 veces. La densidad celular máxima alcanzada fué del doble a la alcanzada en el cultivo limitado de GLC, pero similar a la alcanzada en el cultivo limitado de GLN.

Se encontró que durante los cultivos por lote, a OD y pH constantes, el PRC provee una

indicación confiable de la fase de crecimiento. Se observó que la fase de crecimiento es indicada por un descenso monotónico del PRC desde la inoculación hasta que se obtiene la concentración celular máxima y por un valor relativamente constante durante la fase de muerte. Asimismo, las mediciones del PRC permitieron discriminar entre un evento metabólico real (como agotamiento de nutrientes) y una eventualidad operacional (tal como fallas eléctricas o mecánicas que perturban al sistema). Cuando se usan algoritmos basados exclusivamente en balances de oxígeno, una eventualidad operacional puede originar señales que son interpretadas erróneamente como un cambio en la VCO. El uso de mediciones del PRC abre la posibilidad de incorporar conceptos avanzados de control a nuevos algoritmos computacionales.

Se realizaron cultivos en frascos-T para estudiar el efecto de la concentración de GLN y GLC sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la productividad específica de AcM (q_{AcM}). Se mostró que a bajas (pero no-limitantes) concentraciones de GLN o GLC los niveles de metabolitos tóxicos para los híbridos (amonio y lactato) se reducen y traen como consecuencia un incremento en la productividad de AcM.

CAPITULO I INTRODUCCION

1.1 DEFINICION E HISTORIA DE LOS HIBRIDOMAS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los organismos vertebrados desarrollaron, durante la evolución, el sistema inmunológico como un medio de defensa contra organismos extraños, tales como bacterias y virus, moléculas o sustancias tóxicas, y contra células del propio organismo cuando éste ha sufrido transformaciones malignas⁵. Dentro de este sistema se encuentra la respuesta humoral que consiste en la secreción de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) por un subgrupo de células linfáticas, conocidas como células plasmáticas. Estas Ig secretadas constituyen una mezcla heterogénea de anticuerpos originados de distintas poblaciones de linfocitos B. Esta mezcla policlonal está formada por Ig que reconocen distintos epítopes (determinantes antigénicos) del antígeno o que reconocen el mismo epítope pero con distintas afinidades.

La función de las Ig consiste en formar complejos estereoespecíficos con los sitios antigénicos del cuerpo extraño⁵. Los sitios antigénicos son generalmente proteínas o una porción de carbohidrato. Las Ig son glicoproteínas cuya unidad estructural básica consiste de cuatro cadenas polipeptídicas, dos ligeras idénticas (L) y dos pesadas idénticas (H). Las cuatro se mantienen unidas por puentes de disulfuro y enlaces no covalentes, formando una estructura que asemeja una "Y". La estructura primaria de las cadenas contiene dos regiones, una variable que presenta secciones cuya secuencia varía entre los distintos anticuerpos y una región constante, muy similar en todas las Ig de la misma clase. La especificidad y afinidad existente entre una Ig y un antígeno son debidas a la cavidad estérica y electrónicamente complementaria al antígeno respectivo que forman las regiones variables. La región constante es la que determina la vida media en el torrente sanguíneo y el reconocimiento por el sistema inmunológico celular. Dependiendo de la estructura de las cadenas H, las Ig se clasifican en IgG, IgA, IgM, IgD, e IgE⁴⁷.

Un hibridoma es el resultado de la fusión celular entre una célula B, productora de anticuerpos, con una de mieloma tumoral⁵. El hibridoma secreta anticuerpos con las características del linfocito B

paterno. Este producto secretado consiste en inmunoglobulinas homogéneas, con especificidad definida y con una constante de afinidad uniforme. Estas características son debidas a que su codificación genética deriva de una clona que reconoce un solo epítope. De aquí que se le denomine "anticuerpo monoclonal" (AcM) al producto secretado por un hibridoma de tales características.

De la investigación básica en biología surgió, en 1975, la tecnología para la producción de AcM⁵. Surgió en dos áreas, en el área de inmunología y en el área de experimentación de biología celular. En el área de inmunología surgió la posibilidad de inducir mielomas de ratón, es decir, tumores monoclonales de linfocitos B que secretan una sola especie de Ig⁵. Las líneas de mieloma, que han sido adaptadas a los cultivos, han permitido analizar el proceso de secreción de las Ig, su estructura, su función y la expresión de sus genes. Por otro lado, en el área de biología celular, se desarrolló la fusión de células con diferentes caracteres genéticos para la formación de híbridos portadores de cromosomas de ambas células paternas. Se establecieron las técnicas necesarias para la selección de los pocos híbridos formados de la gran población de células paternas no fusionadas. Además, se establecieron las técnicas para el análisis de la dominancia y recesividad de la expresión genética así como la localización cromosomal de los genes específicos.

En la fusión de dos mielomas diferentes se observó que se expresan los dos conjuntos paternos de cadenas ligeras y pesadas de las Ig en la célula híbrido, pero ensambladas como anticuerpos al azar⁵. La codificación de cada cadena permaneció inalterada (sin nuevas secuencias), a pesar de la mezcla de ensamble, y mostró estabilidad e independencia en el control de los genes de las Ig de ambos genomas paternos. También se observó que al fusionar una variante de mieloma, no secretora, no se supendió la producción y secreción de Ig en el híbrido resultante (por efecto de la no secretora). Gracias a estos principios básicos, es posible diseñar un hibridoma productor de AcM al fusionar (con polietilenglicol) una célula B de ratones inmunes (activada específicamente por un antígeno definido) con la de un mieloma carente de expresión de Ig, con lo cual la especificidad del AcM está determinada por la célula B paterna. Los hibridomas se propagan *in vitro*, como líneas celulares que secretan anticuerpos (10 a 100 µg/ml) monoespecíficos y homogéneos en estructura y afinidad.

1.2 APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

La tecnología de los hibridomas ha contribuido significativamente al desarrollo de la medicina y de la biología, debiendo su utilidad principalmente a sus propiedades específicas, a que es un instrumento de precisión para el aislamiento e identificación de antígenos de relevancia biomédica, a que es un ligando útil para el estudio de funciones biológicas de macromoléculas, y a sus diversas

aplicaciones en medicina⁵. Los AcM son un reactivo ideal para estudios inmunoquímicos gracias a que es posible producirlos y purificarlos en grandes cantidades. Es posible producir AcM contra moléculas de baja inmunogenicidad o de escaso contenido en una mezcla de antígenos y obtener la activación de clonas específicas para el antígeno deseado. Con los AcM se pueden aislar compuestos de importancia biológica mediante la técnica de inmunoadfinidad, con lo cual se puede estudiar la estructura molecular y la actividad biológica de estos componentes. La especificidad definida de los AcM permite estudiar funciones en macromoléculas y células, como es el bloqueo de procesos que definen funciones celulares, o mimetización de señales de hormonas o de otros ligandos biológicos. Con esta tecnología se estudian los fenotipos de virulencia en un gran número de microorganismos. Los AcM se consideran un instrumento valioso en el estudio de taxonomías y en el diagnóstico de laboratorio. Además, permiten la identificación de antígenos relevantes en la preparación de vacunas.

Desde hace una década se realizan varios inmunoensayos con AcM, como es la cuantificación de ciertas hormonas, enzimas e Ig para determinar alteraciones en los patrones de subpoblaciones linfocíticas de pacientes con trastornos inmunológicos o en la detección de antígenos tumorales⁵. Además, se investiga activamente la inmunoterapia mediante la administración de AcM contra antígenos tumorales⁵ o ciertas toxinas. Debido a lo anterior, esta tecnología ofrece un gran potencial en las investigaciones básica y aplicada de biología.

La importancia de los AcM se puede apreciar por la magnitud de su mercado. Para 1995 se pronostica alcancen los seis mil millones de dólares por año, que corresponden entre un 46 y 82% del mercado total estadounidense de productos farmacéuticos obtenidos por la "Nueva Biotecnología" (compuestos anticancer, factores sanguíneos, hormonas, vacunas, sondas de ADN, etc.)⁴⁷. La generación de una nueva clase de AcM con propiedades catalíticas abre también un campo muy prometedor de aplicaciones novedosas que pueden llegar a repercutir hasta en procesos industriales. Actualmente, el precio de los AcM terapéuticos es del orden de los miles de dólares por gramo, pero se espera que con el mejoramiento de las técnicas de cultivo el precio se reduzca sustancialmente⁴⁷.

1.3 EL CULTIVO DE HIBRIDOMAS

El cultivo de células de mamíferos para la producción de una gran variedad de agentes terapéuticos se ha expandido en los últimos años. En particular, la importancia del cultivo de hibridomas se incrementa aún más a medida que nuevos AcM encuentran aplicación en el área terapéutica, donde se requieren grandes cantidades de AcM⁴². Para tales aplicaciones, los métodos tradicionales de cultivo *in vivo* resultan inadecuados debido a limitaciones de escala, restricciones

reglamentarias en cuanto al control de calidad y especificación del producto, e inclusive consideraciones humanitarias en cuanto a la explotación de animales¹⁵. Por lo tanto, la producción comercial de AcM terapéuticos se realizará necesariamente por métodos de cultivo *in vitro*. Debido a ésto, se han examinado nuevos bioreactores de gran escala para el cultivo de células de mamíferos en general.

Recientemente han surgido sistemas novedosos (*i.e.*, los reactores de fibras huecas², de microencapsulación⁵⁰, de soporte cerámico²⁷, y los reactores de camas fijas⁴³ y fluidizadas¹⁹) diseñados para reducir los daños hidrodinámicos y mejorar las concentraciones celulares y productividades^{2,9,19,27,30,43,50,59}. Sin embargo, tales sistemas presentan problemas y desventajas. Entre éstos destacan los elevados costos, la heterogeneidad en las condiciones de cultivo, las limitaciones por transferencia de masa (generación de gradientes de concentración), la imposibilidad de escalamiento adecuado^{2,9,27,59}, la compleja operación del sistema, la inhabilidad de reusarse y la dificultad en la medición y control de variables. Debido a estas desventajas, los reactores convencionales agitados pueden representar la mejor opción para el cultivo de híbridomas a gran escala.

Los reactores convencionales agitados ofrecen las ventajas de una operación relativamente sencilla, el mantenimiento de condiciones homogéneas a través de todas las regiones del reactor y la facilidad de medición de variables ambientales (*i.e.*, composición del medio de cultivo, pH, oxígeno disuelto y potencial redox)^{3,46,47,49}. Sin embargo, para que los bioreactores agitados puedan ser implementados exitosamente, primero será necesario mejorar en forma sustancial las densidades celulares y la concentración de AcM alcanzables hasta ahora. Una forma de lograrlo es a través del desarrollo de sistemas computarizados que puedan adquirir, almacenar y controlar en forma rigurosa las distintas variables ambientales, y que permitan establecer estrategias automatizadas para la optimización de la producción de AcM. Tal desarrollo es importante ya que los sistemas de control actualmente disponibles son poco flexibles y muy costosos^{1,51,60}. Además, las estrategias de control reportadas a la fecha no son satisfactorias debido a que muchas son rudimentarias y poco efectivas, mientras que otras son muy complejas y difíciles de implementar^{26,31}.

Es importante notar que en el país existe ya una capacidad instalada de sistemas de cultivo en suspensión, tanto en instituciones de investigación como en industrias. Por lo mismo, el mejoramiento de métodos de operación de tales sistemas representa para México una alternativa inmediata para adquirir una tecnología propia y competitiva con otros procesos actuales⁴⁷. Además, el nivel de desarrollo del cultivo *in vitro* de eucariotes en México es aún limitado por lo que resulta clave el dirigir esfuerzos hacia este campo⁴⁷.

1.4 MODELO DE TRABAJO

En México, el escorpionismo es un problema importante de salud pública (actualmente se reportan más de 200,000 picaduras anuales por alacrán, de las cuales entre 700 y 800 son mortales). Por lo mismo, se decidió utilizar, como modelo, una línea celular de hibridomas (generada con anterioridad en el laboratorio del Dr. Possani del Instituto de Biotecnología) productora de un AcM que es específico y neutraliza *in vivo* a la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann⁶³. La importancia principal del AcM contra la toxina de alacrán es la caracterización inmunológica de los componentes tóxicos del veneno. Sin embargo, dada la actividad neutralizante de este AcM, éste posee aplicaciones potenciales en la elaboración de antídotos mejorados. Actualmente, el envenamamiento por picadura de alacrán es tratado mediante la aplicación de sueros antitoxina obtenidos de mamíferos, generalmente equinos. La producción de tales sueros presenta varias desventajas tales como el mantenimiento de ganado mayor, la variabilidad de lote a lote, así como la naturaleza poco definida del suero. Estas desventajas no solamente repercuten en el aspecto económico del proceso de obtención de los sueros sino que también pueden tener consecuencias médicas adversas como reacciones alérgicas e inclusive choque anafiláctico⁵⁶. De tal forma, el establecimiento de una metodología para la producción *in vitro* de AcM neutralizantes de toxinas de alacrán podría mejorar el aspecto económico de la producción de antitoxinas y también se lograría obtener un producto que presente menores riesgos médicos⁴⁷. Tales anticuerpos reducirían los problemas inmunológicos debidos a la presencia de proteínas de origen no humano, a pesar de que provienen de hibridomas murinos.

El presente trabajo describe el desarrollo de estrategias de operación de cultivos *in vitro* de hibridomas para la optimización de la producción de AcM. Las estrategias se basaron en el mantenimiento de concentraciones bajas de glutamina y glucosa mediante su adición selectiva. Dicha adición se basó en la determinación en-línea del consumo de oxígeno, mediante un sistema de control computarizado. El control computarizado consistió en mantener constantes, a un valor predeterminado, el oxígeno disuelto y el pH. Se controlaron ambas variables mediante la variación de la composición de la mezcla de gases (oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono) a la entrada del bioreactor. De tal forma, un súbito cese en el consumo de oxígeno correspondió al agotamiento de nutriente. Asimismo, se establecieron las estrategias de alimentación de nutrientes limitantes (glutamina o glucosa) basándose en el comportamiento dinámico de la composición del oxígeno en la

mezcla de gases a la entrada del bioreactor. Con este sistema de control computarizado se lograron concentraciones más altas de híbridomas. Se logró mantener dicha condición durante tiempos de operación prolongados, logrando mejorar la productividad del AcM contra la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann.

Este trabajo describe también la utilidad de las mediciones en-línea del potencial redox. Se observó que el potencial redox de cultivo provee una medición útil para distinguir entre eventos metabólicos reales (como agotamiento de nutrientes) y eventos operacionales (fallas eléctricas y mecánicas). Las eventualidades operacionales perturban al sistema y pueden originar señales computarizadas que son similares a las esperadas cuando se agota un sustrato. Esto ocurre principalmente cuando se usan algoritmos de control basados exclusivamente en balances de oxígeno, como el expuesto en este trabajo. Durante los cultivos de híbridomas por lotes, a oxígeno disuelto y pH constantes, el potencial redox del cultivo dió una indicación confiable de la fase de crecimiento. Por lo anterior, las mediciones del potencial redox podrían ser utilizados como un sensor para algoritmos de control más avanzado.

Finalmente, en forma paralela al trabajo central, se desarrolló un método novedoso de cultivo exponencialmente alimentado en frascos-T. Tal método demostró ser un sistema muy conveniente y poderoso para la caracterización cinética de cultivos de híbridomas. Esta parte del trabajo se describe en detalle en el apéndice I.

CAPITULO II ANTECEDENTES

2.1 CULTIVO DE HIBRIDOMAS *in vivo*

La producción de AcM ha sido tradicionalmente efectuada *in vivo* mediante la implantación de hibridomas en la cavidad peritoneal o subcutáneamente en animales hospederos, generalmente ratones atómicos¹⁵. A partir de la segunda semana, después de la implantación, un tumor visible se desarrolla y un fluido seroso se acumula en la cavidad abdominal. Posteriormente, el ratón se sacrifica y una cantidad de hasta 10 ml de líquido ascítico es cosechada, la cual contiene aproximadamente 0.3 g de AcM. A pesar de que la concentración de AcM obtenida en el líquido ascítico es muy alta (hasta de 10mg/ml), existen serias desventajas cuando se considera el escalamiento de esta tecnología a niveles comerciales². Por ejemplo, se requiere aproximadamente una colonia de cien ratones por cada gramo de AcM que se desea producir mensualmente¹⁹. Otra desventaja es que, junto con el AcM, están presentes niveles inaceptables de proteínas indeseables del animal hospedero. Además, para hibridomas humano-humano, no existe ningún modelo animal adecuado para la producción de AcM de uso terapéutico. Bajo este tipo de situaciones, el cultivo *in vitro* de hibridomas representa una solución más atractiva desde un punto de vista económico, humanitario y de reglamentación.

2.2 CULTIVOS DE HIBRIDOMAS *in vitro*

El cultivo *in vitro* no está exento de problemas. Las células animales son generalmente frágiles por lo que no pueden soportar las condiciones hidrodinámicas encontradas en reactores convencionales. Las células animales no poseen pared celular y, por lo tanto, no toleran velocidades excesivas de agitación o burbujeo. Esto impone serias restricciones en el diseño del sistema de transferencia de oxígeno. Generalmente, la concentración celular así como la de productos son de dos a cuatro órdenes de magnitud inferiores si se les compara con los cultivos *in vivo*. Existen riesgos de contaminación debido a las bajas tasas de crecimiento celular⁴⁷. Los medios de cultivo son generalmente sofisticados, constituidos por sueros sanguíneos y hormonas cuyo costo es muy elevado. Además, en modalidad por lotes, las condiciones ambientales del cultivo cambian

constantemente y la población celular global pasa a través de diferentes fases de crecimiento (v. g. lag, log, estacionaria y fase de muerte). Asimismo, las células animales son sensibles a variaciones de pH, osmolaridad³⁹ y a concentraciones altas de compuestos tóxicos tales como lactato y amonio e incluso oxígeno. Como respuesta a estos problemas han surgido una variedad de diseños y estrategias de operación de bioreactores a través de los cuales se han logrado mejoras considerables en la concentración celular y en la concentración de AcM.

Los frascos de cultivo estático o frascos-T, son los sistemas *in vitro* más comunmente usados a nivel de laboratorio. En estos sistemas, la homogeneidad y la transferencia de masa se logra exclusivamente por mecanismos difusionales²⁸. Para las concentraciones celulares típicas de alrededor de 3×10^6 células/ml, el oxígeno es limitante si la profundidad del medio de cultivo rebasa los 0.3 cm. De tal forma, estos sistemas están restringidos a geometrías con valores muy altos de área superficial por unidad de volumen y difícilmente representan una solución para procesos a grandes escalas.

En el caso de la producción de AcM en bioreactores agitados encontramos que se alcanzan densidades celulares y concentración de AcM muy bajas debido a que las células animales son frágiles a las condiciones hidrodinámicas de este tipo de sistemas^{3,46,49}. Sin embargo, este tipo de sistemas ocupan un lugar importante a gran escala. Las ventajas que ofrecen (mencionadas en la sección 1.3 de la Introducción) junto con la comprensión de las variaciones encontradas en las velocidades de consumo de nutrientes y secreción de productos a través de las diferentes fases de crecimiento, hacen posible el proponer y mejorar estrategias operacionales que nos llevarán al incremento de la densidad celular y de la productividad de AcM. De no ser así, los reactores convencionales agitados, seguramente se verán reemplazados por tecnologías patentadas (*i.e.*, reactores de fibras huecas²).

2.3 METABOLISMO DE HIBRIDOMAS

La glucosa (GLC) y la glutamina (GLN) son la principal fuente de carbono y energía, respectivamente, en la mayoría de los medios utilizados para el cultivo de células animales. Las vías principales de los metabolismos de GLC y glutamina se muestran en la figura 1. Ambos nutrientes proveen precursores biosintéticos únicos. La GLC y la GLN son nutrientes complementarios para la producción de otros metabolitos como el aspartato³³ y para la producción de energía. El grado en que es utilizada cada una de las vías metabólicas depende de la línea celular y de las condiciones de cultivo^{11,33}. La evidencia disponible sugiere que la GLC o los nutrientes oxidativos (principalmente GLN) pueden proveer la mayoría de las demandas energéticas celulares.

La GLC es requerida para la síntesis de nucleósidos, así como para la síntesis de 6-fosfato glucosamina y del precursor 3-fosfato gliceraldehído³³. Varios tipos celulares pueden utilizar fructosa, galactosa u otros azúcares en lugar de GLC y pueden crecer en ausencia de carbohidratos si el medio de cultivo es suplementado con uridina³³. Las células también pueden utilizar maltosa y almidón como fuentes de GLC debido a la presencia de las enzimas maltasa y α -amilasa en el suero fetal bovino (SFB)³³. Existe evidencia de que la GLC y la manosa se metabolizan rápidamente, permitiendo velocidades de crecimiento similares, y que el crecimiento en fructosa y galactosa es mucho menor³⁴. Se ha encontrado que las células HeLa crecen tan bien en fructosa como en GLC, pero muestran velocidades glicolíticas insignificantes y muy poca energía es derivada a partir del metabolismo de carbohidratos³³. Adicionalmente, se ha observado que (en células de mamíferos como por ejemplo fibroblastos diploides de humanos) las velocidades glicolíticas también se reducen notablemente para cultivos con concentraciones de GLC menores a 100 μ M³³. En el otro extremo, cultivos de fibroblastos de hamsters chinos deficientes en respiración muestran que el ATP proviene esencialmente de la glicólisis³³.

Por otro lado, la GLN es requerida para la síntesis de purinas y para la formación de nucleótidos guaninos³³. Además, la GLN es el principal donador de grupos amino en la síntesis de pirimidinas, aminoazúcares y asparagina. La mayoría de las líneas celulares requieren GLN para un crecimiento óptimo, aunque algunas líneas pueden utilizar glutamato directamente³³. Esto puede ser explicado parcialmente por la observación de que el intercambio entre la GLN intra- y extracelular es mucho mayor que el de glutamato en cultivos de fibroblastos humanos³³. La GLN puede ser también suplementada en una forma más estable mediante los dipéptidos glicil-GLN y alanil-GLN³³. En hibridomas se ha visto que la GLN es metabolizada principalmente para la formación de ATP a través de la oxidación fosforilativa hasta CO_2 y H_2O ^{11,33,47}.

2.3.1 *Metabolismo de glucosa*

En todas las células de mamíferos, la GLC es convertida en piruvato vía glicólisis (figura 1). La mayoría de las células no tumorales crecen bajo una regulación *in vivo* de crecimiento y se dividen lentamente¹¹. Estas células normales inactivas convierten el piruvato a acetil-CoA, en presencia de oxígeno, para su oxidación en el ciclo de Krebs. El NADH, del ciclo de Krebs y de la glicólisis, es regenerado a NAD^+ dentro de las mitocondrias en un proceso acoplado a la producción de ATP vía oxidación fosforilativa. La glicólisis es regulada vía inhibición de la fosfofructocinasa (PFK) por ATP a un nivel tal que provee suficiente acetil-CoA para la producción de energía. El acetil-CoA es usado también para la síntesis de lípidos. La glucosa 6-fosfato, que se acumula debido a la

inhibición de PFK, inhibe su propia síntesis vía hexocinasa. Sin embargo, a bajas concentraciones de oxígeno, la producción mitocondrial de ATP es reducida y la PFK es desinhibida. El incremento en la concentración de fructosa 1,6-difosfato estimula a la PFK y la actividad de la piruvato cinasa. Como resultado, el agotamiento de glucosa 6-fosfato mejora la actividad hexocinasa y se producen grandes cantidades de piruvato. Debido a la baja velocidad de oxidación fosforilativa, el piruvato se convierte en lactato (LAC) para reoxidar al NADH generado por glicólisis.

Las células cultivadas, los tumores y otras células proliferantes exhiben altas velocidades de glicólisis aeróbica, lo cual las distingue de las células normales en reposo^{11,33}. Es decir, que células bien diferenciadas y de crecimiento lento tienen bajas velocidades de glicólisis, y las poco diferenciadas y de rápido crecimiento tienen velocidades altas de glicólisis. Las altas velocidades de producción de LAC son similares a las observadas en células normales bajo limitación de oxígeno. Muchas células transformadas tienen incrementadas las concentraciones de enzimas glicolíticas y exhiben una disminución en el agotamiento de intermediarios glicolíticos vía reacciones reversibles o laterales³³. Varias isoenzimas glicolíticas también exhiben propiedades cinéticas y regulatorias diferentes. La alta glicólisis aeróbica puede ser atribuida principalmente a los cambios en los patrones de dos isoenzimas: la hexocinasa, al inicio de la secuencia glicolítica, y la piruvato cinasa (PK), al final¹¹. Las isoenzimas catalizan la misma reacción, pero difieren en estructura y, en la mayoría de los casos, difieren en su respuesta a los metabolitos. La hexocinasa está ligada a la mitocondria y muestra una inhibición reducida por la glucosa 6-fosfato³³. Las células que exhiben altas velocidades de glicólisis aeróbica contienen un tipo de PK que tiene reducida afinidad por el fosfoenolpiruvato¹¹. Esto permite que la concentración de fructosa 1,6-difosfato aumente hasta que sobrelleva la inhibición de PFK y PK por ATP. La hexocinasa totalmente activada y la desinhibición de PFK y PK conducen a niveles enormemente incrementados de glicólisis¹¹. Por otro lado, se ha visto que las células proliferantes y las células cancerosas contienen una isoenzima PK modificada que tiene características cinéticas modificadas (por ejemplo, una reducida afinidad por el fosfoenolpiruvato) y que esta isoenzima es inactiva en cultivos donde la concentración de GLC es menor a 100 μM , así como en cultivos que contienen fructosa en lugar de GLC¹¹. Por lo mismo, no se produce piruvato ni LAC a bajas concentraciones de GLC. Bajo estas condiciones de cultivo, la GLC es canalizada hacia la biosíntesis de macromoléculas y lípidos a través de la vía de las pentosas.

Una mol de GLC rinde 2 moles de ATP bajo condiciones anaeróbicas y 38 moles de ATP en presencia de oxígeno. Por ende, la respiración es el mecanismo más económico para la síntesis de ATP. El concepto de glicólisis aeróbica significa que la producción de piruvato, a partir de GLC, excede la capacidad del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria, pero también implica que las células tumorales utilizan sólo el 5% de la energía disponible en la GLC. Se ha visto que las altas velocidades

de producción glicolítica de ATP pueden incrementar la relación de ATP/ADP citosólico y disminuir la velocidad de producción de ATP mitocondrial debido a la reducción en la concentración de ADP. Esto causaría un incremento en el potencial transmembranal de la mitocondria (gradiente eléctrico total a través de la membrana), que a su vez reduciría la velocidad de oxidación fosforilativa e incrementaría la relación mitocondrial NADH/NAD^+ ³³. Es de esperar que una alta relación mitocondrial NADH/NAD^+ , combinada con el pequeño número de mitocondrias en tumores glicolíticos y posibles defectos en el transportador de malato/aspartato¹¹, ocasionen un decremento dramático en la cantidad de NADH citosólico oxidado en la mitocondria. Como resultado, el piruvato debe ser convertido a LAC para poder oxidar el NADH generado por glicólisis. Debe notarse que algunos estudios, con corazones de rata³³, indican que el consumo de oxígeno es regulado por el NADH y no por el ADP.

Los patrones metabólicos celulares pueden estar también influenciados en gran medida por la asociación con otras células. Por ejemplo, la velocidad específica de consumo de oxígeno de hibridomas inmobilizados en alginato de calcio se incrementó por un factor de tres durante el crecimiento³³. El incremento del consumo de oxígeno fué relacionado con el decremento en glicólisis (indicado por el decremento en el rendimiento de LAC/GLC y en la velocidad específica de consumo de GLC). Esto puede ser debido a que las interacciones célula-célula, en cultivos de hibridomas inmobilizados, son similares a las encontradas *in vivo*.

En células de mamíferos, se ha observado que la velocidad específica de consumo de GLC (q_G) se incrementa drásticamente en cultivos por lote a medida que la concentración inicial de GLC se incrementa de $10 \mu\text{M}$ a 5mM (generalmente ya no se observan cambios a concentraciones superiores a 5mM)^{31,33}. Se ha visto que la distribución de producto a partir de GLC depende de q_G . Se ha observado que las altas q_G , después de la adición de GLC, ocasionan un decremento en la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2})^{12,13}, así como en la cantidad de GLN oxidada³³. Esto posiblemente se debe a la inhibición de la oxidación fosforilativa por el incremento en la producción glicolítica de ATP, observada como el incremento del rendimiento de LAC/GLC y el incremento en la carga energética de adenilato³³. Además de los efectos de la concentración de GLC sobre el metabolismo, se ha observado que la limitación de GLC induce la expresión de un grupo de proteínas reguladas por GLC (PRG) y reprime la expresión de la mayoría de las proteínas celulares. La inducción de PRG está asociada a la deficiencia de la ribosa 5-fosfato y puede ser debida a la inadecuada glicosilación de proteínas³³.

En resumen, la glicólisis ocurre exclusivamente en el citosol de la mayoría de las células de mamíferos²⁹. La función esencial de la GLC es, más que la fuente de energía para la proliferación celular, el proveer sustratos anabólicos para la síntesis de ribosa, glucosamina 6-fosfato, serina.

glicina y glicerol, los cuales a su vez son esenciales para la biosíntesis de macromoléculas y lípidos durante la proliferación celular^{11,29}.

2.3.2 *Metabolismo de glutamina*

Bajo condiciones de limitación de carbohidratos, todo el LAC producido se deriva de la GLN (figura 1). La conversión de GLN a LAC se denomina glutaminólisis y esta secuencia de reacciones es catalizada por siete enzimas de las cuales cinco son del ciclo de Krebs¹¹. Tres de estas enzimas (glutaminasa, 2-oxoglutarato dehidrogenasa y la enzima málica) catalizan reacciones irreversibles bajo condiciones fisiológicas. La glutaminasa se activa con fosfato, a diferencia de la isoenzima encontrada en células de tejido (excepto de riñón)¹¹. La enzima málica, localizada intramitocondrialmente, utiliza NAD⁺ o NAD(P)⁺ para descarboxilar irreversiblemente el malato a piruvato¹¹. Esta enzima es activada por metabolitos como succinato, fumarato e isocitrato. El ATP y el ADP son inhibidores competitivos por malato¹¹. La glutaminólisis ocurre entre dos compartimientos, inicia y finaliza en el citosol, y los pasos intermedios ocurren en la mitocondria.

Las altas velocidades de consumo de GLN en los cultivos tal vez contribuyan a la elevada producción de LAC ya que se ha observado que la producción glicolítica de LAC, en células L929, se incrementa después de agregar GLN³³. Es de esperar que las altas velocidades de consumo de GLN generen grandes cantidades de NADH y FADH₂ vía glutamato dehidrogenasa y enzimas del ciclo de Krebs. Esto es consistente con la reducción intramitocondrial de NAD(P)⁺ por la GLN adicionada³³. Adicionalmente, el NADH generado por GLN incrementaría la relación mitocondrial NADH/NAD⁺ e inhibiría la regeneración de NADH glicolítica vía oxidación fosforilativa.

Muchas células normales producen GLN *in vivo*, pero las células tumorales o normales que proliferan muestran generalmente altas velocidades de consumo de GLN³³. La mayoría del esqueleto de GLN entra al ciclo de Krebs como α -ketoglutarato (figura 1). Más de la mitad del CO₂ generado por fibroblastos diploides normales se deriva de GLN, bajo cualquier condición de crecimiento, y entre el 70 y 80% del consumo de oxígeno corresponde a la oxidación de GLN en los linfomas 6C3HED³³. Para células de mamíferos, los valores reportados para la fracción de GLN convertida a CO₂ van desde el 35% (*i.e.*, células HeLa e híbridomas)^{18,33} hasta el 55% (*i.e.*, células L-M de ratón)³³. El LAC, glutamato, citrato, alanina y macromoléculas son otros de los principales productos³³, cuyas cantidades relativas dependen del ambiente de crecimiento, así como la velocidad de consumo de GLN también depende del medio ambiente de cultivo. La oxidación de GLC y GLN depende también en gran medida de la línea celular. Del estudio de 12 líneas de células animales, se observó que el intervalo de producción de CO₂ va desde 420 hasta 2,600 nmol (GLC + GLN) por mg de proteína

celular en 24 horas³³. Todos los casos estudiados mostraron que la oxidación era incompleta ya que se observó la secreción de grandes cantidades de metabolitos intermedios en el medio de cultivo. Si la oxidación fuese completa (a CO_2) se generarían 21 moles de ATP por mol de GLN. Cuando la oxidación es incompleta y se deriva en aspartato se generan 12 moles de ATP por mol de GLN. En cambio, si se deriva hacia LAC se generan sólo 6 moles de ATP por mol de GLN.

Se ha mostrado, en células de mamíferos, que la GLN incrementa la velocidad de oxidación del carbono 1 de la GLC por la vía de las pentosas y que inhibe la oxidación del carbono 6 vía el ciclo de Krebs en fibroblastos diploides de humanos y en células ascíticas de Ehrlich-Lette³³. El efecto global sobre el consumo de oxígeno es generalmente pequeño, aunque se han observado incrementos del 75% en el qO_2 para linfocitos mesentéricos de rata después de la adición de GLN³³. La adición de GLN puede mejorar (linfocitos de rata) o inhibir el consumo de GLC (macrófagos de ratón)³³. Las altas concentraciones iniciales de GLN, hasta 10 mM, generalmente incrementan la concentración celular máxima en cultivos por lote e incrementan la velocidad específica de consumo de GLN³³. A pesar de que la velocidad de crecimiento no es sensible a las concentraciones de GLN entre 1 y 8 mM, la velocidad de crecimiento decrece rápidamente a bajas concentraciones^{31,33}.

Junto con los carbohidratos, los aminoácidos son la fuente de carbono reducido más abundante en el plasma de los mamíferos y en los medios de cultivo, y que es disponible para el metabolismo oxidativo. La GLN, por sí sola es el aminoácido más abundante. Existen fuertes evidencias de que la GLN es un combustible energético de importante potencial en el cultivo *in vivo* e *in vitro* de hibridomas, células tumorales y normales con potencial proliferante, aún cuando la GLC está presente en grandes cantidades^{11,29}. La GLN, al igual que la GLC, entra a la célula en un transportador específico de la membrana²⁹, y probablemente el paso de la conversión de GLN a glutamato, por las glutaminasas o glutamino amidotransferasas, secuestra los carbonos de GLN como glutamato dentro de la célula. Muchos experimentos con diferentes líneas celulares de diversos tipos indican que el glutamato y otros ácidos dicarboxílicos cruzan la membrana celular relativamente poco^{11,29}.

El papel anabólico de la GLN, en las reacciones de amidotransferasa que rinden glutamato y amonio (AMM), es indispensable para la proliferación celular debido a que los iones libres de AMM no pueden substituir al grupo 5-amido de la GLN en la biosíntesis de purinas, pirimidinas, glucosamina y asparagina^{11,29}.

2.3.3 *Metabolismo de aminoácidos*

Las velocidades de consumo de otros aminoácidos son mucho menores a las de GLN y varían

con la línea celular y las condiciones de cultivo. Se han realizado estudios de las velocidades de consumo de aminoácidos para una variedad de líneas celulares de mamíferos³³. Generalmente, se observan altas velocidades de consumo para los aminoácidos ramificados leucina, isoleucina y valina, así como para arginina. Otros aminoácidos consumidos a relativamente altas velocidades por diversas líneas celulares de mamíferos incluyen lisina, treonina, asparagina y metionina. Todas las líneas estudiadas producen alanina, y un gran grupo de líneas también producen glutamato, aspartato, glicina y prolina. Comportamientos similares han sido observados para varias líneas de hibridomas³³. Algunos de los aminoácidos son utilizados tanto en la producción de energía como en la síntesis de proteínas. Se han observado velocidades de consumo de aminoácidos ramificados incrementadas cuando se cultivan hibridomas en cultivos continuos a bajas concentraciones de GLN³³. El uso de aminoácidos ramificados para la producción de energía es consistente con la observación de que la oxidación de leucina es inhibida por GLC en células ascíticas de Ehrlich-Lette³³.

Se ha mostrado que la formación de aspartato es la única función importante de la glutaminólisis en la proliferación celular. Bajo limitaciones de carbohidratos, la síntesis de aspartato es asegurada a partir de la GLN y de los carbohidratos residuales. A bajas concentraciones de GLC, la GLN es canalizada preferentemente a LAC y aspartato, y no a citrato¹¹. A pesar de que el aspartato es un precursor esencial en la síntesis de purinas y pirimidinas, su nivel se mantiene bajo durante la proliferación. El aspartato se incrementa sólo cuando las células se vuelven confluentes¹¹. Se ha encontrado (a través de mediciones de sustratos, productos y metabolitos intermediarios en cultivos con altas y bajas concentraciones de GLC) que el suministro de acetil-CoA, a partir de piruvato, es el principal regulador de la disponibilidad de oxaloacetato para la síntesis de aspartato. Si el nivel de acetil-CoA es alto, entonces un mayor consumo de oxaloacetato trae como consecuencia una disminución en el mismo para la síntesis de aspartato¹¹. Además de la función del aspartato como precursor, éste participa en la transferencia de equivalentes reductores del citosol a la mitocondria (transportador malato-aspartato), originando relaciones de NADH/NAD⁺ bajas cuando las células dejan de proliferar y el aspartato se acumula¹¹. Hay evidencias que indican que al incrementarse la relación NADH/NAD⁺, una señal metabólica induce la progresión de la fase G₀ a la fase G₁ del ciclo celular¹¹. Cabe mencionar que se ha descrito al crecimiento de células eucariotas como un ciclo que consta de cuatro fases distintas, las cuales ocurren en sucesión continua: la fase de mitosis (M), la fase de transición (G₁) entre la mitosis y la síntesis de ADN, la fase de síntesis de ADN (S), y la fase de transición (G₂) entre la síntesis de ADN y la siguiente fase de mitosis⁴⁵. Adicionalmente, se ha descrito a la fase G₀ como la fase de arresto celular que está fuera del ciclo celular y que se encuentra después de la fase de mitosis.

La serina se forma del intermediario glicolítico glicerato 3-fosfato, y es un precursor esencial

para la glicina y para los grupos activos de metil que son usados en la síntesis de purinas, pirimidinas y en la metilación de adenosil homocistefna para la síntesis de metionina¹¹. Una alta capacidad de síntesis de metionina garantiza una alta velocidad de conversión de adenosil metionina a adenosil homocistefna, lo cual es un requerimiento para la proliferación celular¹¹.

2.4 EFECTO DE DESECHOS METABOLICOS: LACTATO Y AMONIO

El AMM y LAC son los principales productos secundarios del metabolismo de GLN y GLC (figura 1). La concentración final de AMM depende de la vía hacia donde se derive la GLN en cultivos por lote (CO₂, LAC o aspartato). La concentración final de AMM es típicamente de 2 a 5 mM y generalmente se incrementa al suplementar GLN³³. La concentración final de LAC depende de la concentración de GLC^{31,33}, y puede ser tan alta como 35 mM.

Las concentraciones de AMM, que inhiben el crecimiento, difieren marcadamente entre las diferentes líneas celulares. Por ejemplo, se inhibió el crecimiento de dos líneas de hibridomas con 2-3 mM de NH₄Cl, mientras que otras dos mostraron sólo una ligera inhibición a concentraciones superiores a 4 mM^{32,33}.

Existe poca información sobre los efectos del LAC. En sistemas sin control de pH, el crecimiento celular puede ser inhibido por pH bajos, que a su vez son debidos a las altas concentraciones de LAC³³. La concentración inhibitoria de LAC varía según la línea celular, pero la adición de LAC es generalmente menos inhibitoria que la adición de AMM en cultivos con pH constante³³. Por ejemplo, se inhibió el crecimiento de una línea de hibridomas de ratón con concentraciones de LAC superiores a 4 mM, mientras que la adición de 4.9 mM de LAC no afectó el crecimiento de una línea de hibridomas humanos en cultivo por lotes³³. En contraste, la adición de hasta 22 mM de LAC estimuló el crecimiento de otra línea de hibridomas de ratón y sólo concentraciones superiores a 28 mM inhibieron su crecimiento³³. Estudios con otros dos hibridomas de ratón mostraron que no existe efecto alguno a concentraciones de hasta 40 mM de LAC. Adicionalmente, se mostró que a 70 mM de LAC se inhibe el crecimiento de uno de estos dos hibridomas^{32,33}. La adición de LAC puede estimular o inhibir la síntesis de AcM por hibridomas³³. Adicionalmente, estudios realizados con dos líneas humanas muestran que la inhibición del consumo de oxígeno, por AMM y LAC, es mucho menor que la correspondiente inhibición del crecimiento celular³³.

La presencia de otras fuentes de carbohidratos en los cultivos celulares (tales como galactosa,

ribosa, fructosa, uridina e inosina) ocasionan un decremento drástico en la formación global de LAC¹¹. La pequeña cantidad de LAC, encontrada bajo estas condiciones, se deriva de GLN por glutaminólisis¹¹. Sin embargo, el ¹⁴C de la ribosa y galactosa fué detectado en la serina y no en el piruvato o LAC¹¹. La limitación de GLC o su total sustitución con otra hexosa, resulta en una marcada reducción de la formación de LAC sin una caída proporcional en la velocidad de crecimiento, por lo que una alta velocidad de glicólisis no es esencial para la proliferación de ciertas líneas celulares¹¹.

2.5 POTENCIAL REDOX DE CULTIVOS

El potencial redox del cultivo (PRC) se define como la medida de la tendencia de los pares redox para aceptar y donar electrones. Desafortunadamente, no se sabe si el aceptor de electrones reacciona directamente con el electrodo de redox o si es vía un proceso celular de transferencia de electrones (*i.e.*, el par redox NAD⁺/NADH)²². Se ha mostrado que no existe un estado de equilibrio termodinámico en los sistemas biológicos abiertos, como son las fermentaciones, y que el valor del PRC es considerado un potencial estacionario que refleja las condiciones redox del medio: es decir, los diversos pares redox presentes en el medio de cultivo²³. En un ambiente altamente aeróbico, el principal par redox que domina la medición del PRC es el par oxígeno/agua^{23,61}. De acuerdo con Wimpenny⁶¹, el par principal puede tener tanto peso que la magnitud del PRC puede estar dictada por este par, siendo los otros despreciables. Debido a las condiciones cambiantes de las fermentaciones, es difícil obtener valores consistentes de PRC bajo condiciones específicas de cultivo. El oxígeno disuelto (OD), el pH y los microorganismos, así como los metabolitos secretados, pueden afectar el valor del PRC. Esto indica que el perfil del PRC por sí solo no tiene mucho valor²³.

En las dos últimas décadas, las mediciones del PRC, en fermentaciones aeróbicas y microaeróbicas, fueron basadas principalmente en que las lecturas del potencial redox extracelular son función del ambiente redox intracelular²³. Otra motivación para estas mediciones fué que el PRC puede ser utilizado para estimar niveles extremadamente bajos de OD^{23,61}. Se han realizado muchos estudios para investigar el efecto del PRC sobre el metabolismo celular en fermentaciones microaeróbicas, y se ha observado que a diferentes valores de PRC se obtienen diferentes distribuciones de productos²³. Estos resultados indican que estas fermentaciones pueden ser optimizadas si se controla el PRC²³. Sin embargo, existen pocos trabajos en los que la señal de PRC es utilizada como fuente de información acerca del estado metabólico de las fermentaciones, donde el enfoque principal sea sobre los cambios en el PRC que no están relacionados con el pH y el OD de diferentes sistemas de fermentación²³. Estos trabajos se han basado en el supuesto de que cualquier

cambio en el PRC, bajo condiciones de pH y OD controladas, debe ser causado por el metabolismo celular (i.e., agotamiento de sustrato y cambios en la formación de productos).

Es bien sabido que cuando las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas crecen a baja aireación y sin control de pH, que los principales factores que determinan el valor del PRC son los cambios en la presión parcial de oxígeno y en el pH³⁵. En los últimos años se mostró que, durante el crecimiento bacteriano en fermentadores con control de pH y a altos niveles de oxígeno, los cambios en el PRC no pueden ser atribuidos a los cambios en el pH o en la presión parcial de oxígeno. Estos cambios en el PRC fueron observados como saltos a valores más negativos durante procesos de transición como el agotamiento de GLC y AMM (*E. coli*, *B. subtilis* y *S. marcescens*), el choque térmico a células en crecimiento (*E. coli*), y la división celular en cultivos sincronizados (*B. subtilis*)³⁵. Por otro lado, Kwong *et al.*²³ observaron que durante la fase de crecimiento lag de fermentaciones de *Corynebacterium glutamicum*, el PRC decrece gradualmente hasta un mínimo y luego se incrementa hasta un máximo, mientras que el OD permanece constante. Al iniciar la fase de crecimiento exponencial, el OD y el PRC decrecen gradualmente hasta que se agota la treonina, donde el OD se incrementa y el PRC disminuye gradualmente. El PRC llega a un mínimo, a partir de donde se incrementa gradualmente trazando al perfil del OD. En este momento, en el que inicia el incremento, ocurre un agotamiento de GLC. Kwong *et al.*²³ concluyen que, en su sistema de fermentación, pueden determinar el inicio de la fase de crecimiento exponencial, el momento de agotamiento de treonina y el momento de agotamiento de GLC.

Oktyabr'skii y Smirnova³⁵ observaron dos tipos de cambios en el PRC a pH constante y alta aireación (en cultivos por lote de *E. coli*, *B. subtilis* y *B. megaterium*). Por un lado, observaron una disminución gradual en el PRC e inversamente proporcional al OD (durante el crecimiento bacteriano) como resultado de las interacciones entre el electrodo de platino y la superficie celular. Por otro lado, observaron un cambio drástico en el PRC, hacia valores más negativos, que correspondía a diferentes procesos de transición como son el agotamiento de fuentes de carbono, energía o nitrógeno, o bien el cambio metabólico de una fuente a otra. Estos últimos cambios son causados por la acción de la superficie celular y de las sustancias redox presentes en el medio sobre el electrodo. Oktyabr'skii y Smirnova³⁶ han mostrado que los saltos negativos en el PRC durante el agotamiento de GLC y AMM están correlacionados con el incremento en la cantidad de grupos tiol (SH) disponibles tanto en el medio de cultivo como en la superficie celular. Estos investigadores sugieren que los saltos en el PRC reflejan cambios en el gradiente del potencial electroquímico de protones y proponen que la disminución en el pH intracelular es la razón de estos cambios ya que, por ejemplo, al agotarse GLC se acidifica el citoplasma. De hecho, Oktyabr'skii y Smirnova³⁶ mostraron que los cambios en el PRC (en *E. coli*) pueden ser debidos a la acción de componentes que afectan el

pH intracelular, tales como acetato o propionato, el protonóforo cianuro de *m*-clorofenilhidrazona y el catión tetrafenilfosfonio que penetran a la célula. Por lo mismo, sugieren que la disminución en el PRC es consecuencia del incremento en el número de grupos tiol disponibles, lo cual a su vez es consecuencia de la secreción celular de componentes tiol reducidos y de bajo peso molecular que llevan a un cambio en la relación tiol:disulfuro intracelular. Además, sugieren que los cambios en el pH intracelular son probablemente debidos a la influencia de sustancias exógenas (ácidos y bases débiles que penetran la célula y ionóforos) y de agentes regulatorios (*i.e.*, cuando las células pasan a la fase estacionaria de crecimiento o durante la división celular) y que estos cambios en el pH intracelular juegan un papel de accionador mientras que los cambios en la relación tiol:disulfuro (dentro y fuera de la célula) juegan un papel de amplificador de señales regulatorias.

La información sobre el PRC es muy limitada en cultivos de células animales. Sin embargo, Hwang y Sinskey¹⁷ observaron que la acumulación de tioles en el medio de cultivo de distintas líneas celulares parece ser una característica universal. Asimismo, observaron que los cambios del PRC correspondían a cambios de la concentración de tiol en el medio. Por otro lado, Choi *et al.*⁶ observaron que una propiedad importante del suero es mantener un PRC adecuado para la proliferación celular. Además, observaron que tal propiedad podía ser substituída al reemplazar el suero con tioles, tales como el β -mercaptoetanol. Tanto las observaciones de Hwang y Sinskey¹⁷ como las de Choi *et al.*⁶, en cultivo de células animales, concuerdan con las de Oktyabr'skii y Smimova^{35,36}, en células de procariones, en cuanto a la acumulación de tioles en el medio y su efecto sobre el PRC.

2.6 ESTRATEGIAS DE OPTIMIZACION

La mayoría de los datos experimentales sugieren que la secreción de AcM, producidos por hibridomas cultivados *in vitro*, se puede describir mediante una cinética de producción no asociada a la velocidad de crecimiento (ecuación 1), es decir, que la producción ocurre durante todas las fases de crecimiento^{8,26,44,45,48}:

$$[AcM] = q_{AcM} \int_0^t x \, dt \quad (1)$$

Por ende, para maximizar la producción de AcM, se tendrá que maximizar la integral de células viables (x) con respecto al tiempo de cultivo (t) y/o incrementar la velocidad específica de producción de AcM (q_{AcM}). Esto tiene como consecuencia que cualquier estrategia orientada hacia la optimización de la

producción de AcM esté basada en el establecimiento de densidades celulares elevadas así como en la operación prolongada de bioreactores. Sin embargo, Glacken *et al.*¹⁴ mostraron que la q_{AcM} era asociada al crecimiento hasta velocidades específicas de crecimiento (μ) de 0.02 h^{-1} , teniendo un valor de aproximadamente $2.5 \times 10^9 \text{ mg/célula-h}$. También observaron dependencia de la q_{AcM} a la concentración de LAC. Susuki y Ollis⁵⁴ propusieron que los hibridomas arrestados en la fase G1 del ciclo celular producen AcM a una velocidad considerablemente mayor que las células encontradas en otras fases del ciclo celular. A medida que la μ decrece, el tiempo que pasan las células arrestadas en la fase G1 se incrementa mientras que los tiempos requeridos para atravesar las fases S, G2 y M son aproximadamente constantes. Las células pueden ser arrestadas en un punto tardío de la fase G1, conocido como punto de restricción, a menos que reciban una señal para continuar. Susuki *et al.*⁵⁴ argumentan que la fracción de células arrestadas, en el punto de restricción, incrementa al decrecer la μ . De hecho, la fracción de células arrestadas es cercana a cero a μ intermedias y altas, y se incrementa al decrecer la μ . Por lo tanto, los métodos que arresten células pueden ser utilizados para incrementar las productividades de AcM, o bien, se pueden implementar estrategias que logren el arresto de células en la fase G1, basándose en la disminución de la μ . De lo anterior se deduce la importancia que tiene la caracterización de líneas celulares, ya que es necesario establecer el comportamiento asociado y/o no asociado de la cinética de producción de AcM en cada caso particular.

Se ha visto que, cuando se usan formulaciones convencionales de medio de cultivo, la obtención de densidades celulares altas está limitada en parte por el agotamiento de nutrientes claves (principalmente GLN y GLC) y/o por la secreción de metabolitos tóxicos (AMM y LAC)⁴⁵. La presencia de concentraciones altas de GLC en el medio de cultivo causa un aumento en la tasa de glicólisis y, por ende, en la acumulación a niveles tóxicos de LAC^{11,33}. Por el contrario, si se mantienen niveles bajos de GLC se minimiza la producción de LAC. Por otro lado, el AMM también es tóxico¹⁴. Dependiendo de la proporción de GLN canalizada a través del ciclo de Krebs, la relación de moles de AMM secretados a moles de GLN catabolizada puede variar entre 1 y 2¹³. Además, la GLN se descompone espontáneamente formando AMM. Esta descomposición sigue un proceso de primer orden, por lo que, si se mantienen niveles bajos de GLN, se puede minimizar la formación de AMM por descomposición^{13,40}.

Estudios recientes han mostrado que la viabilidad de un cultivo puede ser prolongada mediante la alimentación predeterminada de nutrientes, ya sea por operación tipo "fed-batch" o en forma de pulsos^{26,31}. Sin embargo, tales estrategias resultan en el uso ineficiente del medio de cultivo, la sub- o sobrealimentación de GLC y/o GLN con la consiguiente limitación del cultivo, y la producción excesiva de LAC y AMM, respectivamente. Un ejemplo claro de esto es el trabajo de Bibila *et al.*⁴ en el cual alimentan medio concentrado (10X), a cultivos de diferentes líneas celulares de hibridomas, en

forma de pulsos o en forma continua. El primer pulso de medio concentrado se dió cuando se observó un estado estacionario en la curva de crecimiento (la misma observación fué considerada para el inicio de la suplementación continua). Los dos siguientes pulsos se dieron a intervalos que correspondían aproximadamente a la mitad del tiempo de duración de la fase exponencial de crecimiento antes del primer pulso. Con esta estrategia lograron aumentos, con respecto a cultivos control por lote, en la concentración celular máxima, en el índice de viabilidad, en la concentración final de AcM (de 7 veces) y en la velocidad específica de producción de AcM (casi de 3 veces). Estas estrategias presentaron los problemas de sobreacumulación de AMM, LAC y algunos nutrientes (*i.e.*, glutamina, tirosina, valina, alanina, treonina, glicina, histidina, fenilalanina, isoleucina y leucina). Además, presentó problemas de incrementos excesivos de osmolaridad. Debido a los problemas presentados, este sistema resulta costoso si se considera su escalamiento. De aquí la necesidad de proponer nuevas estrategias operacionales o mejorar las ya existentes.

Kurokawa *et al.*²¹ emplearon un sistema en-línea que determina, por medio de un HPLC, las concentraciones de GLC, GLN y LAC en cultivos de hibridomas. Con este sistema, las concentraciones de GLC y GLN fueron controladas simultáneamente por un algoritmo de control adaptativo. Cuando se controlaron los niveles de GLC a 0.1 g/l y GLN a 1.4 mM, la concentración celular máxima y la velocidad específica de producción de AcM se incrementaron a poco más del doble, comparado con cultivos con control de GLC a 2 g/l y 4 mM de GLN inicial. Adicionalmente, las concentraciones finales de AMM y LAC disminuyeron por lo menos a la mitad y la concentración final de AcM fué cerca de 4 veces mayor. Con esta estrategia se comprobó que el control simultáneo de los niveles de GLC y GLN es útil en la optimización de cultivos de hibridomas ya que reduce los niveles de metabolitos tóxicos, evita la sobrealimentación y aumenta la productividad. Debe notarse que es importante controlar ambos nutrientes ya que Kurokawa *et al.*²¹ observaron que, por ejemplo, a bajos niveles de GLC y sin control de GLN, la producción de AMM aumenta considerablemente. Las desventajas de este sistema son el alto costo de los análisis por HPLC, además del costo del mismo, y el tiempo que tardan dichos análisis en ser procesados antes de dar la indicación de control al sistema computarizado.

Xie y Wang⁶² desarrollaron un modelo estequiométrico simplificado del metabolismo energético para el cultivo de células animales, en donde se consideraron las principales vías metabólicas de GLC y GLN. A partir de este modelo, desarrollaron una estrategia de alimentación para controlar las concentraciones de nutrientes a niveles bajos y lo aplicaron a su sistema de control. Específicamente, emplearon una estrategia de control fuera de línea en la que estimaron el crecimiento celular. Es decir, tomaron muestras del cultivo cada 12 h, determinaron la densidad del cultivo así como las velocidades específicas de crecimiento y de muerte, e introdujeron estos valores al programa

de control que predice el crecimiento celular (antes de que se tome la siguiente muestra). Con la predicción de la densidad celular, el programa estima los parámetros cinéticos necesarios con los que puede controlar y accionar la alimentación de nutrientes, tal que la velocidad de alimentación sea igual a la velocidad con que se consumen. Con esta estrategia de control, Xie y Wang⁶² lograron mantener niveles bajos de nutrientes (especialmente GLC y GLN), de LAC y de AMM, y un aumento de 18 veces en la concentración final de AcM comparado con el cultivo por lote de híbridomas. Las principales desventajas de este sistema son: 1) es un sistema abierto el cual depende de la precisión con que se estime la densidad celular; 2) a partir de la fase estacionaria de crecimiento se pierde el control estequiométrico de GLC y GLN. Por ejemplo, se sobrealimenta GLN estabilizándose en 1.5 mM pero alcanzando niveles de hasta 5 mM, y se sobrealimenta GLC estabilizándose por arriba de 0.5 g/l.

Zhou y Hu⁶⁴ determinaron la correlación estequiométrica entre el consumo de GLC y la adición de base para el control de pH, así como la correlación estequiométrica entre el consumo de GLC y la velocidad de consumo de oxígeno (VCO). Utilizaron la adición de base o la VCO como indicador metabólico para manipular la concentración de nutrientes a bajos niveles, pero no-limitantes, en cultivos alimentados con medio concentrado (16X). Es decir, estimaron en-línea la velocidad de alimentación de nutrientes requerida para mantener los niveles de nutrientes y productos de desecho bajos, basándose en cualquiera de las dos correlaciones estequiométricas. Observaron que la cantidad de base adicionada es un buen indicador del LAC formado, siempre y cuando se mantenga relativamente constante la capacidad de buffer del medio de cultivo. Para mantener la capacidad de buffer constante, controlaron a 5% el CO₂ en la composición de gases a la entrada. La concentración de GLC fue controlada a niveles inferiores a 0.5 g/l mediante la alimentación de una cantidad estequiométrica de solución de nutrientes correspondiente a la adición de base para el control de pH. Esta correlación se fundamenta en que cada mol de LAC producido requiere para su neutralización una mol de NaOH y en que las cantidades de GLC consumida y LAC producido son relativamente constantes durante la fase exponencial de crecimiento, por lo que la cantidad de GLC consumida puede ser estimada en-línea. Con esta estrategia, Zhou y Hu⁶⁴ lograron prolongar la fase exponencial de crecimiento. Aumentaron la concentración celular máxima y la concentración final de AcM en más de 3 y 6 veces, respectivamente. Disminuyeron la formación de LAC casi a la tercera parte con respecto a cultivos por lote. Por otro lado, en los cultivos alimentados en base a la VCO, Zhou y Hu⁶⁴ estimaron la cantidad de GLC consumida (y de otros nutrientes) en-línea a partir del consumo de oxígeno acumulativo. Encontraron que por cada mol de oxígeno consumido, se utilizaban 0.08 g de GLC. Se basaron en esta correlación para mantener la concentración de GLC en niveles inferiores a 0.5 g/l durante la alimentación de medio concentrado. Con esta estrategia también lograron prolongar la fase exponencial de crecimiento, pero la concentración celular máxima y la concentración final de AcM aumentaron sólo en dos veces. Además, la concentración final de LAC disminuyó únicamente a la

mitad con respecto a cultivos por lote. Zhou y Hu⁶⁴ proponen que con la combinación de ambas estrategias (en base a la adición de base y en base a la VCO), la estrategia de control estequiométrica puede ser mejorada substancialmente. Las estrategias propuestas por Zhou y Hu⁶⁴ presentan desventajas ya que las relaciones estequiométricas no necesariamente son constantes cuando hay cambios en las fases de crecimiento. Además, existen errores de medición tanto para la VCO como para la adición de base, lo cual causa incertidumbre respecto a las acciones de control y las fluctuaciones y desviaciones de la concentración de nutrientes fijada. Otra desventaja es que alimentan medio basal concentrado, por lo que el costo se eleva ya que algunos nutrientes secundarios pueden estar en exceso. Adicionalmente, este es también un sistema abierto que depende de la precisión con que se determinen las correlaciones estequiométricas y se estime el consumo de GLC.

La determinación de la velocidad de consumo de oxígeno (VCO), en las diferentes fases de crecimiento, permite la comprensión del estado metabólico de las células en cada fase y puede ser utilizada en la aplicación de estrategias de control tales como la suplementación automatizada de nutrientes. Ramírez y Mutharasan⁴⁵ han reportado que el agotamiento de GLN puede ser estimado en tiempo real y en-línea mediante mediciones continuas de la VCO. Un descenso súbito en la VCO indica que el sustrato se ha agotado. Usando dicha señal se encontró que mediante la suplementación manual de GLN al momento del descenso en la VCO, la densidad celular máxima y la concentración final de AcM aumentan en un 63 y 115%, respectivamente⁴⁵. Sin embargo, existe poca literatura al respecto y aún no se ha establecido un comportamiento general entre distintas líneas celulares. Asimismo, existe información limitada respecto al efecto de la GLC y su agotamiento sobre la VCO.

CAPITULO III OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- * **PROPONER ESTRATEGIAS DE OPERACION PARA OPTIMIZAR LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES SECRETADOS POR HIBRIDOMAS CULTIVADOS EN SUSPENSION EN BIOREACTORES AGITADOS.**

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- * **PROLONGAR LA "LONGEVIDAD" DE LAS CELULAS; ES DECIR, OBTENER EL MAYOR NUMERO DE CELULAS VIVAS DURANTE EL MAYOR LAPSO DE TIEMPO; MEDIANTE LA SIGUIENTE ESTRATEGIA:
IMPLEMENTAR LA ADICION DE GLUCOSA Y GLUTAMINA, BASADA EN EL COMPORTAMIENTO DE LA COMPOSICION DE OXIGENO DE LOS GASES DE ENTRADA, MANTENIENDO EL OXIGENO DISUELTO CONSTANTE. ES DECIR, BASADA EN LA DETERMINACION EN-LINEA DEL CONSUMO DE OXIGENO.**
- * **EXPLORAR EL USO DE MEDICIONES DE POTENCIAL REDOX COMO SENSOR AUXILIAR EN LAS ESTRATEGIAS DE ADICION DE NUTRIENTES CON EL FIN DE DISTINGUIR ENTRE EVENTOS CELULARES REALES Y EVENTUALIDADES OPERACIONALES.**

CAPITULO IV MATERIALES Y METODOS

4.1 LINEA CELULAR

Para este estudio se utilizó un hibridoma murino generado con anterioridad y denominado BCF2, el cual secreta un AcM neutralizante y específico a la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann⁶³. Esta línea fue generada por medio de la fusión de células de bazo con una subclona del mieloma SP2/0-Ag14 de ratón. Las células de bazo provinieron de un ratón inmunizado (hembra Balb/c) con la fracción II-9.2 del veneno acoplada con tiroglobulina. Los hibridomas fueron clonados y seleccionados *in situ* al platearlos sobre una capa alimentadora que consiste de macrófagos peritoneales de ratón⁶³. El veneno de la especie de alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann se obtuvo por estimulación eléctrica de los animales vivos y las diversas toxinas del veneno fueron purificadas por técnicas cromatográficas. El AcM obtenido inhibe la unión de la toxina con membranas sinaptosomales de cerebro de ratón y muestra una clara actividad neutralizante *in vivo*.

4.2 MEDIO DE CULTIVO

Como medio de cultivo básico se utilizó el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma D-5030; en el apéndice A se muestra la composición de este medio). Se prepara disolviéndolo con agua destilada, desionizada y estéril y suplementándolo con bicarbonato de sodio (2.2 g/l), ácido oxalacético (13.2 mg/l), insulina cristalina (0.8 mg/l), piruvato de sodio (5.5 mg/l), solución 100X de aminoácidos no-esenciales (1% v/v; Sigma M-7145; en el apéndice A se muestra la composición de esta solución), rojo de fenol (15.9 mg/l, como indicador de pH), solución antibiótica/antimicótica [penicilina (100,000 U/l), estreptomycin (100 mg/l), amfotericina B (250 µg/l; Sigma A-9909)], y suero fetal bovino (SFB) a una concentración final de 10% v/v. Todo el suero utilizado fue del mismo lote para así evitar variaciones en la composición (10% v/v, Sigma F-2449). Además, se le adicionó glucosa y glutamina a concentraciones variables, según los requerimientos de cada experimento. La formulación convencional del medio DMEM contiene 4 g/l de glucosa y 4 mM de glutamina. Cabe mencionar que el SFB contiene, entre otros componentes, glucosa (0.8 g/l) y lactato (1.5 g/l). El medio se esteriliza por filtración (membranas Millipore, 0.22 µm) y se conserva a 4°C por tiempos no mayores a un mes.

El agua utilizada debe ser, además de desionizada o bidestilada, de procesado reciente para evitar contaminación con endotoxinas. Algunos de los reactivos que se suplementan son de vida media breve en solución y por lo mismo se conservan en congelación. Después de un mes de preparado el medio, éste es desechado y se prepara nuevamente medio fresco.

4.3 CONGELACION DE CELULAS

Suspensiones con alrededor de un millón de células fueron centrifugadas a 600-700 rpm durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió con medio de congelación (constituido por DMEM con 20% de SFB y 10% de dimetilsulfóxido v/v) para dar una concentración final de aproximadamente 20×10^6 células/ml. Esta suspensión fue distribuida en viales de congelación estériles (1-1.5 ml), los cuales fueron conservados a -70°C durante un día y almacenados posteriormente en nitrógeno líquido hasta su uso.

4.4 INOCULO

Los inóculos, para los cultivos experimentales, parten de viales criopreservados conteniendo células conservadas en medio DMEM convencional y dimetilsulfóxido (10% v/v) como conservador. Los viales se mantienen en nitrógeno líquido y cuando se requiere preparar un inóculo, se descongelan a 37°C y las células son transferidas inmediatamente a un tubo centrífuga cónico. Se adicionan muy lentamente (gota a gota) 10 ml de medio de cultivo DMEM por cada tubo descongelado y se mezcla. Posteriormente se centrifuga la suspensión a 600-700 rpm durante 15 min, y se resuspende el paquete celular (después de desechar el sobrenadante) en 10 ml de medio DMEM. La suspensión celular se coloca en un frasco de cultivo (frasco-T de 25 cm^2 de área superficial) y las células son subcultivadas por lo menos tres veces antes de preparar el inóculo. Los inóculos se preparan cultivando las células en frascos-T de poliestireno (área superficial de 25 y 75 cm^2) y se mantienen en una incubadora de CO_2 a 37°C y 6% de CO_2 . Rutinariamente se toman muestras del sobrenadante de los cultivos y se congelan a -20°C para su posterior análisis (sección 4.8).

4.5 SISTEMA DE CONTROL Y ADQUISICION DE DATOS

La composición porcentual de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono en la corriente gaseosa

de entrada, el oxígeno disuelto, el pH y el potencial redox del cultivo fueron graficados, adquiridos y controlados usando un programa de control escrito por Arturo Aguilar-Aguila Acuña en Microsoft QuickBasic¹. Este programa controla el pH a un valor constante y predeterminado por medio de la variación de la composición de dióxido de carbono y nitrógeno, usando un algoritmo de control proporcional con banda de tolerancia. También controla el oxígeno disuelto a un valor constante y predeterminado por medio de la variación de la composición de oxígeno y nitrógeno, usando un algoritmo de control proporcional. Para nuestro caso, el oxígeno disuelto (OD) se controló a un valor de 50% de saturación con respecto al aire, y el pH se controló a un valor de 7.2 o de 7.3. El flujo de gases se mantuvo constante a 600 ml/min y la composición de los gases se controló a través de tres controladores de flujo másico 5850E (Brooks Instrument, Hatfield, PA). Las señales de los electrodos de pH, potencial redox y oxígeno disuelto (Ingold Electrodes, Wilmington, MA) fueron amplificadas y adquiridas por una computadora Macintosh LC vía una tarjeta MacADIOS 411 (GW Instruments, Somerville, MA) equipada con convertidores Analógicos/Digitales y Digitales/Analógicos, así como con entradas y salidas digitales. En el apéndice B se muestra un diagrama esquemático completo de dicho sistema. El tiempo de adquisición de datos, de control y de cultivo fueron de 300 seg, 1200 seg y 168 h, respectivamente. Estos valores pueden ser modificados, por ejemplo, en la mayoría de los cultivos el tiempo de control se cambió a 480 seg una vez entrada la fase de crecimiento exponencial. Para el control proporcional del OD se usó una constante de proporcionalidad (ganancia) de 2%, y para el control del pH se usó una ganancia de 1000 y una banda de tolerancia de 0.05. Los cultivos agitados fueron iniciados con la siguiente composición de gases a la entrada: 74.26% de nitrógeno, 19.74% de oxígeno y 6% de dióxido de carbono.

4.6 CULTIVOS ESTATICOS POR LOTE

Todos los cultivos estáticos se realizaron en frascos-T de 75 cm² (excepto donde se indica) y se mantuvieron en una incubadora de CO₂ (37°C, 6% CO₂). Estos cultivos partieron de inóculos preparados según la descripción de la sección 4.4. La densidad celular de los distintos cultivos fue monitoreada a diario. Asimismo, se tomaron muestras de cultivo que fueron guardadas a -20°C para su posterior análisis.

Se realizaron cultivos con medio DMEM de formulación convencional (4 mM GLN, 4 g/l GLC, 10% v/v SFB), con medio que contenía sólo la cuarta parte de GLN (1 mM) y con medio que contenía sólo la décima parte de GLC (0.4 g/l). Se iniciaron los cultivos con una suspensión que contenía entre 0.15×10^6 y 0.2×10^6 células viables/ml. Se siguieron los cultivos hasta que la viabilidad decreció notablemente, tomando aproximadamente tres muestras diarias.

4.7 CULTIVOS EN BIOREACTOR

Los cultivos en bioreactor partieron de inóculos preparados a partir de células, cultivadas en frascos-T, que se encontraban en la fase exponencial media. Los inóculos se prepararon centrifugando y resuspendiendo las células en un volumen de medio adecuado para que el bioreactor se iniciara a una concentración celular aproximada de 0.2×10^6 células viables/ml; ésto con la finalidad de evitar variaciones debidas al tamaño del inóculo. El medio utilizado para resuspender las células tenía la misma composición que el utilizado para iniciar los distintos experimentos. Todos los cultivos se siguieron hasta que la viabilidad había decrecido notablemente.

Los cultivos se realizaron en un bioreactor Virtis de un litro con un volumen de trabajo de 700 ml y equipado con una barra magnética (impulsor), suspendida a una quinta parte de la altura del líquido. Los bioreactores fueron operados a 37°C, a una velocidad de agitación de 150 rpm y con aireación superficial. La aireación fué a través del cabezal del bioreactor y con una mezcla de gases (oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono) a un flujo constante de 0.6 l/min. El oxígeno disuelto se midió *in situ* y se mantuvo constante a 50%, con respecto a la saturación con aire, mediante el control automático de los flujos individuales de oxígeno y nitrógeno. El pH se midió y controló automáticamente a un valor constante al variar el flujo de CO₂.

4.7.1 *Cultivos con exceso de glutamina y glucosa, bajo limitación de glutamina, y bajo limitación de glucosa.*

Se realizaron cultivos con medio DMEM de formulación convencional (4 mM GLN, 4 g/l GLC, 10% v/v SFB), con medio que contenía sólo la cuarta parte de GLN (1 mM), y con medio que contenía sólo 0.1 g/l de GLC, a diferencia de 4 g/l de la formulación convencional. Los cultivos se iniciaron con una suspensión que contenía entre 0.15×10^6 y 0.2×10^6 células viables/ml, y se tomaron aproximadamente tres muestras diarias.

4.7.2 *Cultivo suplementado selectivamente con glutamina*

Se realizó un cultivo con medio DMEM (4 g/l GLC, 10% v/v SFB) con una concentración inicial de GLN de 0.5 mM. Este cultivo inició con una suspensión celular un poco más alta que la de los demás, de alrededor de 0.35×10^6 células viables/ml. Las muestras tomadas fueron tres diarias y/o cada vez que se adicionó GLN. Durante los primeros tres días de cultivo, cada vez que se observó un descenso en la presión parcial de oxígeno, se dió un pulso manual de GLN con el fin de elevar la

concentración a alrededor de 0.2 mM. A partir del tercer día se alimentó GLN en forma continua (a través de una bomba peristáltica) siguiendo un perfil más o menos exponencial. La GLN suplementada fue preparada disolviendo GLN en agua para tener una solución saturada (200 mM) con la que no se obtuvieran variaciones de volumen. Esta solución se esterilizó por filtración (membranas Millipore, 0.22 μ m). Se midió GLC fuera de línea y esporádicamente para asegurar su suministro (no hubo necesidad de adicionarla). Cerca del final del cultivo, el pH fue controlado mediante la adición manual de NaOH 0.2 N. También se adicionaron 7 ml de medio de cultivo (como precaución) para garantizar que ningún otro nutriente estuviera limitando el crecimiento.

4.7.3 *Cultivo suplementado selectivamente con glucosa*

Se realizó un cultivo con medio DMEM (4 mM GLN, 10% v/v SFB) con una concentración inicial de GLC de 0.05 g/l. En este cultivo también se tomaron tres muestras diarias y/o cada vez que se adicionó nutriente. Se dieron pulsos manuales de GLC cada vez que se observó un descenso en la presión parcial de oxígeno. Esporádicamente se suplementó GLN en exceso para asegurar su suministro. La GLC y GLN suplementadas fueron preparadas disolviendo GLC o GLN en agua para tener una solución saturada (30 g/l y 200 mM, respectivamente) con la que no se obtuvieran variaciones de volumen. Estas soluciones fueron esterilizadas por filtración (membranas Millipore, 0.22 μ m). Cerca del final del cultivo, el pH fue controlado mediante la adición manual de NaOH 0.2 N. También se adicionaron 7 ml de medio de cultivo (como precaución) para garantizar que ningún otro nutriente estuviera limitando el crecimiento.

4.7.4 *Otros cultivos*

Se realizó un cultivo (0.15×10^6 células viables/ml) en el que se dieron pulsos de oxígeno y de rotenona (5 μ M; agente inhibidor de la cadena de transporte de electrones). Se hizo un duplicado de este experimento (0.8×10^6 células viables/ml), en el que además se dieron pulsos de GLN ya que la densidad celular y viabilidad eran mayores que en el primer caso. Se realizó otro cultivo (0.7×10^6 células viables/ml) en el que se dieron pulsos de oxígeno y de 2,4-dinitrofenol (2 mM; desacoplador respiratorio). En éste también se inyectó GLN para prever su agotamiento. Los pulsos de oxígeno se dieron mediante un aumento seguido de una disminución en la composición de oxígeno de la mezcla de gases a la entrada. Estos cultivos se realizaron con el objeto de inhibir la respiración y para ver su efecto sobre el perfil del potencial redox del cultivo. La rotenona y el 2,4-dinitrofenol fueron disueltos en 1 ml de dimetilsulfóxido. Se tomaron aproximadamente tres muestras diarias y/o cada que se efectuaba un pulso.

Se realizó otro experimento en bioreactor en donde se dieron pulsos de lactato, amonio y agua con el fin de indagar si existe algún efecto de estos componentes sobre el potencial redox del cultivo. Cada uno de éstos se adicionó a medio de cultivo estéril (sin células) en forma de pulsos o en forma intermitente mediante una bomba peristáltica. Primero se adicionó el LAC. Se dieron 6 pulsos de 0.6 ml durante las primeras 8 horas. Durante las siguientes 12 horas se suministró un flujo de 0.5 ml/h y luego de 0.7 ml/h durante las siguientes 28 horas. Para esta etapa experimental se utilizó una solución acuosa de LAC a 63.4 g/l que fué esterilizada por filtración (membranas Millipore, 0.22 μm). Posteriormente, se ajustó el pH con NaOH 0.2 N y se prosiguió con la adición de cloruro de amonio (0.1 M, acuoso y esterilizado por filtración) a un flujo de 0.5 ml/h durante las siguientes 48 horas. Por último, se adicionó agua esterilizada (por autoclave) a 2 ml/h durante las siguientes 6 horas, a partir de donde se aumentó el flujo a 4 ml/h durante las siguientes 13 horas y a un flujo de 27 ml/h durante las últimas 3 horas. Se tomaron aproximadamente tres muestras diarias y/o cada que se efectuaba un cambio de flujo.

4.8 METODOS ANALITICOS

4.8.1 *Determinación de la concentración celular*

La concentración celular fué determinada usando un hemacitómetro y un microscopio Fisher Micromaster a 10X. Las células vivas son distinguidas de las muertas por el método de exclusión de azul de tripano⁴¹ (las células muertas se tiñen de azul) y la viabilidad es determinada como el porcentaje de las células vivas del total.

4.8.2 *Determinación de glucosa y lactato*

Las concentraciones de glucosa y lactato fueron determinadas enzimáticamente en un analizador YSI modelo 2700 (Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, OH). Este analizador utiliza membranas con enzimas inmovilizadas: glucosa oxidasa para determinar glucosa y L-lactato oxidasa para la determinación de lactato. La enzima cataliza la reacción entre la muestra a determinar y el oxígeno, formando un derivado y peróxido de hidrógeno. La sonda del sensor contiene un sistema de electrodos amperométricos que responden ante la presencia del peróxido de hidrógeno. El flujo de corriente en el circuito del ánodo de platino es linealmente proporcional a la concentración de glucosa y de lactato.

4.8.3 *Determinación de amonio, glutamina y otros aminoácidos*

Las concentraciones de amonio y glutamina, así como la de otros aminoácidos, fueron determinadas en un Analizador de Aminoácidos Beckman⁵³. El método utilizado es un método de columna sencilla (10 cm High Performance Column for Lithium Buffer Methods No. 338051, Beckman), que utiliza cuatro buffers de litio, ninhidrina y un regenerante de hidróxido de litio y que analiza los componentes ninhidrina-positivos de fluidos fisiológicos. Este método es una cromatografía de líquidos por intercambio iónico, donde los componentes eluyen de acuerdo a su carga y al buffer de litio utilizado para su elución. La tabla 1 muestra los parámetros del Sistema Beckman para columnas de 0.4 x 10 cm y los buffers de Li-A, B, C.

Antes de colocar las muestras en el analizador, éstas son desproteinizadas con ácido 5-sulfosalicílico mediante el siguiente protocolo:

- 1.- Al tomar la muestra destinada para el análisis de aminoácidos se agregan 6µl de HCl 2N por ml de muestra. Esto con el fin de asegurar un pH bajo en el que no se desorba el amonio.
- 2.- Se colocan en un "Eppendorf" (2 ml) 80 µl de muestra a temperatura ambiente (TA) y se agregan 180 µl de ácido 5-sulfosalicílico al 35% para precipitar la proteína.
- 3.- Se mezcla por vórtex durante 5 segundos y se deja reposar a TA 5 min.
- 4.- Se adicionan 140 µl de hidróxido de litio 0.5 M a la mezcla, para neutralizarla, y se mezcla por vórtex durante 5 segundos.
- 5.- Se centrifuga a 4,000 rpm durante 15 min y se pasa el sobrenadante a un tubo "Eppendorf" limpio. La muestra puede guardarse durante 48 horas a -70°C para su posterior análisis. Se repite este paso las veces que sea necesario para obtener un sobrenadante perfectamente claro.
- 6.- Se toman 100 µl del preparado y se colocan en un tubo "Eppendorf" limpio.
- 7.- Se adicionan 100 µl de buffer Li-S de Beckman que contenga un control interno (i.e., ácido L-α aminoácido) y se mezcla por vórtex.
- 8.- Se inyectan 50 µl al analizador de aminoácidos Beckman. Los componentes inyectados deben tener una concentración entre 0.1 y 0.2 µmol/ml, sobretodo los estándares y controles internos.
- 9.- Finalmente, se determinan las concentraciones de aminoácidos y amonio en base a las curvas de patrón (determinadas con anterioridad) y considerando las diluciones realizadas. Estas curvas se obtienen al inyectar soluciones que contienen diferentes concentraciones de los componentes que se desean cuantificar. Dichas soluciones se preparan en buffer Li-S y contienen un control interno (i.e., ácido L-α-aminoácido) como indicador de variaciones en el volumen de inyección. Las áreas resultantes se relacionan con las concentraciones conocidas y se obtiene una regresión lineal para cada componente. Con estas regresiones se determinan cuantitativamente los

Tabla 1. Parámetros del Sistema Beckman (Columna 0.4 x 10 cm; Buffer Li-A,B,C).

	PARAMETRO*	VALOR
Buffer Li-A	b1 min	116.0
Buffer Li-B	b2 min	39.5
Buffer Li-C	b3 min	62.0
Buffer regenerante de Li	b6 min	115.0
Tiempo	t1 min	115.0
Temperatura	t1 °C	33.5
Tiempo	t2 min	13.0
Temperatura	t2 °C	60.0
Tiempo	t3 min	55.0
Temperatura	t3 °C	77.0
Ninhidrina	rG min	118
Agua	So min	115.0
Reinicio ciclo e inyección	rC min	130.0
Velocidad de flujo de buffer	FL ml/h	20.0
Gradiente de temperatura	rG °C/min	1.2

- * Las abreviaturas corresponden al procedimiento descrito en el Método Beckman⁵³ y se refieren a los distintos parámetros (i.e., tiempos, flujos y temperaturas) que se deben programar en el analizador.

diferentes componentes de cada muestra. Estas curvas y regresiones se muestran en el apéndice C.

4.8.4 Determinación de anticuerpo monoclonal

El método de detección de AcM debe ser acorde a la actividad del mismo. El parámetro de capacidad de unión antigénica es conveniente para identificar los cultivos productores de AcM específicos⁵. Sin embargo, en algunos casos se requieren ensayos de detección basados en la actividad biológica del antígeno. Para determinar la capacidad de unión antigénica, el método más adecuado es el ensayo inmunoenzimático, mejor conocido como ELISA⁵. Este procedimiento es accesible, sencillo, sensible y rápido. Además, permite analizar simultáneamente un gran número de muestras, identificando algunas reactividades positivas entre una mayoría de cultivos que producen Ig irrelevantes. Esta prueba permite utilizar antígenos puros e impuros para registrar la presencia de inmunorreactividades.

Las concentraciones de AcM fueron determinadas por la técnica "ELISA"⁴⁵ que se describe a continuación:

1.- Colocar 100 µl de anticuerpo de borrego anti-ratón [Affinipure sheep anti-mouse IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Labs., Inc.], a cada pozo y dejar de 16 a 18 horas incubando a 4°C. El AcM se prepara a 0.02 mg/ml con PBS. En este paso se adhiere el AcM al fondo del pozo. El PBS (buffer de fosfatos) se prepara disolviendo en un litro de agua destilada los siguientes reactivos: 8.75 g de NaCl, 2.25 g de Na₂HPO₄, 0.2 g de KH₂PO₄, y 0.2 g de KCl.

2.- Lavar cada pozo 2 veces con 150 µl de PBS+tween. El PBS+tween se prepara disolviendo 0.5 ml de Tween 20 en un litro de PBS.

3.- Colocar 125 µl de BSA (albúmina de suero bovino) a cada pozo y dejar incubando 2 horas a TA. Con este paso se bloquean los sitios reactivos remanentes. El BSA se prepara disolviendo 10 mg de BSA por ml de PBS.

4.- Repetir el paso 2.

5.- Colocar 100 µl de PBS en la primera hilera (blanco A) y 100 µl de solución estándar en las siguientes dos hileras (controles internos B y C). Como estándar se usó anticuerpo de ratón anti-rata [Affinipure mouse anti-rat IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Labs., Inc.], preparados con PBS a 21 y 42 ng/ml, respectivamente. En las hileras restantes (D a H), colocar 100 µl de la muestra a determinar (en cada pozo y por hilera) y diluirla con PBS para dar una concentración por debajo de 100 ng/ml de AcM (de preferencia entre 21 y 42 ng/ml), que es el rango lineal de la curva patrón [AcM] contra absorbancia (ver apéndice D). La curva patrón se determinó colocando diversas concentraciones de estándar en las diferentes hileras (B a H). En este paso se une el primer

ligando específico al AcM del paso 1. Se deja incubar a TA durante 2 horas.

6.- Repetir el paso 2, pero 3 veces en lugar de 2.

7.- Colocar en cada pozo 100 μ l de anticuerpo de borrego anti-ratón conjugado con alcalino fosfatasa [Alkaline phosphatase-conjugated Affinipure sheep anti-mouse IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Labs., Inc.] y dejar incubando a TA durante 2 horas. Este AcM se prepara a 0.6 μ g/ml con PBS. En este paso se une el ligando detector al ligando anterior.

8.- Repetir el paso 6.

9.- Colocar en cada pozo 100 μ l de PNPP (paranitrofenol fosfato, Sigma 104 Phosphatase Substrate) y a los 20 min exactos agregar 100 μ l de NaOH 2 N. En este paso se revela la actividad enzimática, la cual se percibe por la coloración amarilla generada en este paso. El PNPP se prepara disolviendo 24 mg de PNPP en un litro de dietanolamina (DEA), la cual se prepara disolviendo 10 ml de DEA, 0.2 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y 0.29 g de NaN_3 en 890 ml de agua destilada; se ajusta el pH a 9.8 con HCl y se afora a un litro.

10.- Leer absorbancia a 405 nm y determinar las concentraciones de AcM, considerando las diluciones realizadas.

Los platos de ELISA (96 pozos, Nunc-Immunoplate) fueron leídos con un lector Titertek Multiscan MCC/340 (Flow Laboratories, McLean, VA) y las concentraciones de AcM reportadas fueron obtenidas de por lo menos un promedio de 12 pozos.

4.9 CONSIDERACIONES MATEMATICAS

4.9.1 *Determinación de la velocidad específica de crecimiento, rendimientos, coeficientes metabólicos y productividades en cultivos estáticos y agitados por lotes o suplementados.*

La velocidad específica de crecimiento aparente (μ) es una tasa de crecimiento observada. Es decir, es el resultado de restarle a la tasa de crecimiento real la tasa de muerte. La μ fué determinada para la fase de crecimiento exponencial, donde:

$$dx/dt = \mu x \quad (2)$$

Al integrar la ecuación (2) se obtiene la siguiente ecuación:

$$\ln(x/x_0) = \mu t \quad (3)$$

donde x y x_0 son la concentración celular viable al tiempo t y al inicio de la fase exponencial de crecimiento, respectivamente. Una gráfica del $\ln(x/x_0)$ contra el tiempo nos genera una regresión lineal donde la pendiente es μ .

Los rendimientos de LAC/GLC, GLC/ x y LAC/ x fueron determinados mediante la pendiente de una regresión lineal en gráficas de LAC contra GLC, GLC contra x , y LAC contra x , respectivamente. Los coeficientes metabólicos (q_i) fueron determinados mediante la siguiente ecuación:

$$q_i = \mu Y_{i/x} \quad (4)$$

donde $Y_{i/x}$ es el rendimiento del sustrato o producto "i" sobre biomasa. Para el caso del cultivo suplementado selectivamente con GLC, los rendimientos de GLC fueron determinados considerando la GLC consumida en vez de la residual.

El AcM total producido (ΔAcM) y la velocidad volumétrica global de producción de AcM (r_{AcM}) fueron determinadas a partir de las ecuaciones 5 y 6, respectivamente.

$$\Delta\text{AcM} = \text{AcM}_f V_f - \text{AcM}_0 V_0 \quad (5)$$

$$r_{\text{AcM}} = \frac{\Delta\text{AcM}}{(t_f - t_0) V_f} \quad (6)$$

La velocidad específica de producción de AcM (q_{AcM}) fué determinada mediante la pendiente de la regresión lineal generada de la gráfica de la concentración de AcM contra el índice de viabilidad. El índice de viabilidad ($\int x dt$) se determinó como el área bajo la curva de concentración de células viables contra tiempo, por el método integral de los trapecios.

4.9.2 Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno en cultivos agitados

Haciendo un balance de oxígeno alrededor de la fase líquida del bioreactor se tiene:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a [C^* - C_L] - VCO \quad (7)$$

donde C_L y C^* son la concentración de oxígeno en medio y a la saturación, respectivamente. VCO es la velocidad de consumo de oxígeno, $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y t es el tiempo. El valor de C_L está dado por un electrodo de oxígeno disuelto sumergido en el cultivo.

Lavery y Nienow²⁵ mostraron que los valores de k_{La} son similares entre cultivos de células animales con diferentes composiciones de medio de cultivo, pero operados a las mismas condiciones de aireación y agitación. Por ejemplo, ellos encontraron una diferencia menor al 5% para distintos flujos (i.e., agua, medio de cultivo con y sin suero) que fueron aireados superficialmente y agitados a 350 rpm. Por lo mismo, se puede decir que el coeficiente k_{La} es una constante ya que la composición fisicoquímica del medio cambia muy poco durante el cultivo de células animales. El coeficiente k_{La} , determinado por el Método de Tiempo de Respuesta²⁵, fué de 1.05 h^{-1} . Este valor es exclusivo para las condiciones de operación del sistema de cultivo utilizado en este trabajo. El Método de Tiempo de Respuesta consiste en desorber completamente el oxígeno del fluido (agua) contenido en el bioreactor (a las condiciones de cultivo) con nitrógeno y súbitamente cerrar el nitrógeno y abrir el aire (cambio escalonado). El tiempo que toma la concentración de oxígeno disuelto en subir de 0% a 63.2% (con respecto a la saturación con aire) es la constante de tiempo del sistema, y el inverso de este valor corresponde al coeficiente k_{La} .

De la ecuación (7) se desconocen VCO y C^* , siendo VCO la variable dependiente que deseamos determinar. Para conocer C^* , que representa la concentración de oxígeno en equilibrio con la fase gaseosa, se consideró que las concentraciones de oxígeno a la entrada, a la salida y en la fase gaseosa del bioreactor son aproximadamente iguales. Esta consideración se hizo suponiendo primero, que la fase gaseosa está bien mezclada. Por lo mismo, las concentraciones de oxígeno en la fase gaseosa y a la salida son iguales. Segundo, se asumió que el consumo de oxígeno es muy pequeño y que por lo mismo los flujos de gases a la entrada y a la salida son aproximadamente iguales, al igual que las concentraciones de oxígeno a la entrada y en la fase gaseosa del bioreactor. Las suposiciones de la segunda consideración son válidas ya que tomando el caso extremo (máximo de q_{O_2} para células animales típicas, máxima concentración celular, y valor más bajo utilizado para el flujo de oxígeno a la entrada) y considerando que el oxígeno es un gas ideal, la diferencia entre las concentraciones de oxígeno a la entrada, a la salida y en la fase gaseosa sería de menos del 0.5%. Es importante notar, que es difícil determinar experimentalmente la concentración de oxígeno en la fase gaseosa y que con estas consideraciones es posible determinar C^* de acuerdo con las ecuaciones (9) y (10).

Integrando la ecuación (7) se obtiene la ecuación, en forma discretizada, con la que se puede determinar la velocidad de consumo de oxígeno en-línea:

$$VCO = \frac{k_{La}}{2} \{ (C_i^* + C_{i+1}^*) - (C_{Li} + C_{Li+1}) \} - \frac{C_{Li+1} - C_{Li}}{t_{i+1} - t_i} \quad (8)$$

donde i es el elemento de discretización. Conociendo el valor de la presión parcial de oxígeno (p_{O_2}) a

la entrada del bioreactor, la concentración molar del agua (C_{H_2O}) y la constante de Henry (H) se puede determinar C_i^* de la siguiente manera:

$$C_i^* = \frac{C_{H_2O} P_{O_2}}{H} \quad (9)$$

y

$$P_{O_2} = P_T y_{O_2} \quad (10)$$

donde y_{O_2} es la fracción mol de O_2 y P_T la presión total. Además, la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) puede ser determinada mediante la siguiente ecuación:

$$q_{O_2} = VCO / x \quad (11)$$

4.9.3 Corrección y cálculo del potencial redox en cultivos agitados

El potencial redox del cultivo, PRC, se corrigió por cambios de pH (a oxígeno disuelto constante) mediante la siguiente ecuación²⁰:

$$PRC_e = PRC_i - 61.6 (\Delta pH) \quad (12)$$

donde los subíndices "e" e "i" se refieren al PRC corregido y medido, respectivamente. El coeficiente 61.6 mV corresponde al potencial de Nernst (E_N) a 37°C; es decir, $E_N = RT/f$ donde R es la constante de los gases ideales, T la temperatura absoluta y f la constante de Faraday. Para estimar el efecto que el oxígeno disuelto (OD) debería tener sobre el PRC (a pH constante), se utilizó la siguiente ecuación⁷:

$$PRC_e = PRC_o + 0.5 (\Delta OD) \quad (13)$$

donde los subíndices "e" y "o" se refieren al PRC estimado e inicial, respectivamente. El coeficiente 0.5 mV/% corresponde a la pendiente de la regresión lineal de gráficas de OD (término independiente) contra PRC (término dependiente). Los datos fueron tomados de varios experimentos (como los descritos en la sección de Resultados y Discusión) donde se dieron pulsos de oxígeno, es decir, donde se generaron oscilaciones de OD y PRC. Alternativamente, el efecto del OD sobre el PRC también puede ser determinado por la siguiente ecuación²³:

$$PRC_e = a \ln(OD) + b \quad (14)$$

donde a y b son constantes de una regresión lineal (pendiente y ordenada, respectivamente).

CAPITULO V RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 CARACTERIZACION DE LA LINEA BCF2

La línea de hibridomas BCF2, productora de anticuerpos monoclonales específicos para la toxina de alacrán, no había sido propagada anteriormente en cultivo *in vitro*. Por lo tanto, un requisito preliminar para los objetivos de este trabajo fué la caracterización del comportamiento de la línea celular en cultivo *in vitro*. Esto es, la determinación de cinéticas de crecimiento, de consumo de nutrientes, de secreción de desechos metabólicos y de producción de anticuerpo monoclonal. Se determinó el comportamiento de la línea celular en cultivo estático (frasco-T) y en cultivo agitado (bioreactor por lotes).

Durante la implementación de los cultivos *in vitro*, se vió que era necesario subcultivar (resembrar) los hibridomas en cultivo estático por lo menos tres veces después de ser descongeladas las células. Esto con el fin de obtener cultivos estables, es decir, cultivos cuyas cinéticas fueran reproducibles. Adicionalmente, debe notarse que en todos los casos analizados (*i.e.*, figuras 2-6, 10, 15 y 19) se apreció que el AcM se acumula durante todas las fases de crecimiento, inclusive durante las fases estacionaria y de muerte. Esto está de acuerdo con las observaciones de otros investigadores que han cultivado hibridomas *in vitro*^{3,8,26,31,38,39,40,44,48,49}.

5.1.1 Cultivos estáticos por lote

5.1.1.1 Cultivo con exceso de glutamina y glucosa

Para conocer el comportamiento de la línea de hibridomas BCF2, se realizaron cultivos estáticos (frascos-T de 75-cm²) en medio de cultivo con la formulación convencional (4 mM de glutamina, 4 g/l de glucosa adicionada). La figura 2 muestra el comportamiento cinético de esta línea celular. Se observó una fase de crecimiento lag inicial, seguida por una fase de crecimiento exponencial donde se alcanzó una densidad celular máxima de 1.3×10^6 células viables/ml (X_{max}).

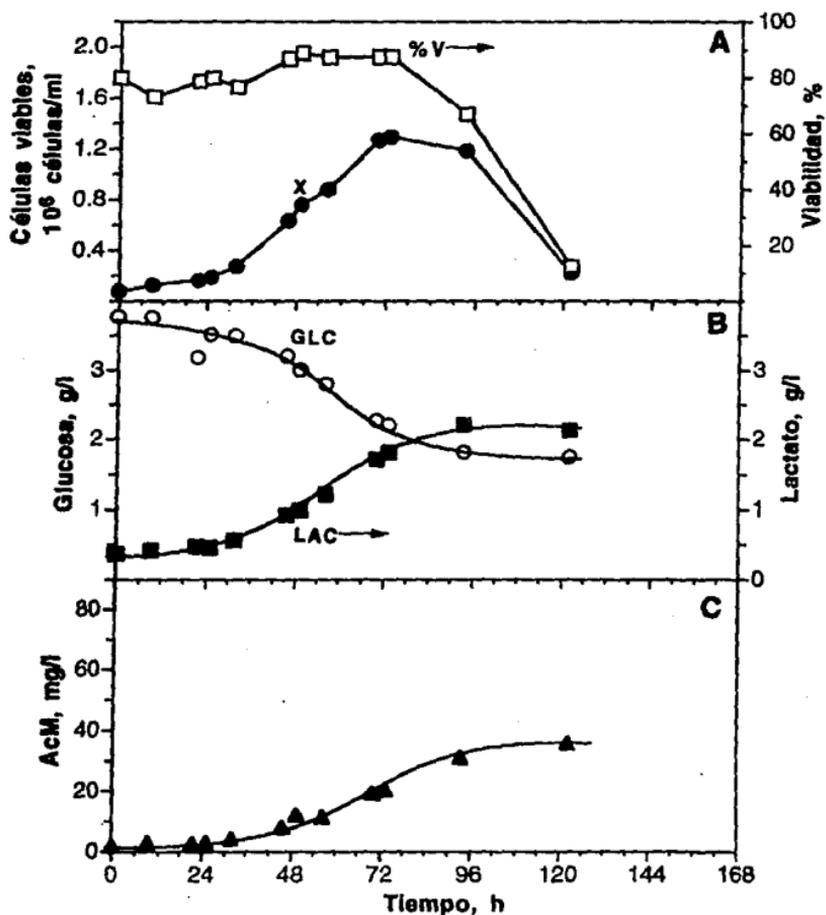


Figura 2. Cultivo estático por lote con exceso de glutamina y glucosa (4 mM GLN, 4 g/l GLC).

figura 2A). Después de alcanzar la X_{max} , se observó un rápido decremento en la viabilidad. La velocidad específica de crecimiento (μ) fué de 0.046 h^{-1} . Varios investigadores^{11,31,33,47} han mostrado que la GLC y la GLN son la principal fuente de carbono y de energía, respectivamente, en la mayoría de los medios de cultivo y que ambos nutrientes son requeridos para el crecimiento. Debido a que la GLC (figura 2B) y la GLN (observación cualitativa de los cromatogramas, sin cuantificar áreas) aún estaban presentes en concentraciones no-limitantes, el descenso en la concentración de células viables y en la viabilidad no se puede atribuir a la limitación por alguno de estos dos nutrientes. Sin embargo, éste descenso puede ser debido a las altas concentraciones de productos de desecho que son tóxicos, tales como el lactato (LAC, figura 2B) y el amonio (AMM), como lo propone Miller *et al.*³³.

Como se muestra en la figura 2B, el consumo de GLC y la producción de LAC cesaron una vez entrada la fase de muerte (figura 2A). Los coeficientes metabólicos para GLC y LAC (q_G , q_L , respectivamente) fueron de 2.74×10^{-13} y $5.63 \times 10^{-13} \text{ mol/célula-h}$, respectivamente. El rendimiento aparente de LAC/GLC ($Y'_{L/G}$) fué de 2.05 mol/mol , sugiriendo que durante el crecimiento en cultivos por lote, la GLC es convertida casi enteramente en LAC y que poca es catabolizada a través del ciclo de Krebs^{11,33}. Se han reportado rendimientos, tan altos como éste, para cultivos continuos y semicontínuos de otras líneas celulares a μ altas^{31,45}. Por otro lado, la producción de AcM continuó incrementándose hasta el término del cultivo donde se alcanzó una concentración máxima de 36 mg/l (figura 2C). El total de AcM producido (ΔAcM) y las velocidades volumétrica (r_{AcM}) y específica (q_{AcM}) de producción fueron de 1.44 mg , 0.28 mg/l-h , y $0.42 \times 10^{-9} \text{ mg/célula-h}$, respectivamente.

En el apéndice E se muestran algunas cinéticas para otros cultivos (bajo las mismas condiciones de cultivo) cuyos perfiles son similares a los mostrados en la figura 2. El análisis de las cinéticas presentadas en la figura 2 y apéndice E demuestra la reproducibilidad de los resultados mostrados en este trabajo. El intervalo de la μ para estos cultivos es de 0.036 a 0.044 h^{-1} . Los intervalos para q_G , q_L y $Y'_{L/G}$ son de 1.67 - $2.93 \times 10^{-13} \text{ mol/célula-h}$, 3.67 - $5.63 \times 10^{-13} \text{ mol/célula-h}$ y 1.8 - 2.2 mol/mol , respectivamente.

5.1.1.2 Cultivo limitado de glutamina

Con el objeto de estimar el efecto de la concentración inicial de GLN sobre el crecimiento celular, se realizaron cultivos estáticos en los que la concentración inicial de GLN fué de la cuarta parte (1 mM) con respecto al cultivo con exceso de GLN y GLC (*i.e.*, figura 2). La figura 3 muestra los perfiles de crecimiento, viabilidad, consumo de GLC, secreción de LAC y producción de AcM para uno de estos cultivos y para el cultivo mostrado en la figura 2 (los datos de figura 2 están

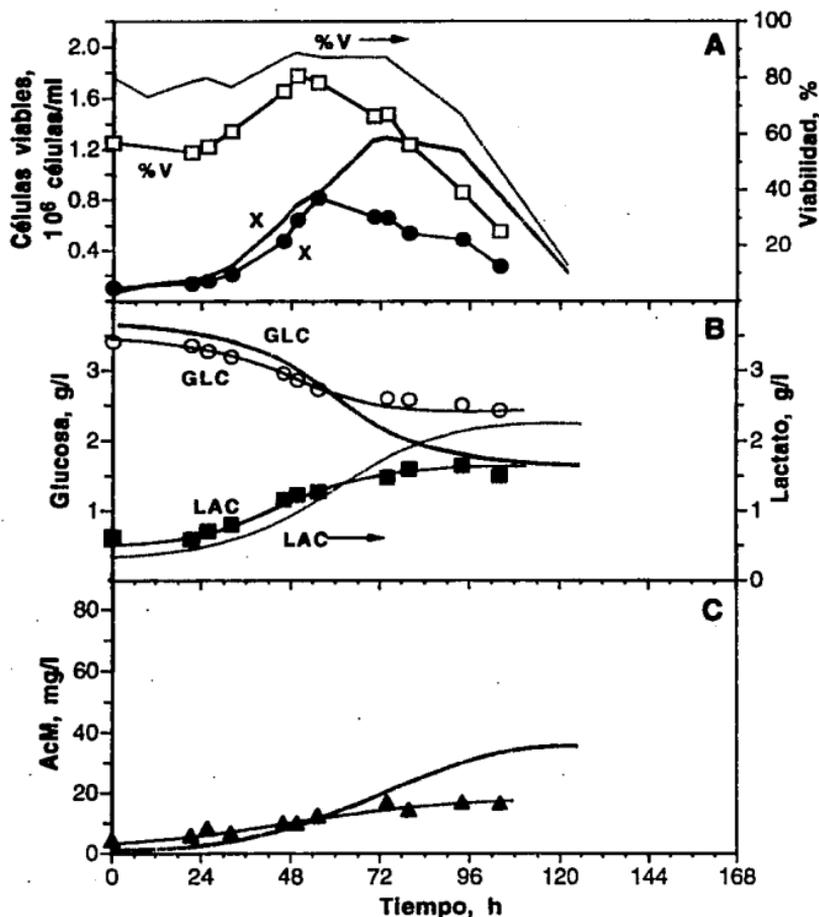


Figura 3. Cultivo estático por lote bajo limitación de glutamina (1 mM GLN, 4 g/l GLC). Las curvas punteadas corresponden a los datos del cultivo estático con exceso de GLN y GLC (mostrado en la figura 2).

representados por las líneas punteadas). Otro cultivo, realizado bajo las mismas condiciones de limitación de GLN, generó perfiles similares (apéndice F). Para los cultivos limitados de GLN, se observó una fase de crecimiento lag inicial, seguida por una fase de crecimiento exponencial donde se alcanzó una densidad celular máxima de 0.8×10^6 células viables/ml. Después de alcanzar la X_{\max} , la viabilidad sufrió un rápido decremento. Se observó que la X_{\max} alcanzada y la duración de las fases exponencial y estacionaria fueron menores cuando la concentración inicial de GLN en el medio fue de 1mM en lugar de 4mM (figura 3A y apéndice F). De estas observaciones se pudo inferir que cuando se usa medio con una concentración inicial de 1mM de GLN, ocurre limitación por dicho sustrato después de transcurrido cierto tiempo de cultivo.

La figura 3B muestra como la GLC estuvo presente en concentraciones no-limitantes a lo largo de todo el cultivo. Por lo mismo, el descenso en la concentración de células viables y en la viabilidad no se pudo atribuir a la limitación de GLC. Aunque en estos cultivos no se determinó la concentración de GLN, se puede concluir que (como se verá más adelante) el descenso en la viabilidad fue debido a la limitación de GLN, fenómeno observado en cultivos agitados y en los cuales la GLN fue determinada (*i.e.*, ver figura 7 y su discusión más adelante). Además, la disminución en la X_{\max} no puede ser atribuida a concentraciones mayores de productos tóxicos, como el LAC (figura 3B). Como se muestra en la figura 3B, en ambos cultivos, el consumo de GLC y la producción de LAC cesaron unas cuantas horas después de alcanzada la X_{\max} . En cambio, la producción de AcM continuó incrementándose hasta el término del cultivo donde se alcanzó una concentración máxima de 17.2 mg/l, cerca de la mitad a la alcanzada en el cultivo con exceso de GLN y GLC (figura 3C).

En estos cultivos (limitado de GLN; figura 3 y apéndice F), la velocidad específica de crecimiento fue de 0.048-0.055 h^{-1} . Los coeficientes metabólicos para GLC y LAC fueron de $2.69-3.05 \times 10^{-13}$ y 5.81×10^{-13} mol/célula-h, respectivamente. El rendimiento aparente de LAC/GLC ($Y'_{L/G}$) fue de 2.12-2.16 mol/mol, sugiriendo que durante el crecimiento en cultivos por lote bajo limitación de GLN, la GLC es convertida enteramente en LAC y la GLN es catabolizada a través del ciclo de Krebs sufriendo, en parte, una oxidación parcial hacia LAC. Las velocidades volumétrica (r_{AcM}) y específica (q_{AcM}) de producción de AcM fueron de 0.17 mg/l-h, y 0.26×10^{-9} mg/célula-h, respectivamente. Los valores de q_G y $Y'_{L/G}$ fueron similares a los observados en cultivos con exceso de GLN y GLC (ver tabla 2). En cambio, los valores de μ y q_L fueron un poco mayores, mientras que los valores de r_{AcM} y q_{AcM} fueron menores (ver tabla 2).

Tabla 2. Resumen de parámetros cinéticos y estequiométricos para cultivos estáticos por lote

CULTIVO ESTÁTICO		CON EXCESO DE GLN Y GLC	LIMITADO DE GLN	LIMITADO DE GLC
[GLN] inicial *	mM	4	1	4
[GLC] inicial *	g/l	4.0	4.0	0.4
X_{max}	10^6 células/ml	1.1 - 1.3	0.8	0.9
μ	h^{-1}	0.036-0.044	0.048-0.055	0.034
$Y'_{L/G}$	mol/mol	1.8-2.2	2.1-2.2	1.7
q_G	10^{-13} mol/célula-h	1.7-2.9	2.7-3.0	1.0
q_L	10^{-13} mol/célula-h	3.7-5.6	5.8-6.6	1.8
$[AcM]_{max}$	mg/l	36.0	17.2	13.3
r_{AcM}	10^{-9} mg/l-h	0.28	0.17	0.17
q_{AcM}	10^{-9} mg/célula-h	0.42	0.26	0.38

*) [GLN] inicial y [GLC] inicial se refieren a la cantidad de sustrato suplementado al medio DMEM básico (ver sección 4.2).

5.1.1.3 Cultivo limitado de glucosa

Con el objeto de estimar el efecto de la concentración inicial de GLC sobre el crecimiento celular, se realizaron cultivos estáticos en los que la concentración inicial de GLC fue de la décima parte (0.4 g/l de GLC adicionada) con respecto al cultivo con exceso de GLN y GLC (mostrado en la figura 2). La concentración inicial de GLN fue de 4 mM para asegurar que siempre estuviera en exceso. La figura 4 muestra los perfiles de crecimiento, viabilidad, consumo de GLC, secreción de LAC y producción de AcM para este cultivo y para el cultivo mostrado en la figura 2 (los datos de figura 2 están representados por las líneas punteadas). Para el cultivo limitado de GLC, se observó un período de crecimiento exponencial donde se alcanzó una densidad celular máxima de 0.9×10^6 células viables/ml (figura 4A). Se observó que después de alcanzar la X_{max} , la viabilidad sufrió un rápido decremento, al igual que en los cultivos con exceso de GLN y GLC y en los cultivos limitados de GLN. Adicionalmente, se observó que la X_{max} y la duración de las fases exponencial y estacionaria fueron menores cuando la concentración de GLC en el medio fue de 0.4 g/l en lugar de 4 g/l (figura 4A). De estas observaciones se puede inferir que cuando se usa medio con una concentración inicial de 0.4 g/l de GLC, ocurre limitación por dicho sustrato. La figura 4B demuestra que ocurrió limitación de GLC ya que muestra claramente el agotamiento de GLC. Además, dicho agotamiento coincide con el descenso en la concentración de células viables totales y en el porcentaje de viabilidad (figura 4). Este descenso no fue debido a altas concentraciones de metabolitos tóxicos ya que se produjo mucho menos LAC en este cultivo que en el cultivo con exceso de GLN y GLC (figuras 2 y 4B) y que en cultivo limitado de GLN (figura 3B). Como se muestra en la figura 4B y a diferencia de los cultivos con exceso de GLN y GLC (figuras 2 y 4B) y bajo limitación de GLN (figura 3B), la producción de LAC cesó unas horas antes de alcanzada la X_{max} . Por otro lado, la producción de AcM continuó incrementándose hasta el término del cultivo donde se alcanzó una concentración máxima de 13.3 mg/l (figura 4C).

En este cultivo (limitado de GLC), la velocidad específica de crecimiento fue de 0.034 h^{-1} . Los coeficientes metabólicos para GLC y LAC fueron de 1.05×10^{-13} y $1.77 \times 10^{-13} \text{ mol/célula-h}$, respectivamente. Estos tres parámetros cinéticos fueron menores comparados con los dos cultivos anteriores (ver tabla 2). El rendimiento aparente de LAC/GLC fue de 1.69 (también menor comparado con los dos cultivos anteriores; ver tabla 2), sugiriendo que sólo una fracción de la GLC es convertida en LAC y que la mayoría del LAC producido proviene de GLN¹¹. Las velocidades volumétrica (r_{AcM}) y específica (q_{AcM}) de producción de AcM fueron de 0.17 mg/l-h y $0.38 \times 10^{-10} \text{ mg/célula-h}$, respectivamente. La r_{AcM} fue igual que la del cultivo limitado de GLN, pero menor a la del cultivo con exceso de GLN y GLC (ver tabla 2). En cambio, la q_{AcM} fue mayor que la del cultivo limitado de

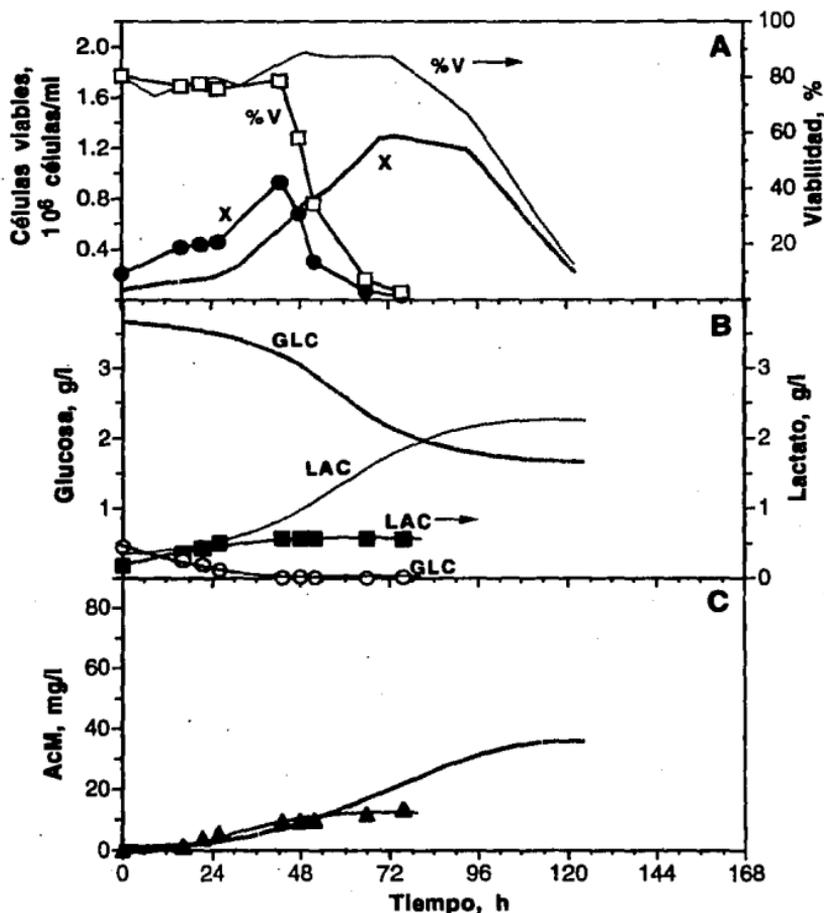


Figura 4. Cultivo estático por lote bajo limitación de glucosa (4 mM GLN, 0.4 g/l GLC). Las curvas punteadas corresponden a los datos del cultivo estático con exceso de GLN y GLC (mostrado en la figura 2).

GLN y ligeramente menor que la del cultivo con exceso de GLN y GLC (ver tabla 2).

La tabla 2 resume los distintos parámetros cinéticos y estequiométricos que fueron determinados para los cultivos estáticos por lote. La densidad celular máxima fué mayor en los cultivos con exceso de GLN y GLC. Este resultado es esperado ya que se ha visto que, en cultivos por lote con altas concentraciones iniciales de GLN (hasta 10mM), la densidad celular aumenta³³ y que la GLN es la principal fuente energética aún cuando la GLC está presente en grandes cantidades^{11,29}. Además, se ha observado que la μ no disminuye en cultivos donde la concentración inicial de GLN es entre 1 y 8 mM^{31,33}. Por lo mismo, no se observó una disminución en la μ de los cultivos limitados de GLN (1 mM GLN) con respecto a los cultivos con exceso de GLN (4mM). Por otro lado, se ha observado que la formación de LAC disminuye notablemente en cultivos limitados de GLC^{11,33} y que la μ sufre también una disminución¹¹. Estas observaciones concuerdan con los resultados mostrados en la tabla 2, donde se observa que tanto la μ como el $Y'_{L/G}$ fueron menores para el cultivo limitado de GLC.

5.1.2 Cultivos agitados de lote

En base a los resultados de la sección 5.1.1, se procedió a la implementación de cultivos agitados bajo condiciones ambientales controladas. Esto con el fin de obtener mayor información y de verificar la reproducibilidad de los resultados en cultivo agitado.

5.1.2.1 Cultivo con exceso de glutamina y glucosa.

Se inició con la caracterización de la línea celular BCF2 en cultivos agitados de un litro en medio de cultivo con formulación convencional (4 mM GLN, 4 g/l GLC adicionada). La figura 5 muestra los perfiles de crecimiento, viabilidad, consumo de GLC, secreción de LAC y producción de AcM para este cultivo y para el cultivo estático homólogo mostrado en la figura 2 (datos representados por las líneas punteadas). Durante el cultivo agitado, se observó una fase de crecimiento lag inicial, seguida por una fase de crecimiento exponencial donde se alcanzó una densidad celular máxima de 1.1×10^6 células viables/ml (X_{max} ; figura 5A). Después de alcanzada la X_{max} , siguió una fase estacionaria, seguida de un rápido decremento en la viabilidad. Al igual que en el cultivo estático y debido a que la GLC (figura 5B) y la GLN (observación cualitativa de los cromatogramas, sin cuantificar áreas) aun estaban presentes en concentraciones no-limitantes, el descenso en la concentración de células viables y en la viabilidad no se pudo atribuir a la limitación por dichos

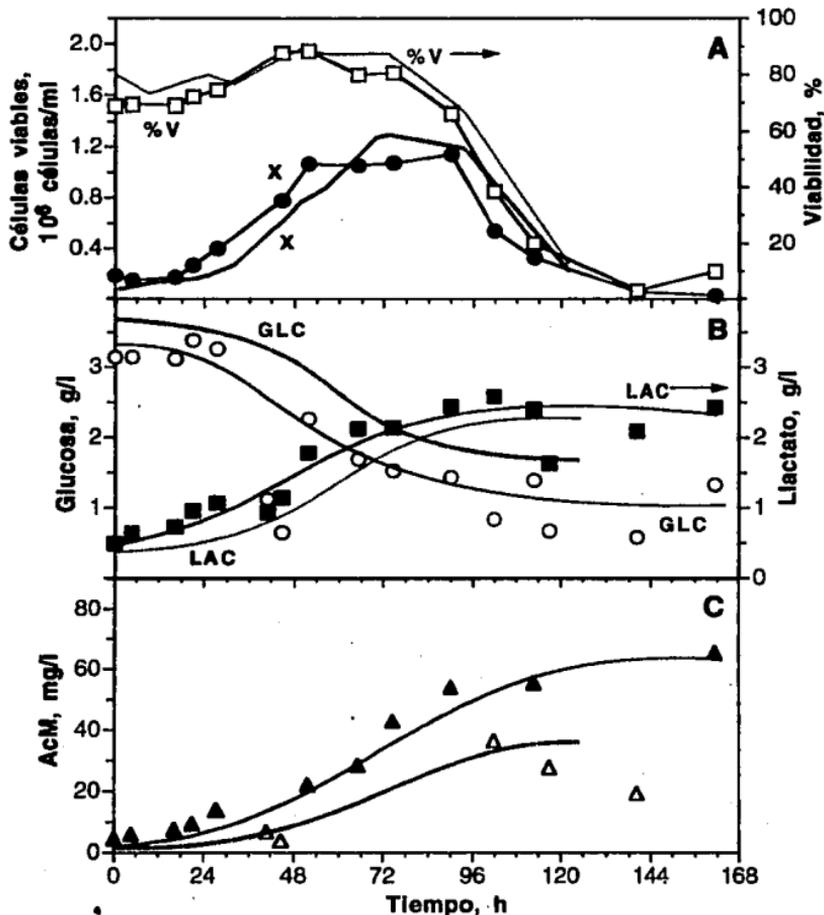


Figura 5. Cultivo agitado por lote con exceso de glutamina y glucosa (4mM GLN, 4 g/l GLC). Los triángulos huecos, mostrados en el panel C, corresponden a muestras posiblemente degradadas. Esto se corrobora al observar que los datos de GLC y LAC, para las mismas muestras, también presentan anomalía. Las curvas punteadas corresponden a los datos del cultivo estático con exceso de GLN y GLC (mostrado en la figura 2).

nutrientes. A diferencia de los cultivos estáticos (sección 5.1.1), en los cultivos agitados se controló el pH y el oxígeno disuelto (OD). Por lo mismo, tampoco se pudo atribuir el descenso de viabilidad a la falta de oxígeno o a un pH inadecuado. Este descenso pudo ser debido a las altas concentraciones de metabolitos tóxicos, ya que se observó que el LAC alcanzó una concentración de 2.5 g/l y dicha concentración fue ligeramente mayor a la alcanzada en el cultivo estático homólogo (figura 5B).

Como se muestra en la figura 5B, el consumo de GLC y la producción de LAC cesaron al entrar a la fase de muerte (al igual que en el cultivo estático homólogo). La fase de muerte posiblemente se presentó debido a la alta concentración de LAC. Los coeficientes metabólicos para GLC y LAC fueron de 3.19×10^{-13} y 5.31×10^{-13} mol/célula-h, respectivamente. La q_G fue ligeramente mayor a la encontrada en el cultivo estático homólogo, mientras que la q_L fue similar (ver tabla 3). Por lo mismo, el rendimiento aparente de LAC/GLC (1.66 mol/mol), fue menor al encontrado en el cultivo estático homólogo (ver tabla 3). Para este cultivo agitado, la velocidad específica de crecimiento fue de 0.049 h^{-1} . Debe notarse que la μ para el cultivo estático homólogo fue ligeramente menor (ver tabla 3). La pequeña diferencia entre las μ pudo ser debida a las condiciones controladas de pH y OD en el cultivo agitado.

Por otro lado, la producción de AcM continuó incrementándose hasta el término del cultivo donde se alcanzó una concentración máxima de 65.5 mg/l (figura 5C). La concentración máxima de AcM fue 1.8 veces mayor en este cultivo que en el cultivo estático con exceso de GLN y GLC (figuras 2C y 5C). El aumento en la concentración máxima de AcM fue debido a que el índice de viabilidad fue también mayor, lo cual a su vez pudo ser debido a que las condiciones de cultivo fueron más controladas (i.e., pH y OD). Las velocidades volumétrica (r_{AcM}) y específica (q_{AcM}) de producción de AcM fueron de 0.38 mg/l-h y $0.62 \times 10^{-9} \text{ mg/célula-h}$, respectivamente. Estas velocidades fueron más altas que las que se obtuvieron en los cultivos estáticos (ver tabla 3).

Los perfiles de las variables controladas y/o adquiridas, durante este cultivo agitado, no se muestran debido a que el programa de control y adquisición de datos aún no estaba perfectamente adaptado. Por lo mismo, el control de pH y de OD no fue óptimo. El pH fue fijado para ser controlado a 7.2 pero osciló entre 7 y 7.6. En cambio, el OD fue fijado para ser controlado a 50% (con respecto a la saturación con aire) y éste osciló entre 40 y 60.

5.1.2.2 Cultivo limitado de glutamina

Con el objeto de confirmar las conclusiones sobre el efecto de la concentración inicial de GLN

Tabla 3. Resumen de parámetros cinéticos y estequiométricos para cultivos estáticos por lote y cultivos agitados por lote

CULTIVO ESTÁTICO		CON EXCESO DE GLN Y GLC	LIMITADO DE GLN	LIMITADO DE GLC
[GLN] inicial *	mM	4	1	4
[GLC] inicial *	g/l	4.0	4.0	0.4
X _{max}	10 ⁶ células/ml	1.1 - 1.3	0.8	0.9
μ	h ⁻¹	0.036-0.044	0.048-0.055	0.034
Y' _{L/G}	mol/mol	1.8-2.2	2.1-2.2	1.7
q _G	10 ⁻¹³ mol/célula-h	1.7-2.9	2.7-3.0	1.0
q _L	10 ⁻¹³ mol/célula-h	3.7-5.6	5.8-6.6	1.8
[AcM] _{max}	mg/l	36.0	17.2	13.3
r _{AcM}	10 ⁻⁹ mg/l-h	0.28	0.17	0.17
q _{AcM}	10 ⁻⁹ mg/célula-h	0.42	0.26	0.38
.....				
CULTIVO AGITADO		CON EXCESO DE GLN Y GLC	LIMITADO DE GLN	LIMITADO DE GLC
[GLN] inicial *	mM	4	1	4
[GLC] inicial *	g/l	4.0	4.0	0.1
X _{max}	10 ⁶ células/ml	1.1	0.9-1.0	0.6
μ	h ⁻¹	0.049	0.055-0.059	0.026
Y' _{L/G}	mol/mol	1.7	1.5-2.0	1.6
q _G	10 ⁻¹³ mol/célula-h	3.19	2.15-3.10	0.74
q _L	10 ⁻¹³ mol/célula-h	5.31	4.30-4.67	1.15
[AcM] _{max}	mg/l	65.5	5.4-13.3	13.4
r _{AcM}	10 ⁻⁹ mg/l-h	0.38	0.06-0.18	0.12
q _{AcM}	10 ⁻⁹ mg/célula-h	0.62	0.08-0.17	0.42

*) [GLN] inicial y [GLC] inicial se refieren a la cantidad de sustrato suplementado al medio DMEM básico (ver sección 4.2).

en cultivos estáticos, se realizaron cultivos en bioreactores en los que la concentración inicial de GLN fué de 1 mM. La figura 6 muestra los perfiles de crecimiento, viabilidad, consumo de GLC, secreción de LAC y producción de ACM para uno de estos cultivos. El otro cultivo generó perfiles similares (apéndice G). En estos cultivos, se observó una fase de crecimiento lag inicial, seguida por una fase de crecimiento exponencial donde se alcanzó una densidad celular máxima entre 0.9×10^6 y 1.0×10^6 células viables/ml (figura 6A y apéndice G1). La viabilidad sufrió un rápido decremento después de alcanzar la X_{max} . La X_{max} y la duración de las fases exponencial y estacionaria fueron menores a las observadas durante el cultivo agitado con exceso de GLN y GLC (mostrado en la figura 5A). De hecho, se observó que la fase estacionaria no fué de más de 6 horas para estos cultivos limitados.

La figura 6B muestra como la GLC estuvo presente en concentraciones no-limitantes a lo largo de todo el cultivo (lo mismo se observó para el cultivo mostrado en el apéndice G). Por lo mismo, no se pudo atribuir el descenso en la concentración de células viables totales y en el porcentaje de viabilidad a la limitación de GLC. Además, dicho descenso tampoco fué debido a las altas concentraciones de metabolitos tóxicos. Las concentraciones de LAC (figura 6B y apéndice G1) y AMM (figura 8A), al momento del descenso en viabilidad, fueron inferiores a 1.5 g/l y 0.6 mM, respectivamente. Se observó que dicho descenso fué debido a la limitación de GLN ya que, como se muestra en la figura 7, el momento en que disminuyó la densidad celular y la velocidad de consumo de oxígeno (VCO), coincide con el agotamiento de GLN (indicado por la línea vertical punteada). Estos resultados concuerdan con otros reportados en la literatura donde se observa que el agotamiento de GLN limita el crecimiento de hibridomas y que la GLC no puede reemplazar a la GLN^{31,45,47}. Por lo mismo, este descenso no fué debido a la presencia de concentraciones altas de productos tóxicos sino a que el agotamiento de GLN ocasionó la interrupción de la respiración celular y, como consecuencia, el cese del crecimiento.

Como se muestra en la figura 6B y en el apéndice G1, el consumo de GLC y la producción de LAC cesaron unas cuantas horas después de alcanzada la X_{max} . Los coeficientes metabólicos para GLC y LAC fueron de $2.15\text{-}3.10 \times 10^{-13}$ y $4.3\text{-}4.67 \times 10^{-13}$ mol/célula-h, respectivamente. El rendimiento aparente de LAC/GLC fué de 1.5-2 mol/mol. En estos cultivos, la velocidad específica de crecimiento fué de 0.055-0.059 h^{-1} , mayor que la observada en el cultivo agitado con exceso de GLN y GLC (ver tabla 3). Los valores de q_G y q_L fueron mayores para el cultivo agitado con exceso de GLN y GLC (ver tabla 3). Sin embargo, el valor del Y'_{LG} (para el cultivo agitado con exceso de GLN y GLC) estuvo dentro del intervalo de rendimientos observados para los cultivos agitados y limitados de GLN (ver tabla 3). Con respecto a los cultivos estáticos (ver tabla 3), las μ fueron mayores en los cultivos agitados bajo limitación de GLN (posiblemente debido a que el pH y el OD

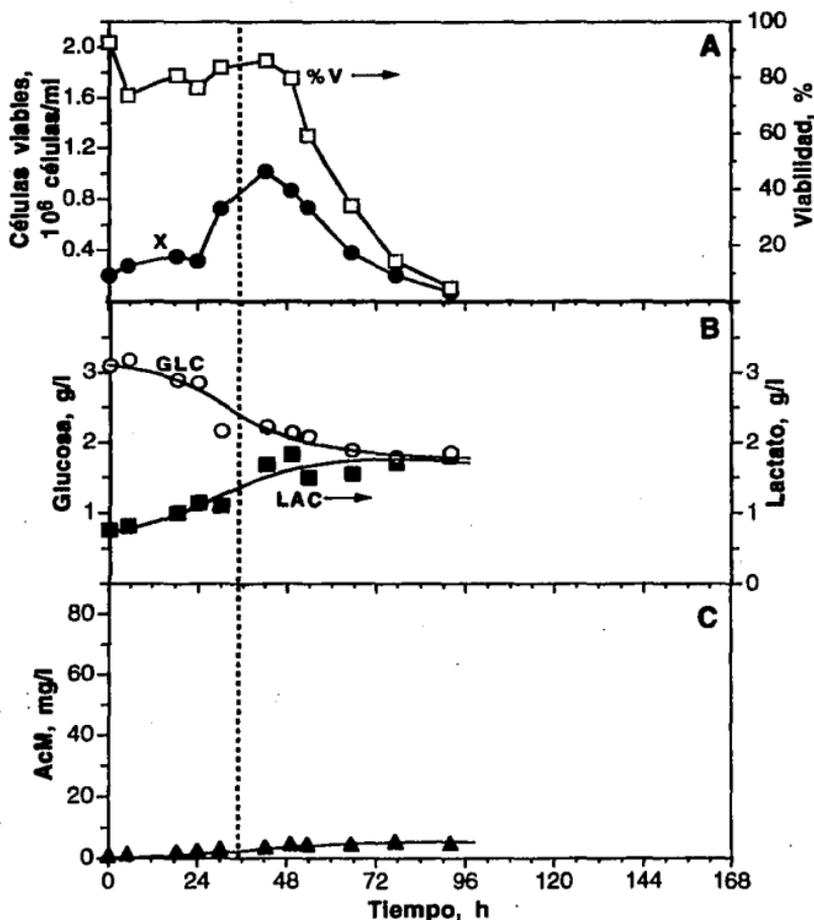


Figura 6. Cultivo agitado por lote bajo limitación de glutamina (1 mM GLN, 4 g/l GLC). La línea punteada vertical corresponde al agotamiento de GLN (figura 7).

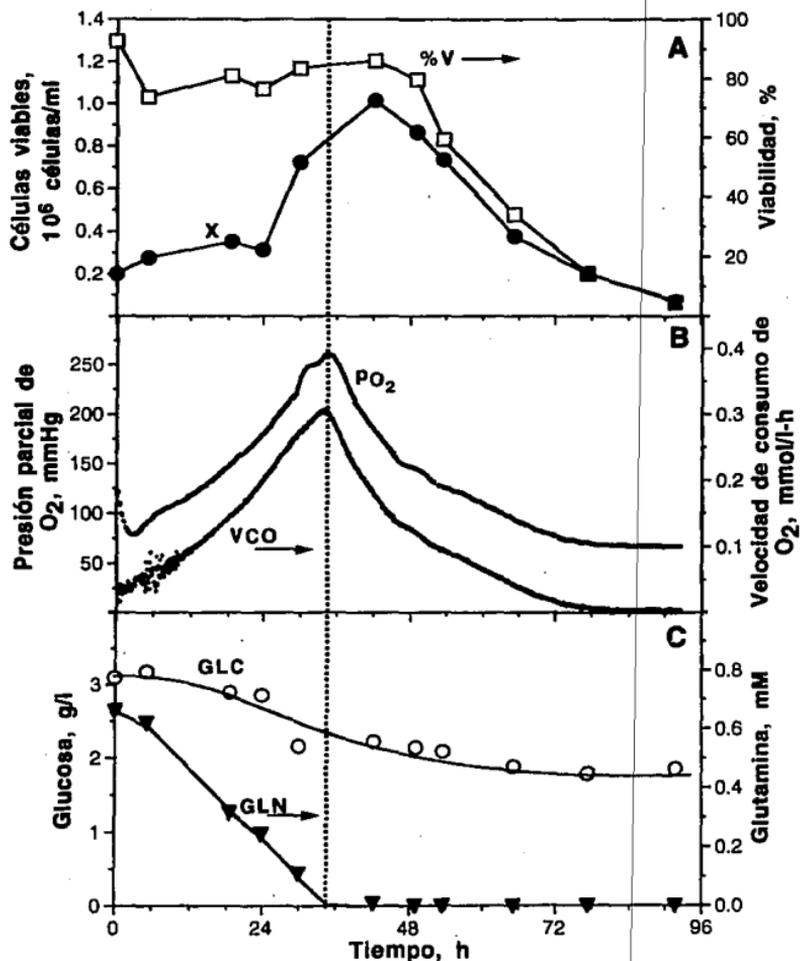


Figura 7. Estimación en-línea del agotamiento de glutamina en cultivos por lote (1 mM GLN, 4 g/l GLC). La línea punteada vertical corresponde al tiempo de agotamiento de GLN y los datos al cultivo mostrado en la figura 6.

fueron controlados). En los cultivos estáticos limitados de GLN, los valores de q_L y $Y'_{L/G}$ fueron menores, mientras que los valores de q_G fueron similares (ver tabla 3).

Por otro lado, la producción de AcM alcanzó una concentración máxima de 5.4 a 13.3 mg/l al término del cultivo (figuras 6C y apéndice G1, respectivamente). Dicho intervalo de concentración fué menor comparado tanto con el cultivo estático homólogo como con el cultivo agitado con exceso de GLN y GLC (ver tabla 3). Con respecto al cultivo estático, la concentración de AcM fué de 1.3-3.2 veces menor (posiblemente debido a las condiciones hidrodinámicas encontradas en cultivos agitados). La diferencia fué mucho mayor con respecto al cultivo agitado con exceso de GLN y GLC (4.9-12.1 veces) debido a que en éste se prolongó mucho más la fase estacionaria y, en consecuencia, el índice de viabilidad aumentó. Esto mismo se reflejó en las velocidades volumétrica (r_{AcM}) y específica (q_{AcM}) de producción de AcM, que fueron de 0.06-0.18 mg/l-h y 0.08-0.17 x 10⁻⁹ mg/célula-h, respectivamente (ver tabla 3).

Se demostró que se puede estimar, en tiempo real, el agotamiento de GLN mediante las mediciones en-línea de la presión parcial de oxígeno (p_{O_2}) en el cabezal del bioreactor a OD constante. Como se puede observar en la figura 7, alrededor de las 34 h ocurrió un súbito descenso en la p_{O_2} y en la velocidad de consumo de oxígeno (VCO), así como una perturbación en el control del OD. Estos eventos coincidieron con el agotamiento de GLN (medido fuera de línea) y con la entrada a la fase de muerte, observada como una disminución en la viabilidad del cultivo. Estos resultados concuerdan con otros de la literatura en donde se ha visto que el agotamiento de la GLN puede estimarse en-línea mediante las mediciones de la VCO⁴⁵. Como puede apreciarse, es fácil la incorporación de un algoritmo computarizado que determine el valor de la pendiente de la señal de la VCO, el cual podría inferir el agotamiento de GLN como el momento en que dicha pendiente cambia de un valor positivo a uno negativo. De los datos de la figura 7, se observó que existe una correlación directa entre la VCO, la presión parcial de oxígeno y el agotamiento de GLN, siempre y cuando se mantengan constantes tanto el OD como el coeficiente $k_L a$ (coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno). La importancia de poder inferir en-línea el agotamiento de GLN radica en poder implementar estrategias de control en tiempo real. Esto debido a que las mediciones directas de aminoácidos requieren de métodos analíticos que demoran más de dos horas y que son de difícil automatización.

La figura 8 muestra el análisis de los aminoácidos (la línea vertical punteada corresponde al tiempo de agotamiento de GLN, ocurrido a las 34 h) correspondientes a los datos de la figura 6. Como se puede ver, excepto asparagina y glutamina, el resto de los otros 18 aminoácidos se mantuvieron a concentraciones que no fueron limitantes para el crecimiento. Además, ya que el

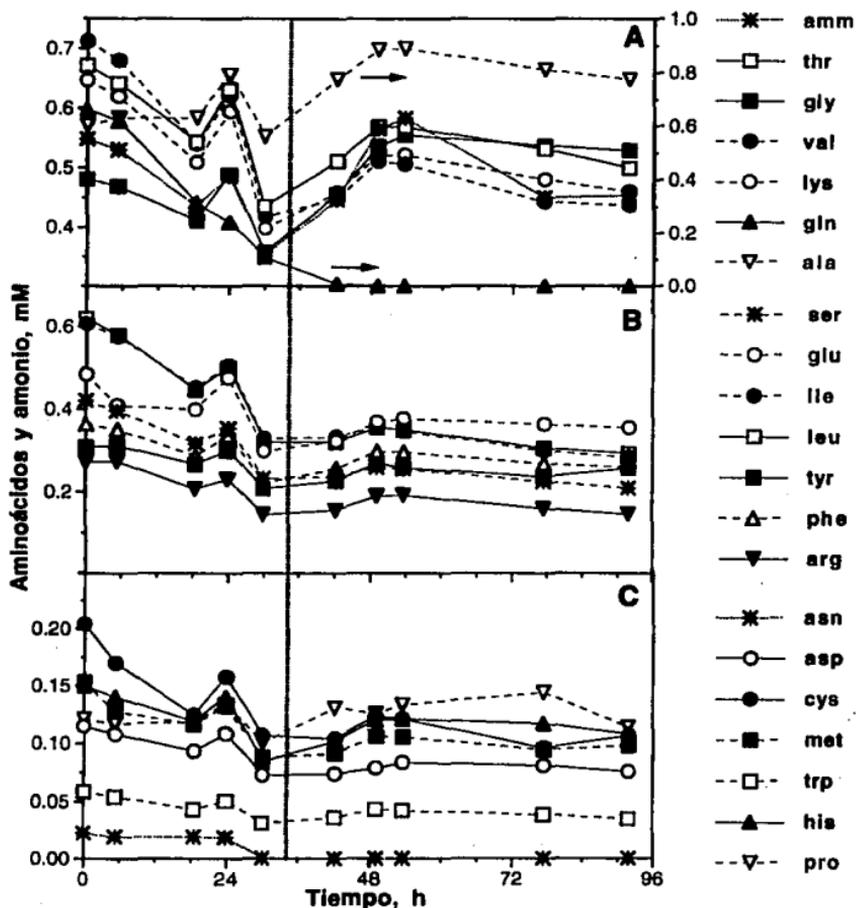


Figura 8. Perfiles de aminoácidos y amonio durante el cultivo por lotes bajo limitación de glutamina. La línea punteada vertical corresponde al tiempo de agotamiento de GLN (mostrado en la figura 7). Los datos corresponden al cultivo mostrado en la figura 6.

agotamiento de asparagina ocurrió mucho antes de las 34 h, se cree que el cese de la respiración es consecuencia únicamente del agotamiento de GLN. Esto se comprueba más adelante (ver figura 14), ya que se observó un claro reestablecimiento de la respiración celular al adicionar GLN después de su agotamiento. Por otro lado, se ha observado que la GLN es el principal donador de grupos amino para la síntesis de asparagina³³. Por lo mismo, es de esperarse el agotamiento de asparagina durante un cultivo limitado de GLN. Las concentraciones iniciales, de la mayoría de los aminoácidos (valores mostrados al tiempo cero de la figura 8), corresponden a las concentraciones conocidas de algunos de los aminoácidos del medio de cultivo empleado (ver apéndice A). Por un lado, se encontró que glutamato y alanina estaban a concentraciones mucho mayores que las esperadas. Esto probablemente se debe a que estos dos aminoácidos se encuentran también presentes en el suero suplementado. Por otro lado, la concentración determinada para tirosina fué de la mitad a la esperada. La tabla 4 resume las tendencias de los perfiles de aminoácidos mostrados en la figura 8. Es importante notar que después del agotamiento de GLN, glutamato no se consumió. Por el contrario, se produjo un poco. Esto es indicativo de que el glutamato no es una fuente energética que pueda substituir a la GLN. Además, se ha observado que el glutamato cruza la membrana celular relativamente poco^{11,29}. De acuerdo con lo anterior, se decidió tomar este cultivo como patrón de comparación para aquellos cultivos que sean suplementados selectivamente con GLN.

Qu y Philips⁴² observaron resultados parecidos a los mostrados en la tabla 4 y la figura 8. Las concentraciones reportadas, para los distintos aminoácidos, están dentro del mismo intervalo. Observaron que (en cultivos de hibridomas por lote) la glutamina, la arginina y los aminoácidos ramificados se consumen rápidamente, llegando a agotarse glutamina y arginina. Por otro lado, observaron que alanina y glutamato se producen, mientras que serina y glicina se consumen durante la fase exponencial de crecimiento y se producen durante la fase estacionaria. Adicionalmente, observaron que el resto de los aminoácidos se consumen a velocidades moderadas, donde histidina y triptofano permanecen relativamente constantes a través del cultivo. Por otro lado, Duval *et al.*¹⁰ observaron que, durante la fase exponencial de crecimiento de la línea de hibridomas VO208, aspartato, glicina y alanina se producen, y prolina, serina y triptofano permanecen relativamente constantes mientras que el resto se consumen. En cambio, para la línea de hibridomas 6H2 observaron que glicina, alanina, glutamato y prolina se producen y que el resto de los aminoácidos se consumen; siendo glutamina, arginina, leucina, isoleucina y serina los que más rápidamente se consumen. En general, se ha observado que los aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina) y la arginina se consumen a altas velocidades mientras que lisina, treonina, asparagina y metionina se consumen a velocidades relativamente altas³³. Se ha observado que generalmente se produce alanina y que sólo en algunas líneas celulares se producen glutamato, aspartato, glicina y prolina³³. Además, en los cultivos

Tabla 4. Tendencia general de los perfiles de aminoácidos en cultivos limitados de glutamina

AMINOACIDOS	
Permanecen relativamente constantes	asp ^a , met ^a , trp ^a , his ^{a,b} , pro ^b
Se producen	gly ^{a,c} , ala ^{c,d}
Se consumen	asn ^e , gln ^e , thr ^{a,b,c} , ser ^f , glub ^{b,g} , val ^{b,c} , cys ^{b,c} , ile ^f , leu ^f , tyr ^f , phe ^b , lys ^{b,c} , arg ^f

- a) tendencia a consumirse hasta antes del agotamiento de GLN
 b) tendencia a producirse después del agotamiento de GLN
 c) después de producirse tiende a consumirse ligeramente
 d) tendencia a permanecer constante hasta antes del agotamiento de GLN
 e) se agota
 f) después del agotamiento de GLN tiende a mantenerse relativamente constante
 g) después de producirse tiende a permanecer relativamente constante

donde se produce aspartato durante la proliferación celular, la producción es generalmente vía glutaminólisis³³.

En la figura 9 se muestra el comportamiento de las demás variables adquiridas y de control respecto a la cinética de crecimiento. El pH se controló a 7.4 con la reducción de la composición del dióxido de carbono, en los gases de entrada, desde un nivel inicial de 12% hasta 0%. El oxígeno disuelto se controló satisfactoriamente a 50% de saturación con respecto al aire. De la figura 9 se puede deducir lo siguiente: si se controla el oxígeno disuelto a un valor fijado y se observa una disminución en la composición de oxígeno de los gases de entrada, un pequeño aumento en la variable de control (el OD aumenta ligeramente debido a que la acción de control no es inmediata) y una disminución en el potencial redox, ocurre un evento fisiológico. Es decir, existe agotamiento de GLN. Esto se tomó como base para determinar el momento adecuado en el que se debe realizar la adición de GLN en bioreactores suplementados selectivamente con GLN. La disminución del consumo global de oxígeno fué causado por un cese en la respiración y no simplemente por la disminución en la viabilidad. Las observaciones sobre el perfil del potencial redox del cultivo (PRC) se discutirán más adelante (en la sección 5.2).

5.1.2.3 Cultivo limitado de glucosa

Con el objeto de confirmar lo observado sobre el efecto de la concentración inicial de GLC (en cultivo estático), se realizó un cultivo agitado en el que la concentración de GLC adicionada fué de 0.1 g/l (4 veces menor que la concentración inicial en el cultivo estático homólogo y 40 veces menor que la de los cultivos con exceso de GLN y GLC). La figura 10 muestra los perfiles de crecimiento, viabilidad, consumo de GLC, secreción de LAC y producción de AcM para este cultivo. Se observó una fase de crecimiento exponencial donde se alcanzó una densidad celular máxima cerca de 0.6×10^6 células viables/ml. Después de alcanzar la X_{max} , la viabilidad sufrió un rápido decremento (no se observó una fase estacionaria). La figura 10B muestra claramente que el agotamiento de GLC ocurrió alrededor de las 48 h, mientras que GLN aún estaba presente en concentraciones no-limitantes (ver figura 11C). Este agotamiento coincidió con el descenso en la concentración de células viables y en la viabilidad. Además, dicho descenso no fué debido a las altas concentraciones de metabolitos tóxicos. Las concentraciones de LAC (figura 10B) y AMM (figura 12A), al momento del descenso en viabilidad, fueron inferiores a 0.35 g/l y 0.6 mM, respectivamente. Como se muestra en la figura 10, la producción de LAC cesó un poco antes de alcanzada la X_{max} y de haberse agotado la GLC. Adicionalmente, se observó que la GLN no pudo reemplazar a la GLC, lo cual indica que la fuente energética y de carbono tienen funciones únicas en el metabolismo celular de los hibridomas.

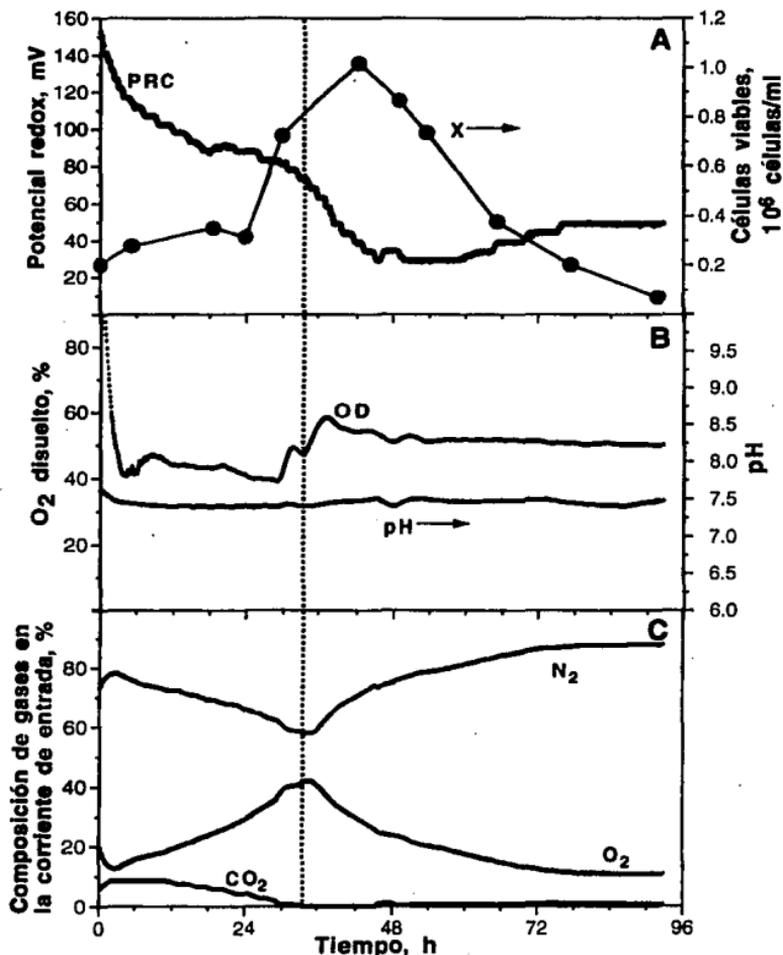


Figura 9. Perfiles de variables adquiridas y de control en cultivos por lote bajo limitación de glutamina (1 mM GLN, 4 g/l GLC). Los datos corresponden al cultivo mostrado en la figura 6.

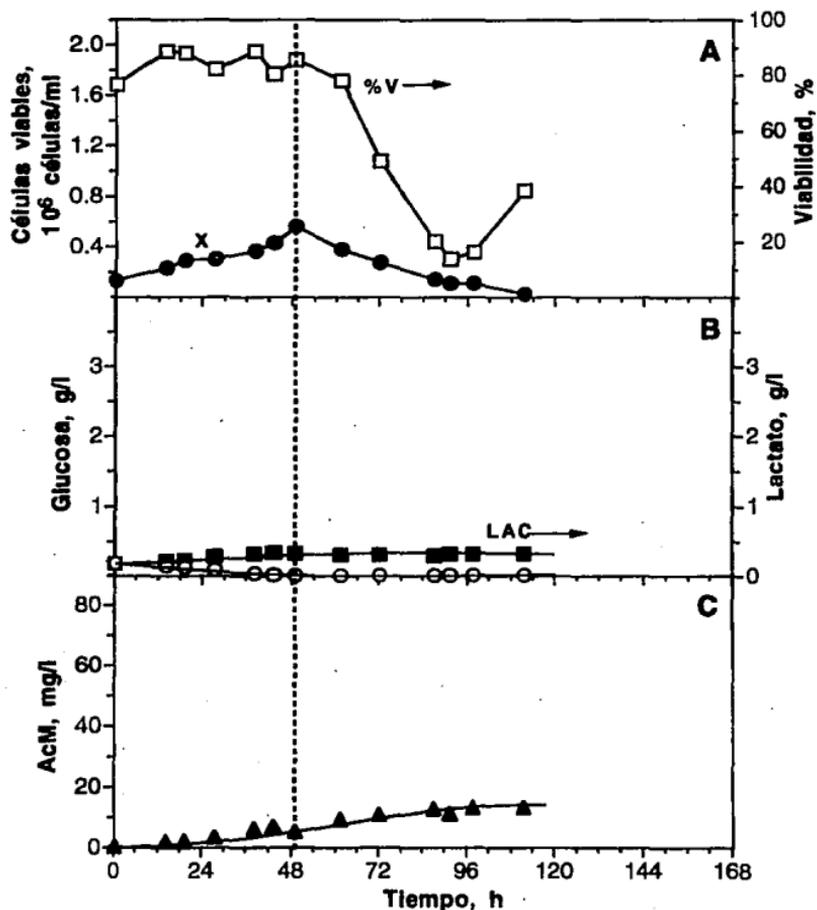


Figura 10. Cultivo agitado por lote bajo limitación de glucosa (4mM GLN, 0.1 g/l GLC). La línea punteada vertical corresponde al tiempo de agotamiento de GLC.

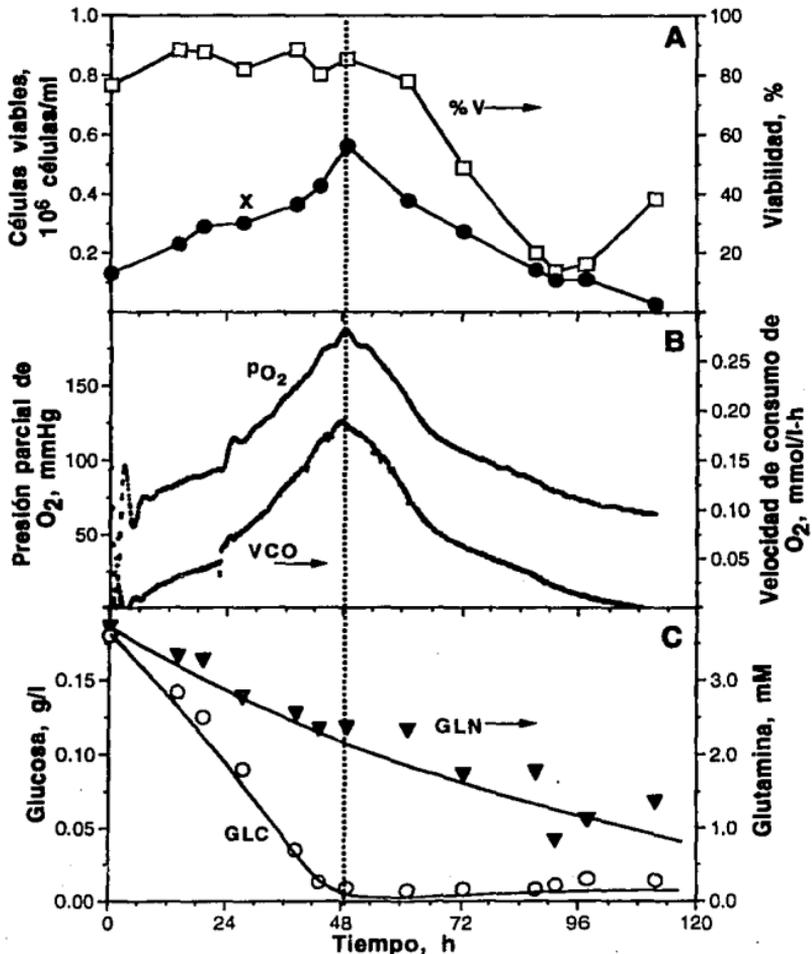


Figura 11. Estimación en-línea del agotamiento de glucosa en cultivos por lote (4 mM GLN, 0.1 g/l GLC). La línea punteada vertical corresponde al tiempo de agotamiento de GLC y los datos al cultivo mostrado en la figura 10.

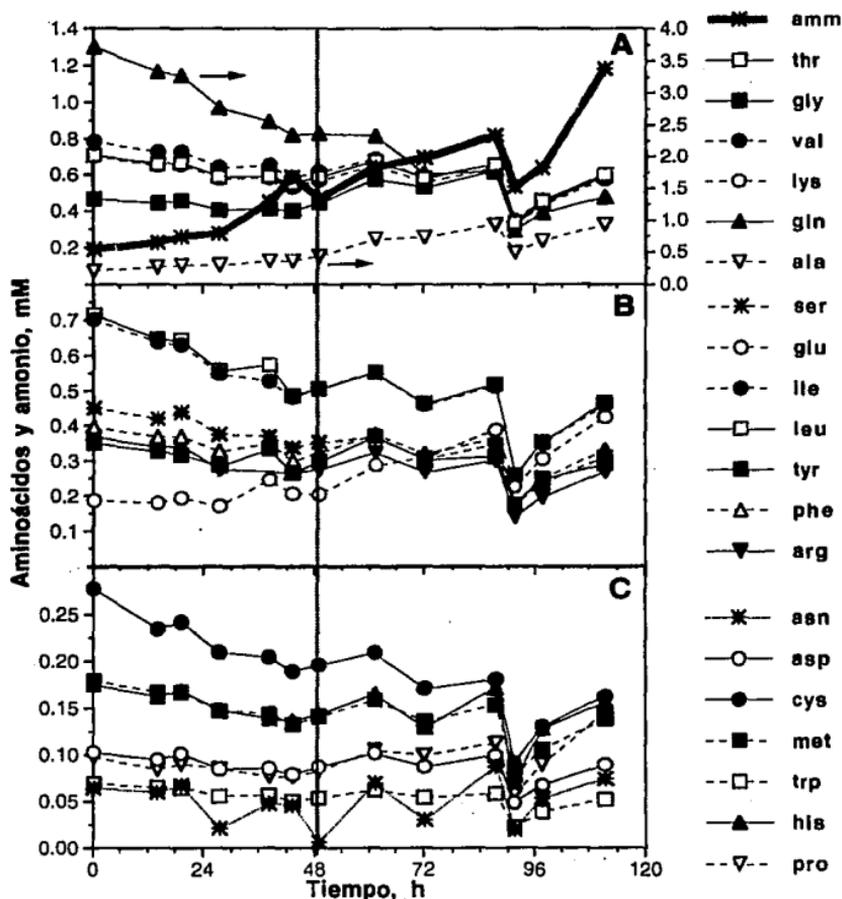


Figura 12. Perfiles de aminoácidos y amonio durante el cultivo por lotes bajo limitación de glucosa (4 mM GLN, 0.1 g/l GLC). La línea punteada vertical corresponde al tiempo de agotamiento de GLC (mostrado en la figura 11). Los datos corresponden al cultivo mostrado en la figura 10.

En este cultivo, la velocidad específica de crecimiento fué de 0.026 h^{-1} , menor que cualquiera de las observadas en los cultivos estáticos y en los cultivos agitados con exceso de GLN y GLC y bajo limitación de GLN (ver tabla 3). Los coeficientes metabólicos para GLC y LAC fueron de 0.74×10^{-13} y $1.15 \times 10^{-13} \text{ mol/célula-h}$, respectivamente. Ambos coeficientes fueron menores que los observados en cualquiera de los cultivos anteriores (ver tabla 3). El rendimiento aparente de LAC/GLC fué de 1.56 mol/mol , menor que el observado para el cultivo estático homólogo y similar al observado en el cultivo agitado bajo limitación de GLN (tabla 3). En general, el $Y'_{L/G}$ fué menor a los observados para el resto de los cultivos anteriormente discutidos (ver tabla 3). Por otro lado, la producción de AcM continuó incrementándose hasta el término del cultivo, donde se alcanzó una concentración máxima de 13.4 mg/l (figura 10C). Esta concentración máxima de AcM fué similar a la alcanzada en el cultivo estático homólogo (figura 4 y tabla 3), a pesar de que la concentración inicial de GLC fué mayor en el cultivo estático. Las velocidades volumétrica (r_{AcM}) y específica (q_{AcM}) de producción de AcM fueron de 0.12 mg/l-h y $0.42 \times 10^{-9} \text{ mg/célula-h}$, respectivamente. La q_{AcM} fué mayor que en los cultivos limitados de GLN, menor que en el cultivo agitado con exceso de GLN y GLC e igual que en el cultivo estático con exceso de GLN y GLC (ver tabla 3). Los resultados anteriores son esperados ya que el agotamiento de GLC ocasiona la interrupción en el crecimiento celular (provocado por un cese en la síntesis de nucleósidos) y, por consecuencia, una disminución global en la respiración celular.

En este cultivo también se demostró que se puede estimar, en tiempo real, el agotamiento de GLC mediante las mediciones en-línea de la pO_2 en el cabezal del bioreactor a OD constante. Se observó (figura 11), alrededor de las 48 h, un súbito descenso en la pO_2 y en la VCO, así como una perturbación en el control del OD. Estos descensos coincidieron con el agotamiento de GLC (medido fuera de línea) y desencadenaron la entrada a la fase de muerte (observada como una disminución en la viabilidad del cultivo). Como puede apreciarse, en este caso también es fácil la incorporación de un algoritmo computarizado que determine el valor de la pendiente de la señal de la VCO, el cual podría inferir el agotamiento de GLC como el momento en que dicha pendiente cambia de un valor positivo a uno negativo. Adicionalmente, se observó (figura 11) que existe una correlación directa entre la VCO, la presión parcial de oxígeno y el agotamiento de GLC, siempre y cuando se mantengan constantes el OD y el coeficiente $k_L a$.

La figura 12 muestra el análisis de los aminoácidos (la línea vertical punteada corresponde al tiempo de agotamiento de GLC) correspondientes a los datos de la figura 10. Se observó que los 20 aminoácidos se mantuvieron a concentraciones no-limitantes para el crecimiento. Las concentraciones iniciales de los distintos aminoácidos (valores mostrados al tiempo cero en la figura 12), salvo las

consideraciones mencionadas en la sección 5.1.2.2, corresponden a las concentraciones conocidas de los aminoácidos del medio de cultivo empleado (ver apéndice A). La tabla 5 resume las tendencias de los perfiles de aminoácidos mostrados en la figura 12. Salvo glutamato, todos los demás perfiles de aminoácidos tienen tendencias similares a los mostrados para cultivos limitados de GLN. Cabe mencionar que se ha observado que el grado de síntesis de glutamato (a partir de GLN) depende de las condiciones de cultivo³³. De acuerdo con lo anterior, se decidió tomar este cultivo como patrón de comparación para aquellos cultivos que sean suplementados selectivamente con GLC.

En la figura 13 se muestra el comportamiento de las demás variables adquiridas y de control respecto a la cinética de crecimiento. El pH se controló a 7.2 con la reducción de la composición del dióxido de carbono, en los gases de entrada, desde un nivel inicial de 24% hasta 16%. El oxígeno disuelto se controló satisfactoriamente a 50% de saturación con respecto al aire. De la figura 13 se puede deducir lo siguiente: si se controla el oxígeno disuelto a un valor predeterminado y se observa una disminución en la composición de oxígeno de los gases de entrada, un pequeño aumento en la variable de control (el OD aumenta ligeramente debido a que la acción de control no es inmediata) y una disminución en el potencial redox, ocurre un evento fisiológico. Es decir, existe agotamiento de GLC. Esto se tomó como base para determinar el momento adecuado en el que se debe realizar la adición de GLC en bioreactores suplementados selectivamente con GLC. La disminución del consumo global de oxígeno fué causado por un cese en el crecimiento y por la disminución en la viabilidad.

5.1.3 Cultivos agitados y suplementados

5.1.3.1 Cultivo suplementado selectivamente con glutamina

Basados en los resultados de los cultivos por lote, se procedió a realizar un cultivo agitado y suplementado selectivamente con GLN en un bioreactor agitado de un litro. Este experimento tuvo como finalidad principal el aumentar la productividad de AcM mediante la suplementación selectiva de GLN. Se usó medio de cultivo DMEM con 10% SFB, 4 g/l GLC (adicionada) y bajas concentraciones iniciales de GLN (0.5 mM en lugar de 4 mM). Durante el desarrollo de este cultivo, se dieron pulsos manuales de GLN a diferentes tiempos. Se realizó esta adición programada con el fin de evitar el agotamiento de la fuente de energía (necesaria para el crecimiento y mantenimiento celular^{11,29,31,32,33,34,47}) y, al mismo tiempo, para mantener dicho nutriente a concentraciones bajas, evitando la acumulación excesiva de productos metabólicos tóxicos como AMM. Adicionalmente, con esta estrategia se buscó la prolongación de la fase exponencial y/o estacionaria de crecimiento, lo cual repercute directamente en el aumento de la concentración final de AcM.

Tabla 5. Tendencia general de los perfiles de aminoácidos en cultivos limitados de glucosa

AMINOACIDOS	
Permanecen relativamente constantes	asp, asn, met ^{a,b} , trp, his ^{a,b} , pro ^c
Se producen	gly ^d , glu ^d , ala
Se consumen	gln, thr, ser, val, cys, ile, leu, tyr, phe ^b , lys, arg

- a) tendencia a consumirse hasta antes del agotamiento de GLC
 b) después del agotamiento de GLC tiende a mantenerse relativamente constante
 c) tendencia a producirse después del agotamiento de GLC
 d) tendencia a permanecer constante hasta poco antes del agotamiento de GLC

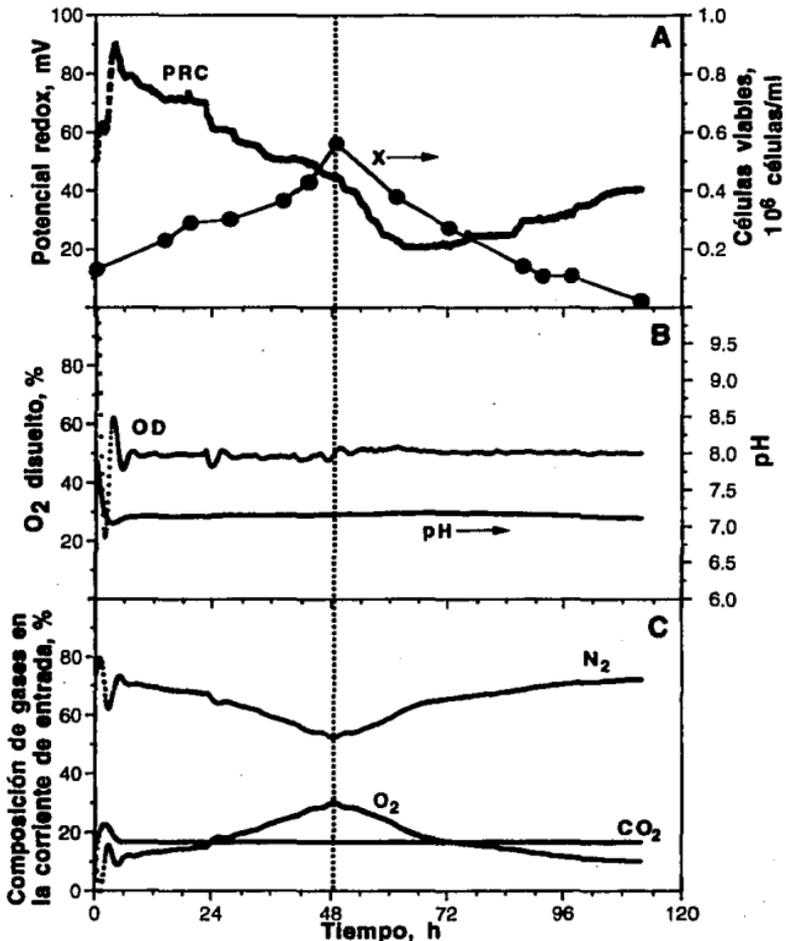


Figura 13. Perfiles de variables adquiridas y de control en un cultivo por lote bajo limitación de glucosa (4 mM GLN, 0.1 g/l GLC). La línea punteada vertical corresponde al tiempo de agotamiento de GLC (mostrado en la figura 11). Los datos corresponden al cultivo mostrado en la figura 10.

Como se puede observar en la figura 14B, la GLN fué adicionada cada vez que se observó un descenso en la VCO (adición indicada por las flechas verticales sólidas). Este hecho fué detectado como una disminución en la pO_2 en los gases de entrada, provocado a su vez por el control automático para mantener constante la concentración de OD. Como resultado, se logró mantener una concentración de GLN en niveles superiores a cero pero inferiores a 0.2 mM a lo largo de los primeros 3 días del cultivo (figura 14C), con lo cual la concentración celular máxima (2.1×10^6 células/ml; figura 14A) se vió incrementada en poco más de un 100% con respecto al cultivo limitado de GLN (figuras 6 ó 15 y apéndice G1). En general, la concentración celular máxima fué mayor que en cualquiera de los cultivos discutidos en las secciones 5.1.1 y 5.1.2 (ver tablas 6). Se observó el reestablecimiento de la respiración celular cada vez que se adicionó GLN. Además, se observó que este cultivo no estuvo limitado de GLC y que los niveles de GLC y LAC fueron similares a los del cultivo agitado bajo limitación de GLN (figura 6 y apéndice G1).

Con el fin de probar una de las estrategias de control predeterminado (reportadas en la literatura), se procedió a alimentar GLN en forma continua siguiendo un perfil exponencial después del tercer día de cultivo (inicio de alimentación indicado por la flecha hueca). Como se aprecia en la figura 14C, dicho control predeterminado resultó en la sobre alimentación de GLN e ilustró perfectamente las ventajas del control de ciclo cerrado, propuesto en este trabajo, sobre las estrategias de ciclo abierto, utilizadas por otros autores^{13,18,26,57,58}. Durante los primeros tres días de cultivo, la viabilidad del cultivo se mantuvo alrededor del 80%, cayendo a 60% después de iniciada la alimentación continua de GLN (figura 14A). La figura 15A muestra como se prolongó la fase exponencial de crecimiento al utilizar tal estrategia de control de GLN. La figura 15B muestra las concentraciones de AcM para el cultivo suplementado mostrado en la figura 14 y los cultivos agitados bajo limitación de GLN mostrados en la figura 6 y el apéndice G1. Como se observa, la concentración máxima de AcM fué entre 3.5 y 8.6 veces mayor que en los cultivos limitados de GLN (46.2 mg/l comparado con 5.4-13.3 mg/l). Además, dicha concentración se obtuvo casi en el mismo período de tiempo, por lo que la productividad volumétrica fué también mayor: entre 2.8 y 8.3 veces (0.50 mg/l-h comparado con 0.06-0.18 mg/l-h; ver tabla 6). La productividad específica para este cultivo suplementado fué de 0.47×10^{-9} mg/célula-h, entre 2.8 y 5.9 veces mayor que la de los cultivos limitados de GLN (ver tabla 6). Con esta estrategia de operación de ciclo cerrado, a diferencia de otras, no se sub- o sobrealimenta GLN, y además no se diluye el producto. Al utilizar la estimación hecha en-línea sobre agotamiento de GLN, se establecieron los tiempos de alimentación de nutrientes, se minimizó la descomposición espontánea de GLN y la producción de AMM, y se incrementó la densidad celular así como la productividad de AcM.

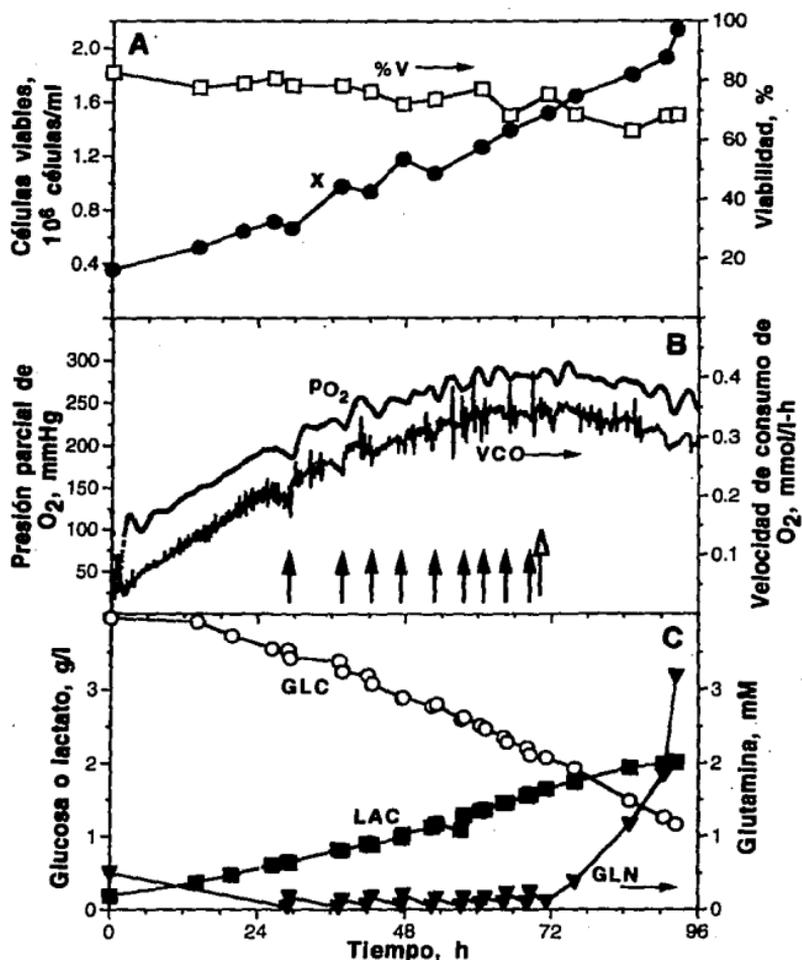


Figura 14. Cultivo agitado y suplementado selectivamente con glutamina. Las flechas verticales sólidas denotan la adición de GLN mediante pulsos y la hueca el inicio de la adición continua de GLN.

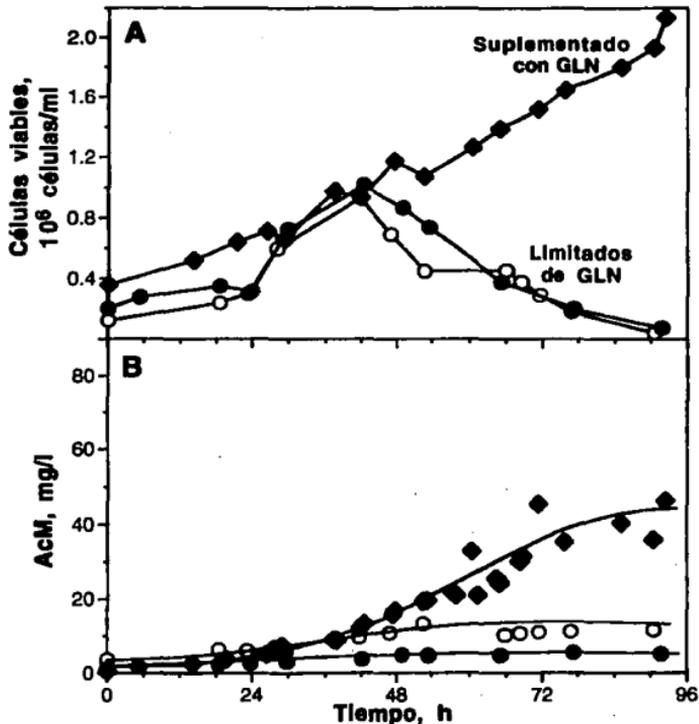


Figura 15. Perfiles de crecimiento y producción de AcM en cultivos bajo limitación de glutamina y en un cultivo suplementado selectivamente con glutamina. Los datos de los cultivos limitados de GLN corresponden a los cultivos mostrados en la figura 6 (círculos sólidos) y en el apéndice G1 (círculos huecos). Los datos representados por rombos corresponden al cultivo mostrado en la figura 14.

Tabla 6. Resumen de parámetros cinéticos y estequiométricos para cultivos estáticos por lote, cultivos agitados por lote y cultivos suplementados selectivamente

CULTIVO	CON EXCESO DE GLN Y GLC		LIMITADO DE GLN		LIMITADO DE GLC	
	ESTATICO	AGITADO	ESTATICO	AGITADO	ESTATICO	AGITADO
[GLN] inicial	4	4	1	1	4	4
[GLC] inicial	4.0	4.0	4.0	4.0	0.4	0.1
X_{max}	1.1 - 1.3	1.1	0.8	0.9-1.0	0.9	0.6
μ	0.036-0.044	0.049	0.048-0.055	0.055-0.059	0.034	0.026
$Y'L/G$	1.8-2.2	1.7	2.1-2.2	1.5-2.0	1.7	1.6
q_G	1.7-2.9	3.19	2.7-3.0	2.15-3.10	1.0	0.74
q_L	3.7-5.6	5.31	5.8-6.6	4.30-4.67	1.8	1.15
$[AcM]_{max}$	36.0	65.5	17.2	5.4-13.3	13.3	13.4
r_{AcM}	0.28	0.38	0.17	0.06-0.18	0.17	0.12
q_{AcM}	0.42	0.62	0.26	0.08-0.17	0.38	0.42

.....

CULTIVO SUPLEMENTADO SELECTIVAMENTE		CON GLN	CON GLC
[GLN] inicial *	mM	0.5	4.0
[GLC] inicial *	g/l	4.00	0.05
X_{max}	10^6 células/ml	2.1	1.3
μ	h^{-1}	0.018	0.020
$Y'L/G$	mol/mol	1.29	1.54
q_G	10^{-13} mol/célula-h	1.73	0.95
q_L	10^{-13} mol/célula-h	2.24	1.46
$[AcM]_{max}$	mg/l	46.2	83.6
r_{AcM}	10^{-9} mg/l-h	0.50	0.29
q_{AcM}	10^{-9} mg/célula-h	0.47	0.40

*) [GLN] inicial y [GLC] inicial se refieren a la cantidad de sustrato suplementado al medio DMEM básico (ver sección 4.2).

En la tabla 6 se resumen los parámetros cinéticos y estequiométricos de este cultivo (cultivo suplementado selectivamente con GLN) y de los cultivos anteriormente discutidos. Se observó que la μ y el Y'_{LAC} fueron menores que las observadas en los cultivos estáticos y agitados por lote (ver tabla 6). Los coeficientes metabólicos de LAC y GLC también fueron menores que los observados para estos cultivos, salvo para los cultivos limitados de GLC (ver tabla 6). La concentración de AcM y la r_{AcM} , hasta antes de la alimentación continua de GLN, fueron mayores que en los cultivos por lote, salvo en el cultivo agitado con exceso de GLN y GLC. Esta excepción es evidente ya que no se consideró la producción de AcM durante las fases estacionaria y de muerte (porque no se controló la adición de GLN durante estas fases), con lo cual seguramente hubieran aumentado tanto la concentración final de AcM como el índice de viabilidad. Sin embargo, la q_{AcM} fue mayor que en cualquiera de los cultivos anteriormente mencionados (ver tabla 6).

La figura 16 muestra el análisis de los aminoácidos correspondientes a los datos de la figura 14. Se observó que todos los aminoácidos se mantuvieron a concentraciones que no limitan el crecimiento. La tabla 7 resume las tendencias de los perfiles de aminoácidos mostrados en la figura 16. Es importante notar que glutamato se produjo a lo largo del cultivo. Esto confirma que glutamato no es una fuente energética que pueda substituir a la GLN cuando está es limitante o cuando se encuentra a bajas concentraciones. Adicionalmente, se observó que la producción de glutamato, alanina y prolina se intensifican al sobrealimentar GLN. Esto demuestra el efecto de las condiciones de cultivo sobre la síntesis de algunos aminoácidos (*i.e.*, alanina y prolina a partir de GLN^{33}). Salvo prolina, glicina y glutamato, los demás perfiles de aminoácidos tienen tendencias similares a los mostrados para cultivos limitados de GLN (figura 8 y tabla 4) y de GLC (figura 12 y tabla 5). Sin embargo, la tendencia del perfil de glutamato es similar a la encontrada en cultivos limitados de GLC.

En la figura 17 se muestra el comportamiento de las variables adquiridas y de control respecto a la cinética de crecimiento para este cultivo suplementado con GLN. El pH se controló a 7.3. En una primera etapa (tres primeros días), se controló con la reducción de la concentración del dióxido de carbono en los gases de entrada, desde un nivel inicial de 14% hasta 0%. En una segunda etapa, se controló mediante la adición manual (pulsos) de hidróxido de sodio 0.2N. El OD se controló satisfactoriamente a 50% de la saturación con aire, mediante la variación en las composiciones de O_2 y N_2 en la mezcla de gases.

5.1.3.2 Cultivo suplementado selectivamente con glucosa

Se realizó otro cultivo en bioreactor que también tenía como finalidad principal el aumentar la

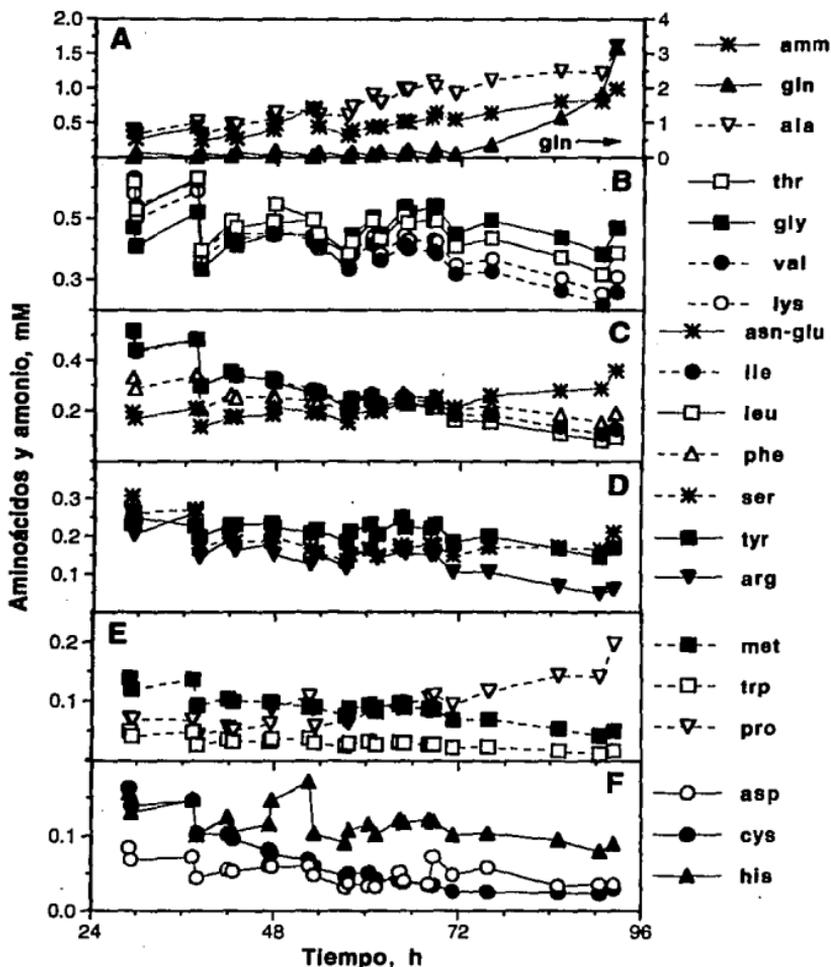


Figura 16. Perfiles de aminoácidos y amonio durante el cultivo agitado y suplementado selectivamente con glutamina. Los datos corresponden al cultivo mostrado en la figura 14.

Tabla 7. Tendencia general de los perfiles de aminoácidos en un cultivo suplementado selectivamente con glutamina

AMINOACIDOS	
Permanecen relativamente constantes	asp ^a , gly, trp ^a
Se producen	asn-glu, ala, pro
Se consumen	gln ^b , thr, ser, val, cys, met, ile, leu, tyr, phe, lys, his, arg

a) presenta una ligera tendencia hacia el consumo

b) su aumento después de las 72 h corresponde a la sobrealimentación del mismo

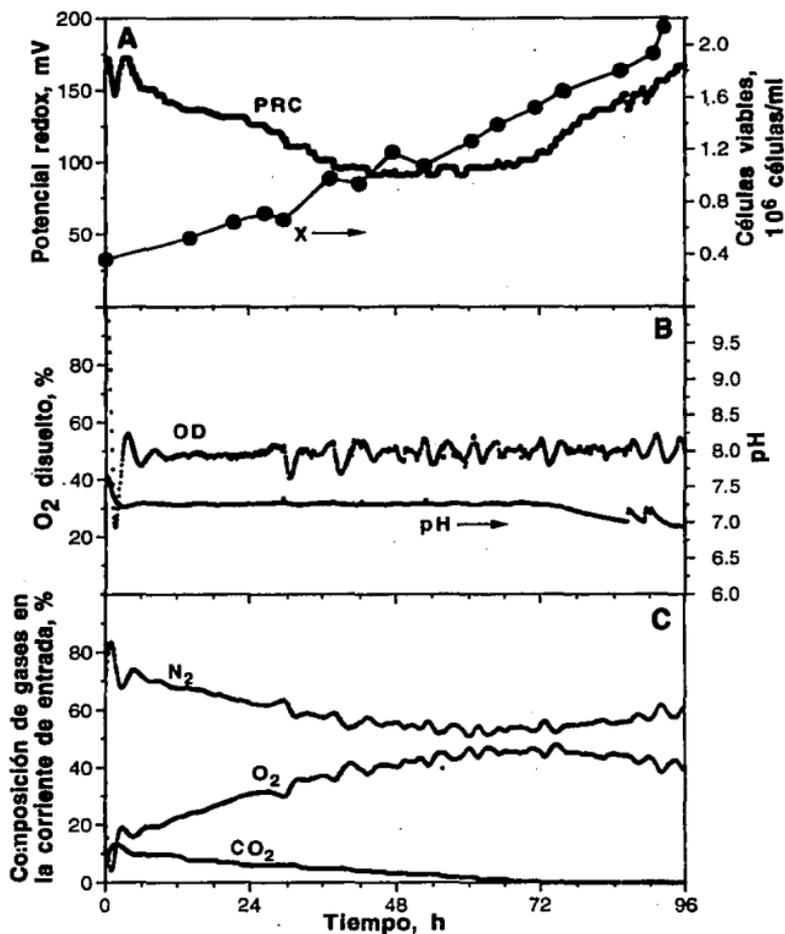


Figura 17. Perfiles de variables adquiridas y de control en un cultivo suplementado con glutamina. Los datos corresponden al cultivo mostrado en la figura 14.

productividad de AcM, pero en este caso mediante la suplementación selectiva de GLC. Para este cultivo se usó medio de cultivo DMEM con 10% SFB, 4 mM GLN y baja concentración inicial de GLC (0.05 g/l GLC adicionada en lugar de 4 g/l). Durante el desarrollo del mismo, se dieron pulsos manuales de GLC a diferentes tiempos. Se realizó esta adición programada con el fin de evitar el agotamiento de la fuente de carbono (necesaria para el crecimiento celular) y, al mismo tiempo, para mantener dicho nutriente a concentraciones bajas, evitando la acumulación excesiva de productos metabólicos tóxicos como LAC. Adicionalmente, se buscó con esta estrategia la prolongación de la fase exponencial y/o estacionaria de crecimiento, lo cual repercute directamente en el aumento de la concentración final de AcM.

En la figura 18 se muestran las cinéticas de crecimiento, viabilidad, consumo de GLC y secreción de LAC. Además, se muestran los perfiles de la pO_2 y la VCO, así como los tiempos en que se adicionó GLC (adición indicada por las flechas verticales sólidas). Se suplementó GLC cada vez que se observó un descenso en la VCO, debido al cese en el crecimiento de los híbridos. Este hecho fué detectado como una disminución en la pO_2 , a la entrada del bioreactor, provocado por el control automático para mantener constante el OD. Se logró mantener la concentración de GLC en niveles superiores a cero pero inferiores a 0.6 g/l, con lo cual se obtuvo una concentración máxima de AcM que fué 6.2 veces mayor que en el cultivo agitado bajo limitación de GLC mostrado en la figura 10 (83.6 mg/l comparado con 13.4 mg/l; figura 19). Además, se obtuvo una productividad volumétrica 2.4 veces mayor que en dicho cultivo limitado de GLC: 0.29 mg/l-h comparado con 0.12 mg/l-h (ver tabla 6). Las flechas huecas y pequeñas, de la figura 18B, indican los tiempos en que se adicionó GLN en exceso. No se controló la adición de GLN, simplemente se aseguró que ésta no limitara el crecimiento del cultivo.

En la figura 19 se puede apreciar como la densidad celular máxima alcanzada fué del doble a la alcanzada en el cultivo agitado bajo limitación de GLC (0.6×10^6 células/ml comparado con 1.3×10^6 células/ml). Además, se observó que la fase estacionaria de crecimiento se prolongó notablemente más y que la velocidad específica de crecimiento fué ligeramente menor que en el cultivo limitado de GLC (0.020 comparado con 0.026 h^{-1} ; ver tabla 6). Por lo mismo, es de esperarse el incremento o mantenimiento en la productividad específica de AcM (0.40×10^{-9} mg/célula-h comparado con 0.42×10^{-9} mg/célula-h; ver tabla 6). Cada vez que se adicionó GLC, se observó que tanto el crecimiento celular como la respiración celular global se reestablecían (figura 18). Además, se observó que la viabilidad y la concentración de LAC se mantuvieron relativamente constantes durante los primeros tres días de cultivo, justo antes de alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Después de ésto, la viabilidad decayó drásticamente hasta cerca de 0% y la producción de LAC aumentó

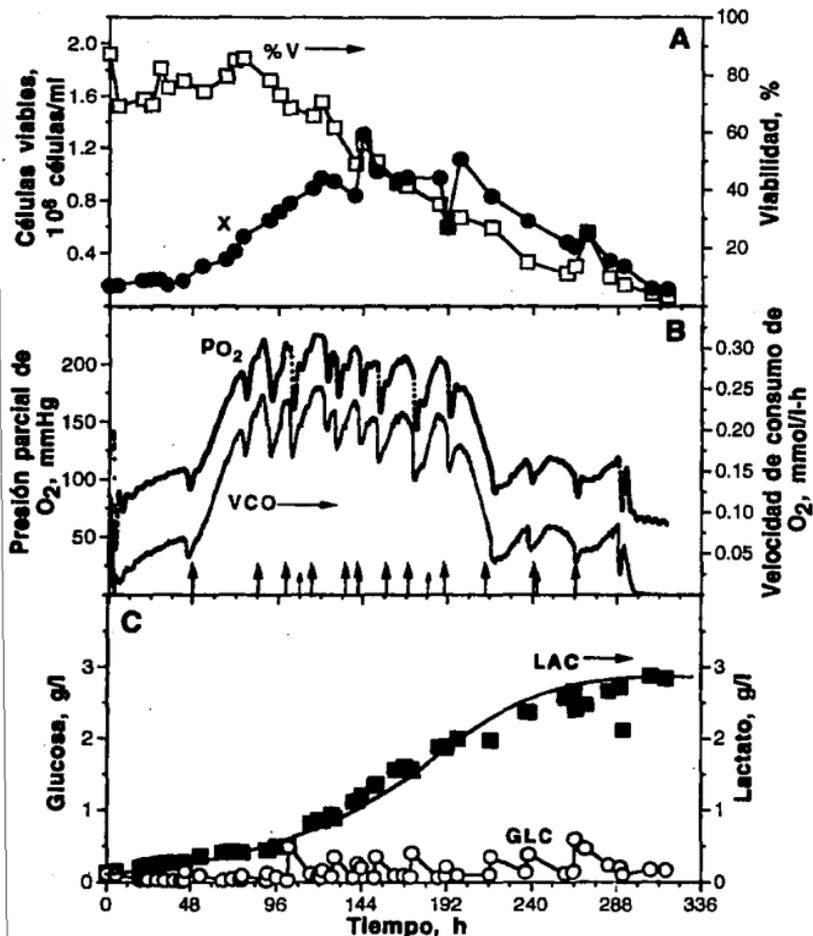


Figura 18. Cultivo agitado y suplementado selectivamente con glucosa. Las flechas verticales sólidas denotan la adición de GLC mediante pulsos. Las pequeñas flechas huecas denotan la adición de GLN en exceso.

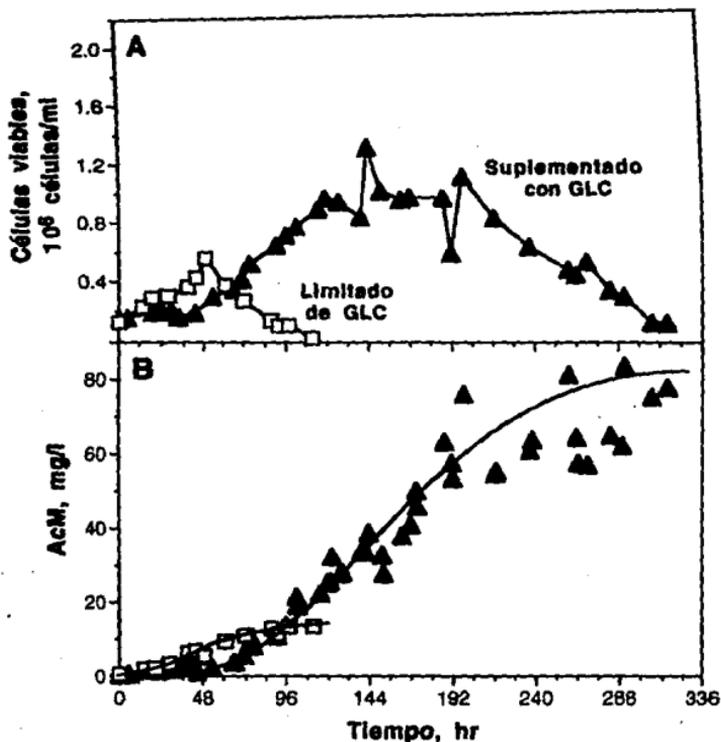


Figura 19. Perfiles de crecimiento y producción de AcM en un cultivo bajo limitación de glucosa y en un cultivo suplementado selectivamente con glucosa. Los datos del cultivo limitado de GLC corresponden al cultivo mostrado en la figura 10 (cuadros huecos). Los datos representados por triángulos corresponden al cultivo suplementado con GLC (mostrado en la figura 18).

considerablemente. Es importante notar que con esta estrategia de operación, no se sub- o sobrealimenta GLC y no se diluye el producto. Al utilizar esta estimación hecha en-línea se establecieron los tiempos de alimentación de nutrientes, con lo cual se minimizó la producción de LAC, se incrementó la productividad de AcM y se prolongó la fase estacionaria de crecimiento.

En la figura 20 se muestran los perfiles de las variables adquiridas y de control. El pH se controló bastante bien a 7.3 hasta las 240 horas. Después de este tiempo, el medio perdió su capacidad de buffer ya que después de adicionar medio DMEM (10% del volumen inicial; momento de adición indicado por la flecha hueca) el pH se recuperó pero, al poco tiempo, nuevamente descendió. Esto también fué evidente debido a que el pH sólo se reestableció momentáneamente después de adicionar NaOH (aprox. a las 280 h; adición indicada por las flechas abiertas). El medio se adicionó con el fin de proveer al cultivo nutrientes, distintos a la GLC, que pudieran estar limitando el crecimiento. Sin embargo, estos datos sugieren que no hubo limitación de algún nutriente, sino que posiblemente los niveles de tóxicos eran altos. Por ejemplo, el LAC alcanzó una concentración superior a 2.5 g/l y fué similar a las observadas en los cultivos con exceso de GLN y GLC (ver figuras 2 y 5). El OD se controló satisfactoriamente a 50%, con respecto a la saturación con aire, mediante la variación en las composiciones de oxígeno y nitrógeno en la mezcla de gases.

En la tabla 6 se resumen los parámetros cinéticos y estequiométricos de este cultivo (cultivo suplementado selectivamente con GLC) y de los cultivos antes discutidos. Se observó que la densidad celular máxima fué similar a la observada en el cultivo estático con exceso de GLN y GLC, pero mayor comparada con el resto de los cultivos estáticos y agitados por lote (ver tabla 6). En cambio, la μ fué menor que cualquiera de las μ observadas en los cultivos por lote. Los coeficientes metabólicos de LAC y GLC fueron menores comparados con los coeficientes observados para el resto de los cultivos por lote, salvo para el cultivo agitado bajo limitación de GLC. El rendimiento aparente de LAC/GLC fué menor que los observados para los cultivos por lote, salvo en los cultivos agitados bajo limitación de GLN donde estuvo dentro del intervalo observado. En este cultivo suplementado, se alcanzó la más alta concentración de AcM. La r_{AcM} fué mayor que las observadas para los cultivos por lote, salvo en el cultivo agitado con exceso de GLN y GLC. En cambio, la q_{AcM} fué mayor sólo para los cultivos con exceso de GLN y GLC y para el cultivo agitado bajo limitación de GLC. Por último, la μ , el Y'_{LG} y la concentración final de AcM fueron mayores con respecto a los valores observados para el cultivo suplementado con GLN (ver tabla 6). En cambio, X_{max} , q_G , q_L , q_{AcM} y r_{AcM} fueron menores que en el cultivo suplementado con GLN.

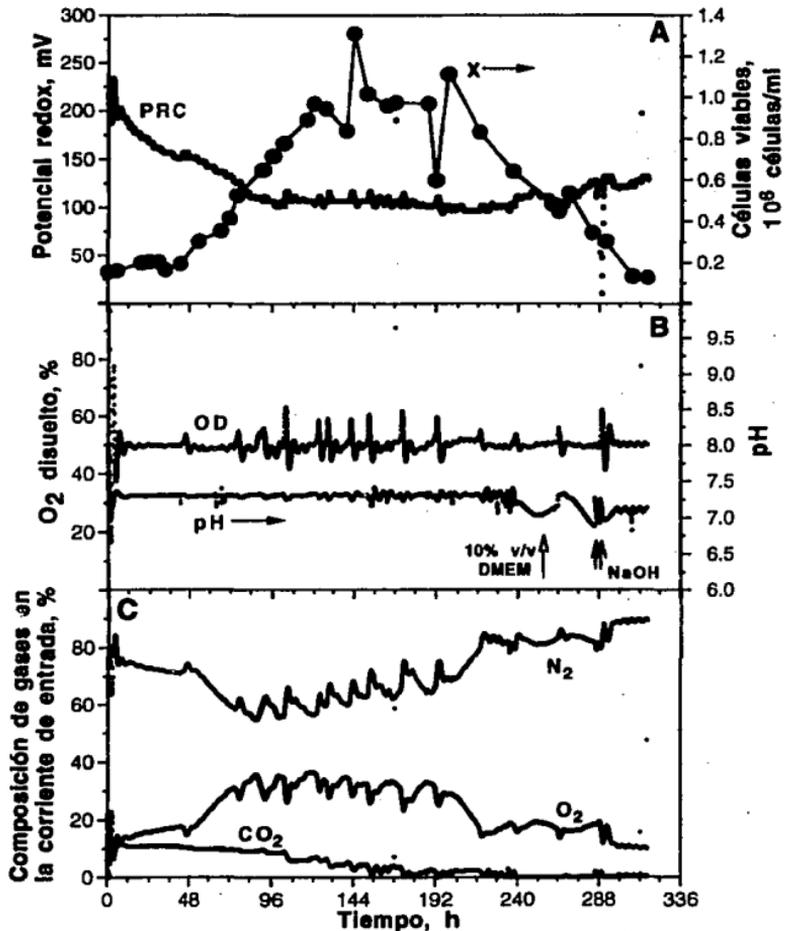


Figura 20. Perfiles de variables adquiridas y de control en un cultivo suplementado selectivamente con glucosa. Las flechas verticales denotan adición de base o de medio de cultivo completo. Los datos corresponden al cultivo mostrado en la figura 18.

5.2 DISTINCION ENTRE EVENTOS METABOLICOS Y EVENTOS OPERACIONALES

Ambos eventos, agotamiento de GLN y agotamiento de GLC, pueden distinguirse desde el punto de vista metabólico mediante el cálculo de la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}), reportada en la figura 21 como los perfiles normalizados de $q_{O_2}/q_{O_2,max}$ para los cultivos limitados de GLC y GLN (mostrados en las figuras 6 y 10, respectivamente). Se observó una marcada diferencia entre ambos perfiles. Al agotarse la GLN (indicado como tiempo cero y por la línea punteada vertical), que es la principal fuente de energía, ocurrió un rápido cese en la respiración celular y la VCO disminuyó (ver figura 7) ya que q_{O_2} disminuyó. Por el contrario, durante el agotamiento de GLC (indicado como tiempo cero y por la línea punteada vertical), la $q_{O_2}/q_{O_2,max}$ permaneció relativamente constante aunque la VCO disminuyó (ver figura 11) debido a la disminución en la concentración de células viables totales. De acuerdo con estos resultados, un algoritmo de control basado en la $q_{O_2}/q_{O_2,max}$ podría distinguir entre ambos eventos metabólicos. Es decir, se podría determinar la magnitud del cambio en la $q_{O_2}/q_{O_2,max}$ (la pendiente de $q_{O_2}/q_{O_2,max}$ contra tiempo). Un valor absoluto alto, de la pendiente de $q_{O_2}/q_{O_2,max}$ contra tiempo, indicaría agotamiento de GLN, mientras que un valor absoluto bajo indicaría agotamiento de GLC. De esta forma, dicho algoritmo podría identificar cuál de los dos nutrientes se ha agotado cuando ambos se encuentran a bajas concentraciones. Los resultados mostrados en la figura 21 confirman que la GLC es utilizada preferentemente para la síntesis de nucleósidos y no como fuente energética.

Durante el desarrollo de los experimentos realizados en bioreactor, se observó que las mediciones en-línea del potencial redox del cultivo (PRC) podían darnos una indicación de la fase de crecimiento. Debe aclararse que el PRC es una medida potenciométrica del flujo de electrones entre el electrodo y el medio²². Es decir, es una medida de la facilidad con que una o varias sustancias capturan o liberan electrones. Cuando se observa un incremento en el PRC, ésto se interpreta como un aumento en el poder oxidante del medio. Durante los cultivos por lote, a pH y OD constante (figuras 9 y 13), se observó que el PRC provee una indicación confiable de la fase de crecimiento, observada como un decremento monótonico desde la inoculación hasta que se obtiene la concentración celular máxima y un valor relativamente constante durante la fase de muerte. En particular, la figura 9 (cultivo limitado de GLN) muestra que el PRC se mantuvo constante a partir de que se alcanzó la densidad celular máxima. En cambio, la figura 13 (cultivo limitado de GLC) muestra que el PRC se mantuvo relativamente constante horas después de que se alcanzó la densidad celular máxima, es decir, durante la fase de muerte. Por lo mismo, se decidió explorar el uso de estas mediciones de PRC como posible sensor auxiliar en las estrategias de adición de nutrientes, con el fin de distinguir entre agotamiento de

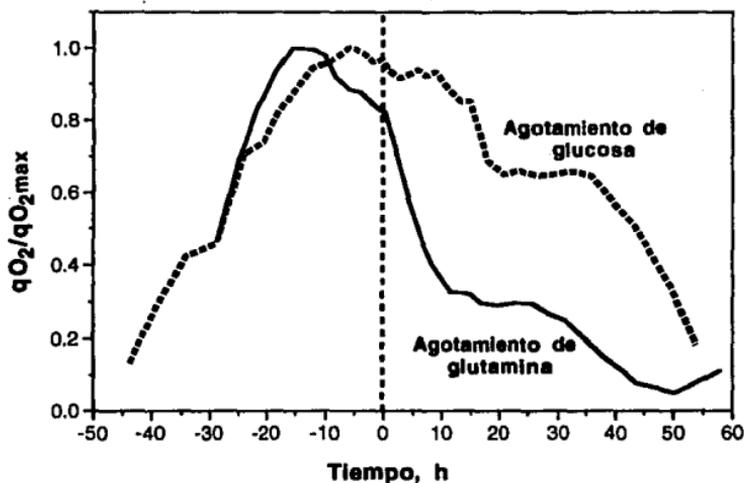


Figura 21. Perfiles de consumo específico de oxígeno para cultivos limitados. La línea vertical punteada y el tiempo cero denotan el tiempo de agotamiento de GLC (figura 11) o de GLN (figura 7). Los valores negativos de tiempo indican el tiempo de cultivo transcurrido hasta antes del agotamiento. Los datos corresponden a los cultivos limitados de GLN (figura 6) y de GLC (figura 10), respectivamente.

GLN y GLC, así como entre eventos celulares reales y eventualidades operacionales.

Es bien sabido que la magnitud del PRC está dada por todos los pares redox que se encuentran presentes en el medio, principalmente por el par O_2/H_2O ^{23,61} y por la magnitud del pH^{35} tal y como lo describe la ecuación de Nernst. En la figura 22, se muestran dos experimentos independientes que indican tal efecto. En el primer experimento (figura 22A), el pH se mantuvo constante y el OD se osciló en un cultivo que contenía células sin limitación de nutrientes. La figura 22A muestra como varió el PRC al oscilar el OD. El comportamiento observado muestra que el PRC traza las variaciones del OD en forma directamente proporcional. Este es el comportamiento esperado ya que es bien sabido (por reportes de la literatura) que el par redox O_2/H_2O es el par principal durante fermentaciones de distintos microorganismos bajo condiciones de abundancia de nutrientes^{22,23,61}. En el segundo experimento (figura 22B), el OD se mantuvo constante y el pH se varió en un cultivo sin células y sin limitación de nutrientes. En este caso, el PRC trazó inversamente las variaciones del pH, tal como se esperarían. Sin embargo, como se aprecia en las figuras 9, 13, 17 y 20, el PRC no siguió el comportamiento esperado cuando ocurre un evento de agotamiento de nutriente y el pH y OD se mantienen relativamente constantes. Es decir, se observó que mientras el OD se mantuvo relativamente constante el PRC disminuyó gradualmente y que aún en los casos donde el OD sufrió una perturbación (debida a la acción de control) el PRC no trazó al perfil del OD. Estos resultados indican que el par O_2/H_2O no es el principal cuando se agota un nutriente y que otro par redox está contribuyendo en la magnitud decreciente del PRC durante esta situación. Observaciones similares han sido descritas por Oktyabr'skii y Smirnova^{35,36} y Kwong *et al.*²³ para *E. coli*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, y *C. glutamicum* en cultivos donde la fuente de carbono o de nitrógeno es limitante.

La importancia de estas observaciones se ilustra en las figuras 23, 24 y 25. Se muestran eventos operacionales como lo son los eventos de control de OD (figura 23A), eventualidades o fallas operacionales (figura 23B) y eventos metabólicos (figuras 24 y 25). Un evento de control se define como cualquier acción tomada por el sistema de adquisición y control de datos para mantener un parámetro a un valor fijado (*i.e.*, OD y pH). Una eventualidad operacional es un evento indeseable que causa una perturbación en el sistema de adquisición y control de datos, tal como una falla en el sensor de oxígeno o en el controlador de flujo másico de los gases de entrada, un aumento o disminución en la velocidad de agitación, una rotura en las tuberías de los tanques de gases de entrada o el agotamiento de uno de los gases, un aumento o disminución en la temperatura, etc.. Durante un evento de control o una eventualidad operacional, el PRC traza al OD de la manera esperada (figura 23). En particular, cualquier evento operacional que cause un cambio en el coeficiente $k_L a$ o en la concentración de saturación de oxígeno puede ocasionar el mismo cambio que ocasionaría el

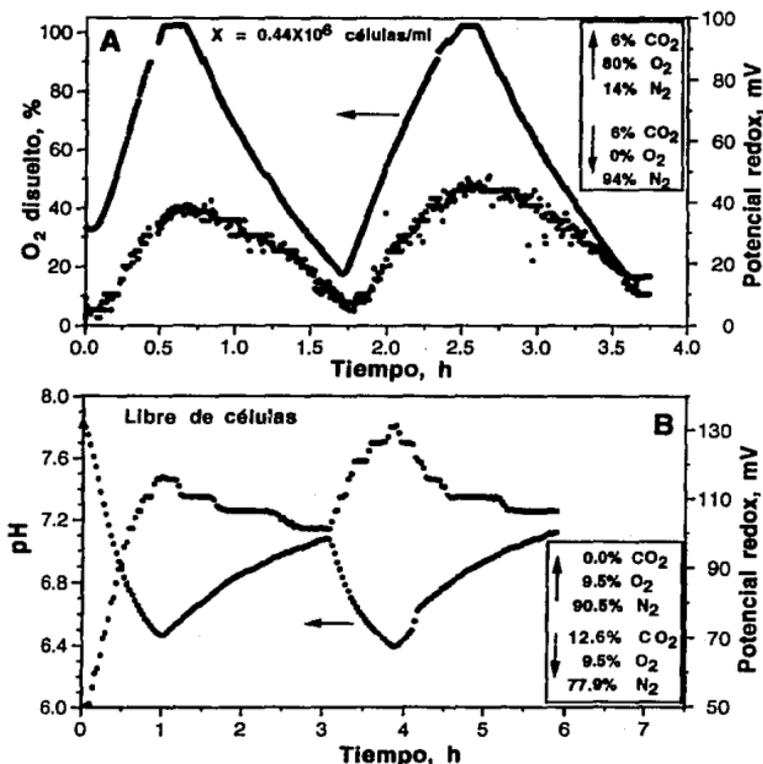


Figura 22. Efecto del oxígeno disuelto y pH sobre el potencial redox del cultivo. Los recuadros indican los cambios efectuados en la composición de los gases de entrada para lograr oscilaciones de oxígeno disuelto y pH. Las flechas de los recuadros indican el sentido de la oscilación lograda por dicho cambio en composición.

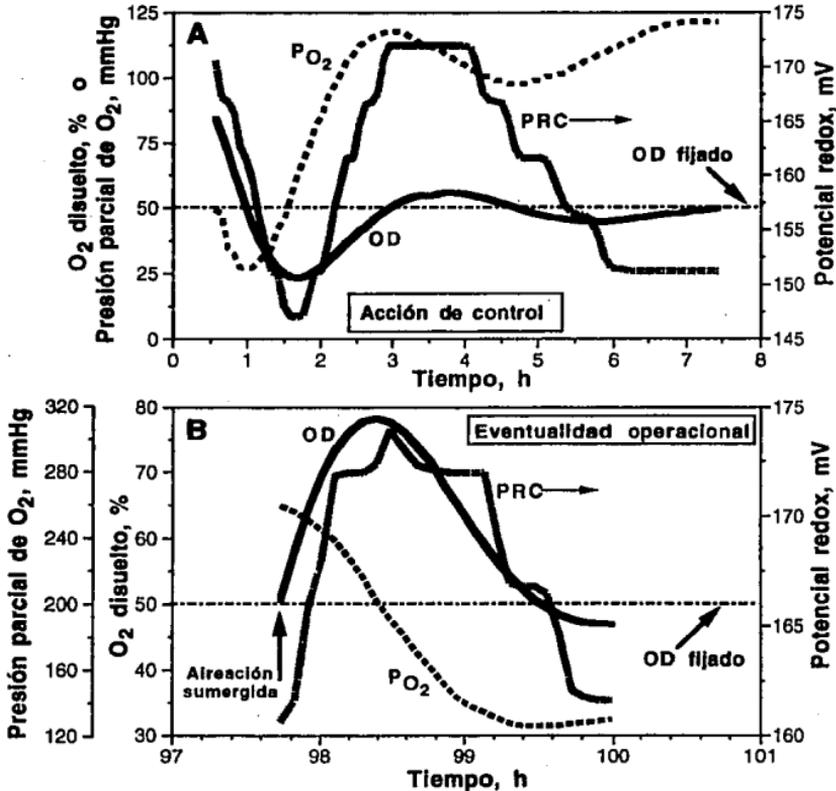


Figura 23. Perfiles de una acción de control y de una eventualidad operacional. Los datos corresponden al cultivo suplementado con GLN (figura 14). A) Acción de control tomada por el sistema debido a que el OD está por arriba del valor fijado. Control basado en el aumento o en la disminución de la pO_2 . B) Falla operacional debida al cambio entre aireación superficial y aireación sumergida. Debido al cambio, el OD aumenta y el sistema toma una acción de control para corregirlo (basado en el aumento o disminución de la pO_2).

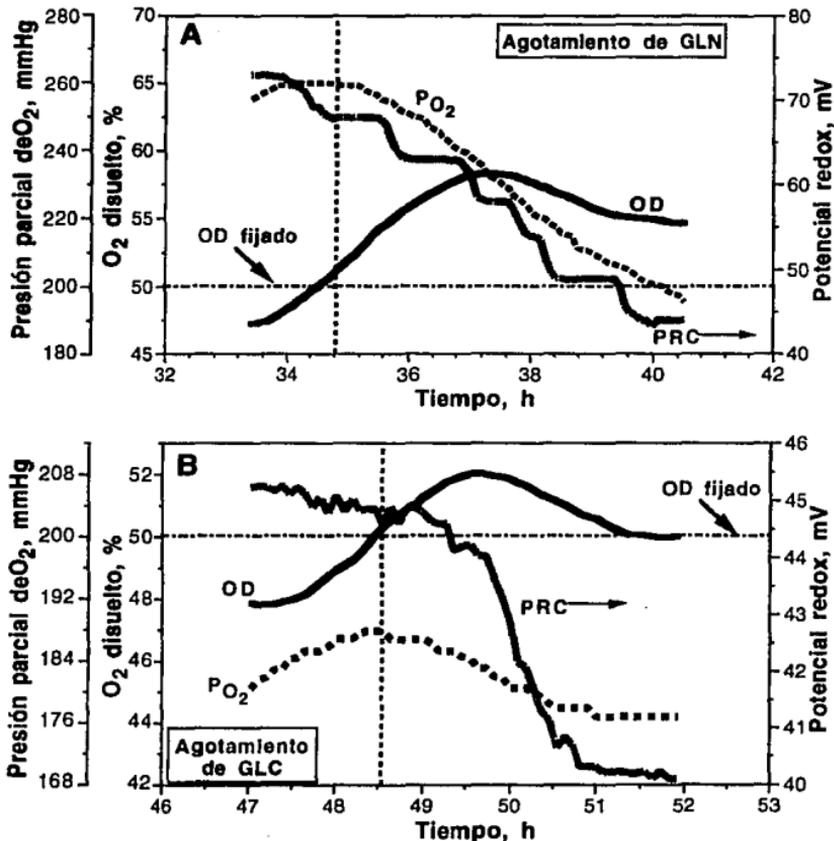


Figura 24. Perfiles de eventos metabólicos en cultivos por lote. El sistema toma una acción de control para corregir la perturbación originada en el OD durante la disminución en la VCO. A) Los datos corresponden al cultivo limitado de GLN de la figura 6 y la línea punteada vertical al tiempo de agotamiento de GLN. B) Los datos corresponden al cultivo limitado de GLC de la figura 10 y la línea punteada vertical al tiempo de agotamiento de GLC.

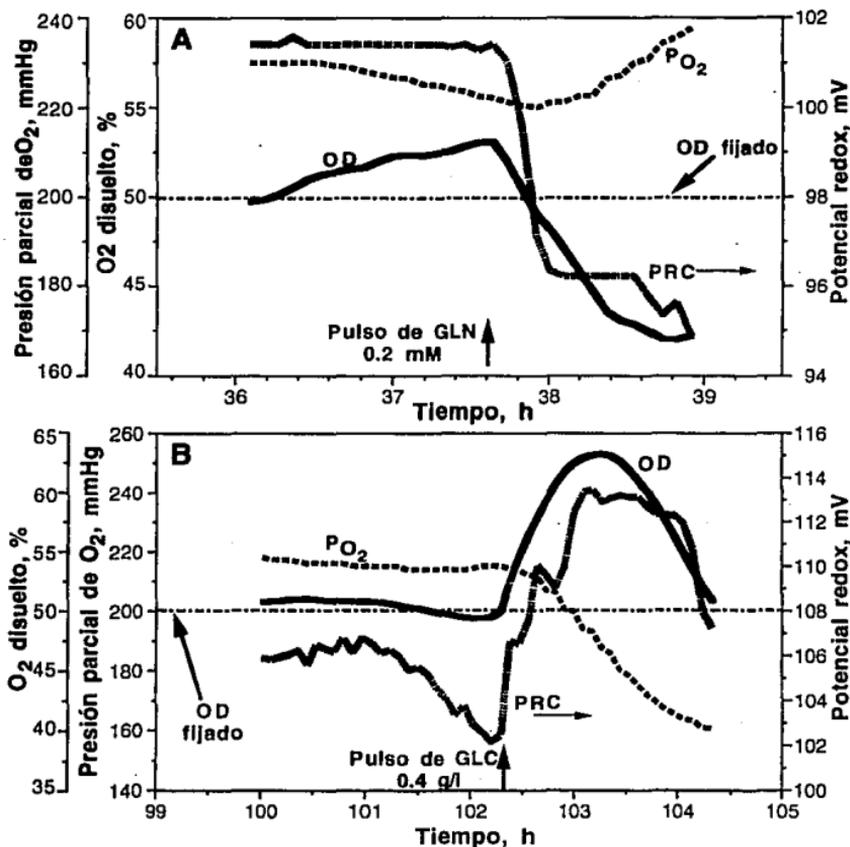


Figura 25. Perfiles de eventos metabólicos en cultivos suplementados. El sistema toma una acción de control para corregir la perturbación originada en el OD durante la disminución en la VCO. Los cultivos se encuentran limitados de sustrato hasta antes de dar el pulso (indicado por la flecha vertical en cada panel). A) Los datos corresponden a uno de los pulsos de GLN (figura 14). B) Los datos corresponden a uno de los pulsos de GLC (figura 18).

agotamiento de nutriente en el OD y en la presión parcial de oxígeno. Por ejemplo, la figura 23B muestra una eventualidad operacional debida al cambio entre aireación superficial y aireación sumergida, donde la concentración de saturación de oxígeno disminuye y es interpretada como una disminución en la VCO. Esta señal puede ser interpretada como agotamiento de nutriente ya que los algoritmos utilizados se basan exclusivamente en los balances de O_2 descritos en la sección 4.9.2. Sin embargo, como se ve en las figuras 24 y 25, el agotamiento de sustrato o evento metabólico se distingue porque el PRC no traza al OD. En la figura 25 el evento metabólico ocurre antes del pulso de sustrato, una vez dado el pulso no existe agotamiento y el PRC traza al OD. La figura 25 muestra sólo un ejemplo tomado de cada uno de los dos cultivos suplementados. Se puede apreciar que la dinámica de las mediciones en-línea del PRC podría aplicarse en algoritmos de control más avanzados que incluyan conceptos de inteligencia artificial que discriminen entre distintos tipos de eventos, como un evento metabólico y una eventualidad operacional. Tal algoritmo requiere de una serie de reglas bien definidas que la computadora pueda identificar fácilmente. Tales reglas han sido desarrolladas del análisis de todos los datos experimentales obtenidos (como por ejemplo los mostrados en las figuras 23 a 25) y se resumen en la tabla 8. Por ejemplo, el primer renglón de la tabla 8 indica que si la PO_2 disminuye y el OD aumenta (debido a la acción de control), entonces el PRC no deberá obedecer la ecuación (A) y, por lo tanto, se trata de un evento metabólico de agotamiento de sustrato.

Como se indicó en los antecedentes (sección 2.5), las únicas explicaciones que existen en cuanto al comportamiento anómalo del PRC y el OD durante el agotamiento de nutrientes, se basan en los cambios que ocurren en la concentración de tiores^{17,35,36} en el medio de cultivo y en la superficie celular, así como en la disminución del pH intracelular^{35,36}. Por otro lado, se sabe que los cambios del PRC reflejan cambios del potencial redox intracelular⁵². Por lo tanto, con el fin de establecer si el comportamiento anómalo del PRC, durante el agotamiento de sustrato, fué debido a cambios en el potencial redox intracelular y no a modificaciones de la composición del medio de cultivo, se decidió llevar a cabo estudios con inhibidores de la respiración y desacopladores del transporte de electrones.

Se sabe que durante la transición del metabolismo aeróbico a anaeróbico de híbridomas, ocurre un aumento en el NADH intracelular ya que su oxidación cesa⁵². Dado que los híbridomas utilizan preferencialmente la GLN como sustrato indispensable para la oxidación fosforilativa¹¹, el agotamiento de tal aminoácido, en presencia de GLC, deberá traer como consecuencia una transición de metabolismo aeróbico a uno basado fundamentalmente en la glicólisis para la generación de ATP (ver figura 1). Por lo tanto, sería de esperarse que el NADH se acumulara durante tal situación, lo cual se vería reflejado en un descenso del potencial redox intracelular y, por ende, en un descenso del PRC. De igual forma, un agotamiento de la GLC disminuiría la concentración de intermediarios glicolíticos

Tabla 8. Resumen de reglas para la distinción entre eventos metabólicos y eventualidades operacionales

PO_2	O ₂ disuelto	PRC	EVENTO
↓	↑	No obedece (A)	Agotamiento de sustrato
↓	↑	Obedece (A)	Eventualidad operacional
↓	↓	Obedece (A)	Control de OD (por arriba del valor fijado)
↑	↑/↓	Obedece (A)	Control de OD (por debajo del valor fijado)
↔	↔	Obedece (B)	Control de pH (por arriba o debajo del valor fijado)
OTRAS COMBINACIONES		Triviales para la adición de sustrato	

$$PRC = a \text{ LN}(\text{OD}) + b \dots\dots\dots (A)$$

$$PRC = c - 61.6(\Delta\text{pH}) \dots\dots\dots (B)$$

NOTAS:	↓	significa "disminuye"
	↑	significa "aumenta"
	↑/↓	significa "aumenta o disminuye"
	↔	significa "permanece constante"
	Obedece	significa que traza el perfil esperado según las ecuaciones (A) o (B). Estas ecuaciones corresponden a las descritas en la sección 4.9.3 de Materiales y Métodos (ver ecuaciones 12 y 14).
	"No obedece"	significa que no traza los perfiles esperados

(en particular, fosfoenolpiruvato) ya que se sabe que la piruvato cinasa (PK) en hibridomas presenta muy baja afinidad por fosfoenolpiruvato¹¹ (alta constante de afinidad). Durante el agotamiento de GLC, se esperaría entonces una acumulación del NADH citosólico debido al cese de la formación de piruvato, ya que la PK estaría funcionalmente inactiva¹¹ (ver figura 1). Asimismo, dado que se sabe que en células cancerosas el transportador de equivalentes reductores (malato/aspartato) es defectuoso¹¹, el NAD⁺ mitocondrial no podría regenerar el NADH citosólico.

Se sabe que tanto la rotenona (agente inhibidor de la cadena de transporte de electrones¹⁶) como el 2,4-dinitrofenol (desacoplador respiratorio¹⁶) inhiben a nivel del sitio I del transporte de electrones (ubiquinona) bloqueando la oxidación de NADH y ocasionando su acumulación⁶⁵. Por lo tanto, sería de esperarse que si el comportamiento anómalo del PRC con respecto al OD es ocasionado por la acumulación de NADH intracelular, entonces tal comportamiento podría ser simulado por pulsos de rotenona o de 2-4-dinitrofenol en cultivos de hibridomas. Sin embargo, como se observa en la figura 26, el PRC trazó perfectamente al perfil del OD durante los pulsos de cada uno de los inhibidores. Por lo mismo, se puede concluir que el comportamiento anómalo PRC-OD no parece estar relacionado con cambios de potencial redox intracelular. Asimismo, tales resultados refuerzan las conclusiones de Oktyabr'skii y Smirnova^{35,36} en cuanto a que el comportamiento anómalo PRC-OD es debido a la acumulación extracelular de grupos tiol.

Además de estos experimentos, se realizó otro experimento en bioreactor en donde se dieron pulsos de LAC, AMM o agua con el fin de indagar si existe algún efecto de estos componentes sobre el PRC. En la figura 27 se observa el PRC adquirido durante cada etapa experimental, el corregido en base a los cambios sufridos en el pH y el esperado en base al comportamiento del OD. Para ver el efecto de la adición de agua sobre el PRC, ésta se adicionó a un flujo de 2 ml/h durante las primeras 6 horas, a un flujo de 4 ml/h las siguientes 13 horas y a un flujo de 27 ml/h de las 19 a las 22 horas de esta etapa experimental. De los datos mostrados en la figura 27A, se puede decir que la adición de agua afectó muy poco al PRC ya que una vez corregido por los cambios sufridos en el pH, el PRC es muy parecido al perfil esperado. Posiblemente a flujos muy altos de agua (o dilución de medio) se vea un efecto significativo, como por ejemplo, al final de esta etapa experimental.

Para el caso del AMM (figura 27B), se alimentó al bioreactor (en una segunda etapa experimental) una solución acuosa de cloruro de AMM (100mM) a un flujo de 0.5 ml/h durante 48 horas. Se puede apreciar que, salvo por el desfazamiento con el perfil esperado, la adición de AMM no ocasionó un efecto significativo en el PRC. Posiblemente a concentraciones mayores se obtenga un cambio más drástico, aunque su acumulación no lo causó y ésto se acerca más a lo observado durante

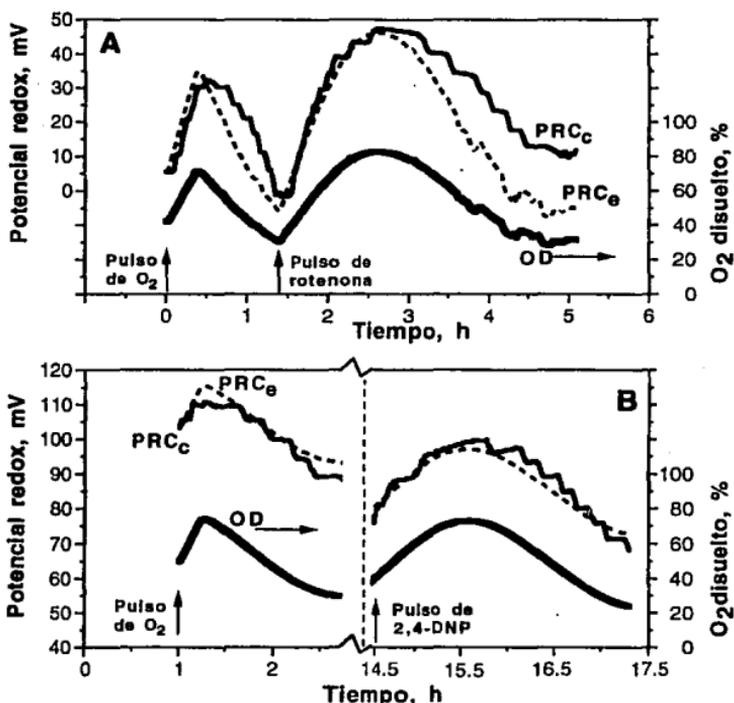


Figura 26. Perfiles de cultivos perturbados con rotenona o 2,4-dinitrofenol. PRC_c y PRC_e son los perfiles del potencial redox corregido (para variaciones de pH, ec. 12) y estimado (en base a la variación del OD, ec. 13), respectivamente. Los pulsos de oxígeno se dieron en base a cambios en la composición de los gases de entrada (ver figura 22), con el fin de comparar los efectos del O₂, desacoplamiento e inhibición respiratoria sobre el PRC y posteriormente comparar resultados con los correspondientes a los eventos metabólicos (ver figuras 24 y 25).
 A) Concentración final de rotenona: 5 μM.
 B) Concentración final de 2,4-DNP: 2 mM.

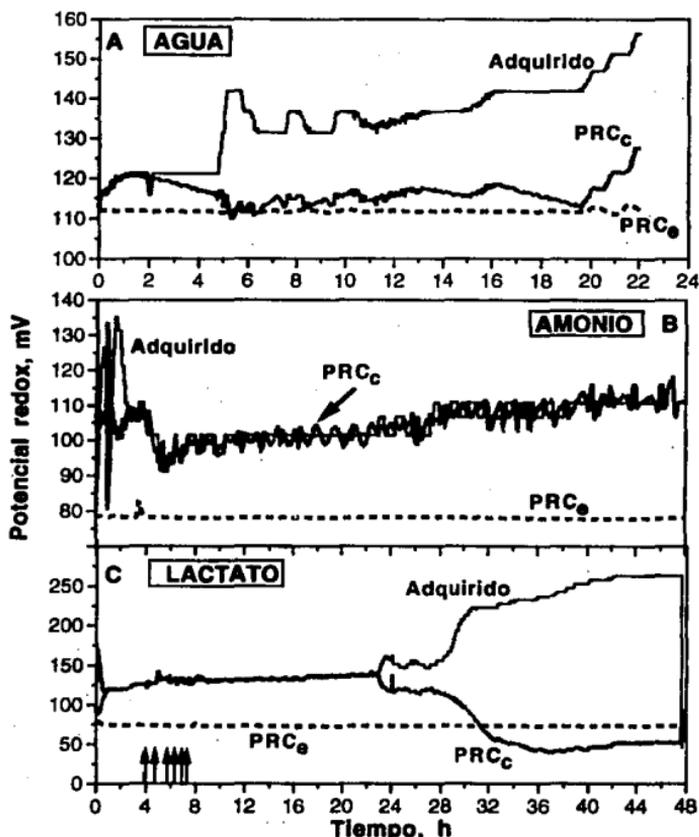


Figura 27. Efecto del agua, amonio y lactato sobre el potencial redox del cultivo. (PRC, ref. figura 26) Adiciones a un cultivo por lote con exceso de GLN y GLC. A) Adición continua de agua: 2ml/h de las 0 a las 6 h, 4 ml/h de las 6 a las 19 h y 27 ml/h de las 19 a las 22 h. B) Adición continua de cloruro de amonio 0.1M: 0.5 ml/h de las 0 a las 48 h. C) Adición de solución de lactato (63.4 g/l): 0.6 ml a las 4, 4.8, 5.8, 6.4, 7 y 7.4 h (pulsos indicados por las flechas verticales). Posteriormente, adición continua de LAC: 0.5 ml/h de las 8 a las 20 h y 0.7 ml/h de las 20 a las 48 h.

un cultivo. Por último, para el caso de LAC (tercera etapa experimental; figura 27C) se dieron 6 pulsos de 0.6 ml con una solución acuosa de LAC de 63.4 g/l (pulsos indicados por las flechas verticales en la parte inferior de la figura 27). Posteriormente, se alimentó dicha solución a 0.5 ml/h durante 12 horas y luego a 0.7 ml/h durante 28 horas. Como se puede apreciar en la figura 27C, durante las primeras 22 h no hubo cambio en el PRC (sólo esta desfazado con respecto al esperado). Después de este período, el pH y el PRC adquirido sufrieron un cambio apreciable, al igual que el PRC corregido por dicho cambio en el pH. Las concentraciones de LAC alcanzadas hasta las 22, 28, 36 y 48 h fueron de 1.55, 2, 2.5 y 3.3 g/l, respectivamente. Solamente se alcanzan concentraciones de LAC superiores a 1.5 g/l después de la fase exponencial de crecimiento en cultivos por lote con exceso de GLC (figuras 2, 3, 5 y 6) y eventualmente en los cultivos suplementados donde se alcanzan concentraciones de LAC de 2 y 2.8 g/l (figuras 14 y 18, respectivamente). Esto nos sugiere que a partir de cierta concentración acumulada de LAC (mayor a 1.55 g/l), la presencia de éste afecta notablemente al PRC. Esto puede interferir notablemente en la medición de PRC por lo que sería conveniente encontrar una correlación entre el PRC y la secreción de LAC con el fin de corregir por dicho efecto, o bien optimizar aún más el control de GLC para así mantener la concentración de LAC por debajo de 1.55 g/l.

Estos últimos experimentos solamente aclaran algunos de los factores que no son responsables del comportamiento "anómalo" del PRC durante el agotamiento de sustrato. Por lo tanto, es necesaria mayor investigación al respecto para poder plantear una posible explicación del fenómeno observado. No obstante, para los propósitos del desarrollo de algoritmos de control, que discriminen entre eventos operacionales y metabólicos, es suficiente que se tenga la certeza de la reproducibilidad del fenómeno aunque su explicación no sea del todo completa.

CAPITULO VI CONCLUSIONES

Se puede concluir en forma general que los resultados de este trabajo muestran una alternativa simple para la optimización de la producción de AcM a través de estrategias de operación de cultivos *in vitro* de hibridomas. Las estrategias de operación fueron presentadas en forma aislada. Sin embargo, si estas estrategias son aplicadas en conjunto, la producción de AcM se verá notablemente incrementada. Este conjunto de estrategias incluye la suplementación selectiva de GLN y GLC, la distinción del nutriente limitante en tiempo real, la distinción entre eventos metabólicos y eventualidades operacionales, y el control del OD y el pH. Es decir, la operación de cultivos a bajas concentraciones de GLN y GLC necesariamente repercutirá en la optimización de la producción de AcM. Se prolongaran las fases de crecimiento exponencial y estacionaria y, por lo mismo, aumentaran la densidad celular, el índice de viabilidad, la concentración final de AcM y la productividad. La importancia de este conjunto de estrategias también radica en que se podría emplear para otras líneas celulares e incluso para otro tipo de bioreactor. Un futuro trabajo podría abarcar la implementación de este conjunto de estrategias y/o la búsqueda de otras estrategias de operación orientadas al uso optimizado de otros componentes (*i.e.*, otros aminoácidos, otros carbohidratos, sueros, etc.). Además de la GLN y la GLC, existen otros componentes que son indispensables para la proliferación celular. Por ejemplo, el suero provee una variedad de componentes necesarios para el mantenimiento del cultivo de hibridomas. Sin embargo, su uso presenta serias desventajas a nivel de producción, purificación y costo del proceso (ver apéndice H). En los apéndices H e I se presentan algunas alternativas que podrían permitir la aplicación de estrategias de operación para la eliminación del suero.

Las conclusiones específicas de este trabajo se resumen a continuación:

1.- Si se mantiene constante el OD, existe una relación directa entre la pO_2 , la VCO y la velocidad de consumo de nutrientes. Basandose en el comportamiento dinámico de la pO_2 , es posible determinar en-línea el agotamiento de GLN y GLC. Por lo mismo, el agotamiento de GLN o GLC fué indicado por un súbito descenso en la pO_2 y por una perturbación simultánea en el control de OD.

2.- Al suplementar GLN, cuando ocurre un cese en la respiración celular, se reestablece la VCO previo al agotamiento de GLN. Con la adición repetida de GLN, a concentraciones por debajo de 2 mM, se obtuvo un incremento del 100% en la concentración celular máxima y hasta un incremento del 800% en la concentración máxima de AcM y en la productividad de AcM, con respecto al cultivo agitado bajo limitación de GLN. Adicionalmente, con la adición repetida de GLN, se prolongó notablemente la fase exponencial de crecimiento.

3.- Al suplementar GLC, cuando ocurre un cese en el crecimiento celular y una disminución en la respiración, se reestablecen tanto el crecimiento como la VCO a los valores previos al agotamiento de GLC. Con la adición repetida de GLC, a concentraciones por debajo de 0.6 g/l, se obtuvo un incremento del 600% en la concentración celular máxima, un incremento del 600% en la concentración máxima de AcM y casi un 300% en la productividad de AcM, con respecto al cultivo agitado bajo limitación de GLC. Adicionalmente, con la adición repetida de GLC, se prolongó notablemente la fase estacionaria.

4.- La adición automatizada y programada de nutrientes evita el agotamiento de la fuente de energía o carbono. Adicionalmente, evita la acumulación excesiva de LAC y AMM.

5.- La GLN no puede sustituir a la GLC como fuente de carbono. La GLC y el glutamato no pueden sustituir a la GLN como fuente energética.

6.- Existen eventos operacionales (fallas eléctricas y mecánicas) que perturban al sistema dando señales de VCO que son similares a las esperadas cuando se agota un sustrato (evento metabólico) y se usan algoritmos de control basados exclusivamente en balances de O_2 . El PRC provee una medición útil que permite distinguir entre estos eventos. Por lo mismo, las mediciones en-línea del PRC pueden ser utilizadas como un sensor para algoritmos con control más avanzado.

7.- Durante los cultivos de hibridomas por lote, a OD y pH constantes, el PRC da una indicación confiable de la fase de crecimiento. En general, se observa un descenso monótonico desde la inoculación hasta la obtención de la densidad celular máxima y un valor relativamente constante durante la fase de muerte.

8.- El PRC depende, además de las variaciones en el OD y el pH, de la variación en la concentración de LAC cuando ésta es superior a 1.6 g/l.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar-Aguila A., Valentinotti S., Galindo E. y Ramírez O.T. (1993) Desarrollo de un sistema amigable y versátil para adquisición de datos y control de bioreactores. *Biotecnología*. **3**: 130-139.
2. Altshuler G.L., Dzielwski D.M., Soweck J.A. and Belfort G. (1986) Continuous Hybridoma growth and monoclonal antibody production in hollow fiber reactors-separators. *Biotechnology and Bioengineering* **28**: 646-658.
3. Backer M.P., Metzger L.S., Slaber P.L., Nevitt K.L. and Boder G.B. (1988) Large scale production of monoclonal antibodies in suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering* **32**: 993-1000.
4. Bibila T.A., Ranucci C.S., Glazomitsky K., Buckland B.C. and Aunins J.G. (1994) Monoclonal antibody process development using medium concentrates. *Biotechnology Progress* **10**: 87-96.
5. Calderón J. (1985) Tecnología de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. En: *Prospectiva de la biotecnología en México*. Quintero R. (ed.) *Fundación Javier Barros Sierra, A.C. y CONACYT* 201-218.
6. Choi C.Y., Jeh H.S. and Park S.J. (1988) Development of low-serum medium for the large scale culture of mouse X mouse hybridoma. *196th American Chemical Society Meeting*. Abstract No. MBTD124
7. Dahod S.K. (1982) Redox potential as a better substitute for dissolved oxygen in fermentation process control. *Biotechnology and Bioengineering* **24**: 2123-2125.
8. Dalili M. and Ollis D.F. (1989) Transient kinetics of hybridoma growth and monoclonal antibody production in serum-limited cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **33**: 984-990.
9. Dean R., Karkare S., Phillips P., Ray N. and Runstadler P. (1986) Continuous cell culture with fluidized sponge beads for large-scale production of medical proteins. *Verax Co. CID-67D*.
10. Duval D., Demangel C., Munier-Jolain K., Miossec S. and Geahel I. (1991) Factors controlling cell proliferation and antibody production in mouse hybridoma cells: I. Influence of the amino acid supply. *Biotechnology and Bioengineering* **38**: 561-570.
11. Eigenbrodt E., Fister P. and Reinacher M. (1985) New perspectives on carbohydrate metabolism in tumor cells. En: *Regulation of carbohydrate metabolism*. Beiter R. (ed.) *CRC Press, Boca Raton, FL* **2**: 141-179.
12. Frame K.K. and Hu W.S. (1990) The loss of antibody productivity in continuous culture of hybridoma cells. *Biotechnology and Bioengineering* **35**: 469-476.
13. Glacken M.W., Fleishacker R.J., and Sinskey A.J. (1986) Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering* **28**: 1376-1389.

Bibliografia

14. Glacken M.W., Adema E. and Sinskey A.J. (1988) Mathematical descriptions of hybridoma culture kinetics: I. Initial metabolic rates. *Biotechnology and Bioengineering* **32**: 491-506.
15. Goding J.W. (1986) Monoclonal antibodies: principles and practice. *Academic Press Inc., NY* 59-103.
16. Gregg C.T. (1971) Some aspects of the energy metabolism of mammalian cells. En: Growth, nutrient and metabolism of cells in culture. Rothblat G. and Cristofalo V. (eds.) *Academic Press Inc., NY* 1: 83-136.
17. Hwang C. and Sinskey A.J. (1991) The role of oxidation-reduction potential in monitoring growth of cultured mammalian cells. *10th European Society for Animal Cell Technology Meeting*. 548-568
18. Jo E.C., Kim D.I. and Moon H.M. (1993) Step-fortifications of nutrients in mammalian cell culture. *Biotechnology and Bioengineering* **42**: 1218-1228.
19. Karkare S.B., Phillips P.G., Burke D.H. and Dean R.C. (1985) Continuous production of monoclonal antibodies by chemostatic and immobilized hybridoma culture. En: Large scale mammalian cell culture. Feder J. and Tolbert W.R. (eds.) *Academic Press Inc., NY* 127-149.
20. Kjaergaard L. (1977) The redox potential: Its use and control in biotechnology. En: Advances in Biochemical Engineering. Ghose T.K., Fiechter A. and Blakebrough N. (eds.) *Sprinter-Verlag, NY* 1: 131-150.
21. Kurokawa H., Ogawa T., Kamihira M., Park Y.S., Iijima S. and Kobayashi T. (1993) Kinetic study of hybridoma metabolism and antibody production in continuous culture using serum-free medium. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **76**: 128-133.
22. Kwong C.W. and Rao G. (1992) Effect of reducing agents in an aerobic amino acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* **40**: 851-857.
23. Kwong S.C.W., Randers L. and Rao G. (1992) On-line assessment of metabolic activities based on culture redox potential and dissolved oxygen profiles during aerobic fermentation. *Biotechnology Progress* **8**: 576-579.
24. Lauffenburger D. and Cozens C. (1989) Regulation of mammalian cell growth by autocrine growth factors: analysis of consequences for inoculum cell density effects. *Biotechnology and Bioengineering* **33**: 1365-1378.
25. Lavery M. and Nienow A.W. (1987) Oxygen transfer in animal cell culture medium. *Biotechnology and Bioengineering*. **30**: 368-373
26. Luan Y.T., Mutharasan R. and Magee W.E. (1987) Strategies to extend longevity of hybridomas in culture and promote yield of monoclonal antibodies. *Biotechnology Letters* **9**: 691-696.
27. Marcipar A., Henno P., Lentwojt E., Rosseto A. and Braun G. (1983) Ceramic-supported hybridomas for continuous production of monoclonal antibodies. *Annals of the New York Academy of Sciences, NY* 416-420.
28. Martens D.E., de Gooijer C.D., Velden-de Groot C.A.M., Beuvery E.C. and Tramper J. (1993) Effect of dilution rate on growth, productivity, cell cycle and size and shear sensitivity of a hybridoma cell in a continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering* **41**: 429-439.

29. McKeehan W.L. (1982) Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biology International Reports* 6: 635-650.
30. Merten O., Reiter S., Himmler G., Sherier W. and Katinger H. (1985) Production kinetics of monoclonal antibodies in a cyostat. *Develop. Biol. Standard.* 60: 219-227.
31. Miller M.W., Blanch W.H., and Wilkie C.R. (1988) A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH. *Biotechnology and Bioengineering* 32: 947-965.
32. Miller W.M., Wilke C.R. and Blanch H.W. (1988) Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. *Bioprocess Engineering* 3: 113-122.
33. Miller W.M. and Blanch H.W. (1991) Regulation of animal cell metabolism in bioreactors. En: Animal cell bioreactors. Ho, C.S. and Wang, D.I.C. (eds.) *Butterworth-Heinemann, USA.* 6: 119-161
34. Morgan M.J. and Faik P. (1981) Carbohydrate metabolism in cultured animal cells. *Bioscience Reports* 1: 669-686.
35. Oktyabr'skii, O.N. and Sminorva, G.V. (1989) Dynamics of redox potential in bacterial cultures growing on media containing different sources of carbon, energy and nitrogen. *Acta Biotechnol.* 9: 203-209.
36. Oktyabr'skii O.N. and Smirnova G.V. (1989) Changes in the redox potential and number of accessible SH groups in cultures of *E. coli* and *B. subtilis* during transient processes. *Biochimiya* 1749-1755.
37. Ozturk S.S. and Palsson B.O. (1990) Effect of initial cell density on hybridoma growth, metabolism, and monoclonal antibody production. *Journal of Biotechnology* 16: 259-278.
38. Ozturk S.S. and Palsson B.O. (1991) Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. *Biotechnology Progress* 7: 481-494.
39. Ozturk S.S. and Palsson B.O. (1991) Effects of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 989-993.
40. Ozturk S.S., Riley M.R. and Palsson B.O. (1992) Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering* 39: 418-431.
41. Patterson M.K. Jr. (1979) Measurement of growth and viability of cells in culture. *Methods in Enzymology* 58: 141-147.
42. Qu L. and Phillips J.A. (1993) Kinetic analysis and enhancement of antibody productivity in batch hybridoma culture. *National AIChE Meeting, St. Louis, MO.* Paper No. 100d7.
43. Ramfrez O.T., Magee W.E. and Mutharasan R. (1987) A novel immobilized hybridoma reactor for the production of monoclonal antibodies. *Biotechnology Techniques* 1: 245-250.
44. Ramfrez O.T., Sureshkumar G.K. and Mutharasan R (1990) Bovine colostrum or milk as serum substitute for the cultivation of mouse hybridoma. *Biotechnology and Bioengineering* 35: 882-889.

45. Ramírez O.T. and Mutharasan R. (1990) Cell cycle- and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **36**: 839-848.
46. Ramírez O.T. and Mutharasan R. (1990) The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress. *Biotechnology and Bioengineering* **36**: 911-920.
47. Ramírez O.T. (1994) Cultivo de hibridomas a gran escala para la producción in vitro de anticuerpos monoclonales. En: Escalamiento de procesos biotecnológicos. López-Munguía A. y Quintero R. (eds.) *Universidad de las Naciones Unidas (en prensa)*.
48. Renard J.M., Spangoli R., Mazier C, Salles M.F. and Mandine E. (1988) Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable cells in batch systems. *Biotechnology Letters* **10**: 91-96.
49. Reuveny S., Velez D., Riske F., MacMillian J. and Miller L. (1985) Production of monoclonal antibodies in culture. *Develop. Biol. Standard.* **60**: 185-197.
50. Rupp R.G. (1985) Use of cellular microencapsulation in large-scale antibody production. En: *Large scale mammalian cell culture*. Feder J. and Tolbert W.R. (eds.) Academic Press Inc., NY 10-38.
51. Schneider, I. (1992) Update on current fermentation control software packages and systems. *Genetic Engineering News* **8**: 10-11.
52. Siano S.A. and Mutharasan R. (1991) NADH fluorescence and oxygen uptake responses of hybridoma cultures to substrate pulse and step changes. *Biotechnology and Bioengineering* **37**: 141-159.
53. Slocum R.H. and Cummings J.G. (1991) Amino acid analysis of physiological samples. En: *Techniques in diagnostics human biochemical genetics: a laboratory manual*. Wiley-Liss Inc., NY 87-126.
54. Suzuki E. and Ollis D.F. (1989) Cell cycle model for antibody production kinetics. *Biotechnology and Bioengineering* **34**: 1398-1402.
55. Takazawa Y., Tokashiki M., Murakami H., Yamada K. and Omura H. (1988) High-density culture of mouse-human hybridoma in serum-free defined medium. *Biotechnology and Bioengineering* **31**: 168-172.
56. Thalley B. S. and Carroll S. B. (1990) Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens. *BioTechnology* **8**: 934-938.
57. Tremblay M. Perrier M. Chavarie C. and Archambault J. (1992) Optimization of fed-batch culture of hybridoma cells using dynamic programming: single and multi feed cases. *Bioprocess Engineering* **7**: 229-234.
58. Tremblay M., Perrier M., Chavarie C. and Archambault J. (1993) Fed-batch culture of hybridoma cells: comparison of optimal control approach and closed loop strategies. *Bioprocess Engineering* **9**: 13-21.
59. Weimann M., Ball E., Fanger M., Dexter D., McIntyre O., Bernier E., and Calabresi P. (1983) Human and murine hybridomas: growth and monoclonal antibody production in the artificial capillary culture system. (Abstract) *Clinical Research* **31**: 2.

60. Williams D. (1988) Problems of measurement and control in biotechnological processes. En: *Chemical Engineering Problems in Biotechnology*. Winkler M. A. (ed.) *American Institute of Chemical Engineers, NY* 4: 167-213.
61. Wimpenny J.W.T. (1976) Can culture redox potential be a useful indicator of oxidation metabolism by microorganism? *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology* 26: 48-49.
62. Xie L. and Wang D.I.C. (1994) Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor. *Cybiotechnology (in press)*.
63. Zamudio F., Saavedra R., Martín B. M., Gurrola-Briones G., Herion P. and Possani L. D. (1992) Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Eur. J. Biochem.* 204: 281-292.
64. Zhou W. and Hu W.S. (1994) Optimization of fed-batch mammalian cell culture processes. En: *Advances in Bioprocess Engineering*. Galindo E. and Ramírez O.T. (eds.) *Kluwer Academic Publishers, The Netherlands* 109-113.
65. Zollner H. (1993) Handbook of enzyme inhibitors. *VCH Publishers, Weinheim (Federal Republic of Germany)* B: 705, 949.

APÉNDICES

**APENDICE A
FORMULACIONES**

Tabla A1. Composición del medio de cultivo básico (DMEM, Sigma D-5030)

COMPONENTE	g/L
L-Arginina-HCl	0.0840
L-Cistina-2HCl	0.0626
Glicina	0.0300
L-Histidina-HCl·H ₂ O	0.0420
L-Isoleucina	0.1050
L-Leucina	0.1050
L-Lisina-HCl	0.1460
L-Metionina	0.0300
L-Phenilalanina	0.0660
L-Serina	0.0420
L-Treonina	0.0950
L-Triptofano	0.0160
L-Tirosina-2Na	0.1038
L-Valina	0.0940
Cloruro de colina	0.0040
Acido fólico	0.0040
Mio-Inositol	0.0072
Niacinamida	0.0040
Acido D-Pantoténico-Ca	0.0040
Piridoxal-HCl	0.0040
Rivoflavina	0.0004
Tiamina-HCl	0.0040
Cloruro de calcio-2H ₂ O	0.2650
Nitrato férrico-9H ₂ O	0.0001
Sulfato de Magnesio anhidro	0.1000
Cloruro de potasio	0.4000
Cloruro de Sodio	6.4000
Fosfato de sodio monobásico y anhidro	0.1090

Tabla A2. Composición de la solución de aminoácidos no esenciales (100X; Sigma M-7145)

L-Alanina-HCl	0.89 g/L
L-Asparagina	1.50 g/L
L-Aspártico	1.33 g/L
L-Glutámico	1.47 g/L
Glicina	0.75 g/L
L-Prolina	1.15 g/L
L-Serina	1.05 g/L

APENDICE B

SISTEMA DE CONTROL Y ADQUISICION DE DATOS

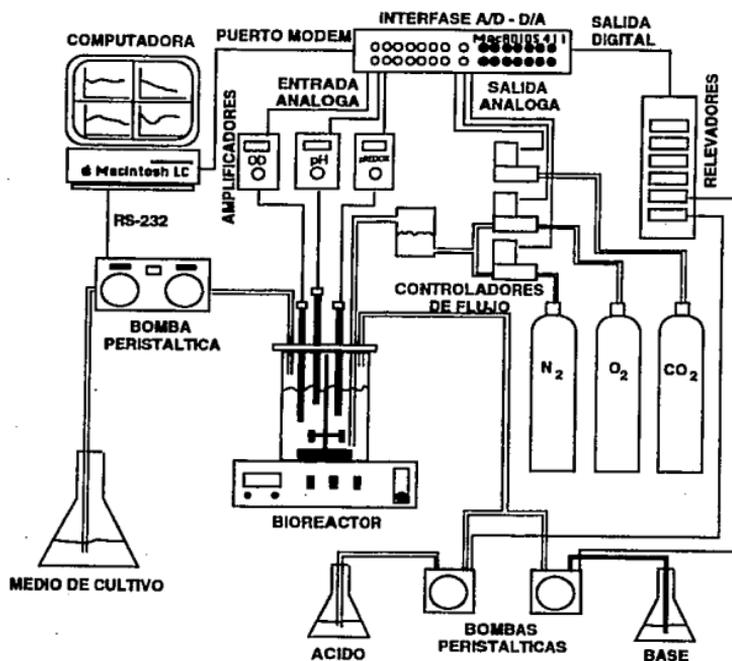


Figura B1. Diagrama de componentes del sistema de control y adquisición de datos¹.

APENDICE C
ANALISIS DE AMINOACIDOS Y AMONIO

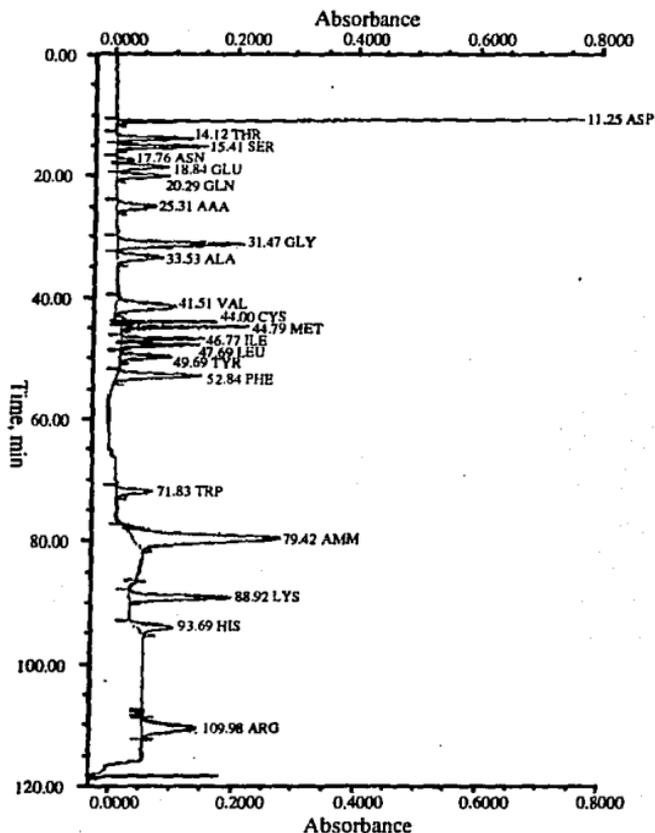


Figura C1. Ejemplo de cromatograma de estándares de aminoácidos y amonio. Se muestran los tiempos de elución para los diferentes aminoácidos, el amonio y el control interno.

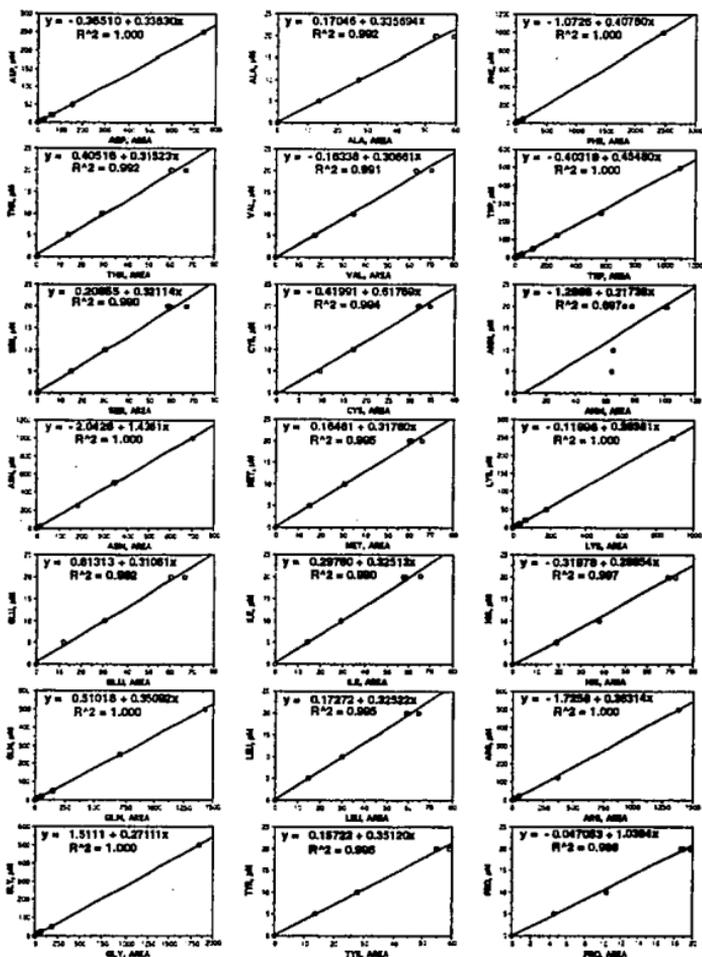


Figura C2. Curvas patrón de estándares de aminoácidos y amoníaco. Los datos mostrados en cada gráfica son de diversos cromatogramas a diferentes concentraciones de estándar, y la línea corresponde a la regresión lineal.

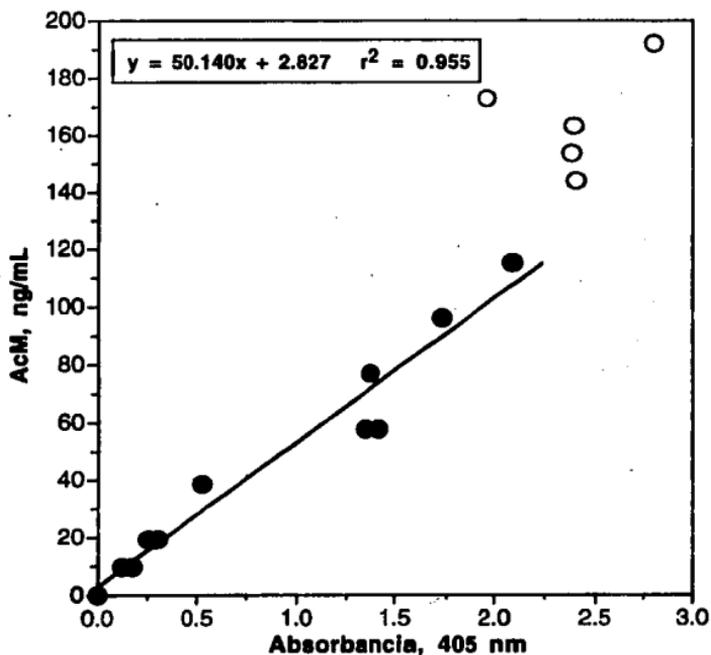
APENDICE D
ANALISIS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Figura D1. Curva patrón de anticuerpos monoclonales. Los círculos huecos representan datos que se encuentran fuera de la linealidad entre absorbancia y concentración.

APENDICE E
 CINÉTICAS DE CULTIVOS ESTÁTICOS CON EXCESO DE
 GLUTAMINA Y GLUCOSA

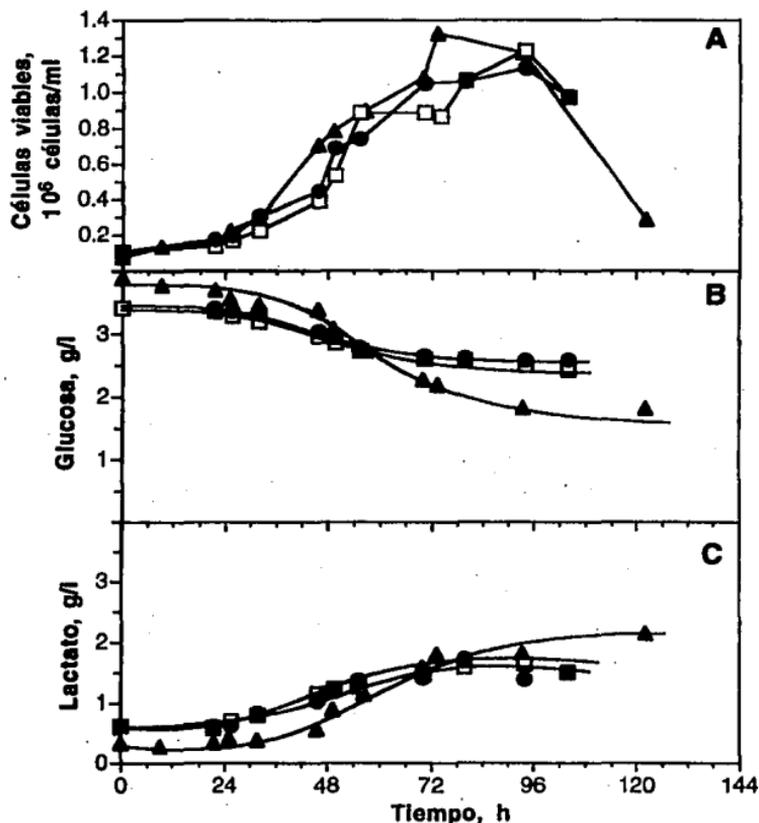


Figura E1. Cinéticas de crecimiento, consumo y producción de metabolitos en cultivos estáticos con exceso de glutamina y glucosa (4 mM GLN, 4 g/l GLC). Cada tipo de símbolo representa a los datos de un cultivo independiente.

APENDICE F
CINETICAS DE CULTIVOS ESTATICOS BAJO LIMITACION DE
GLUTAMINA

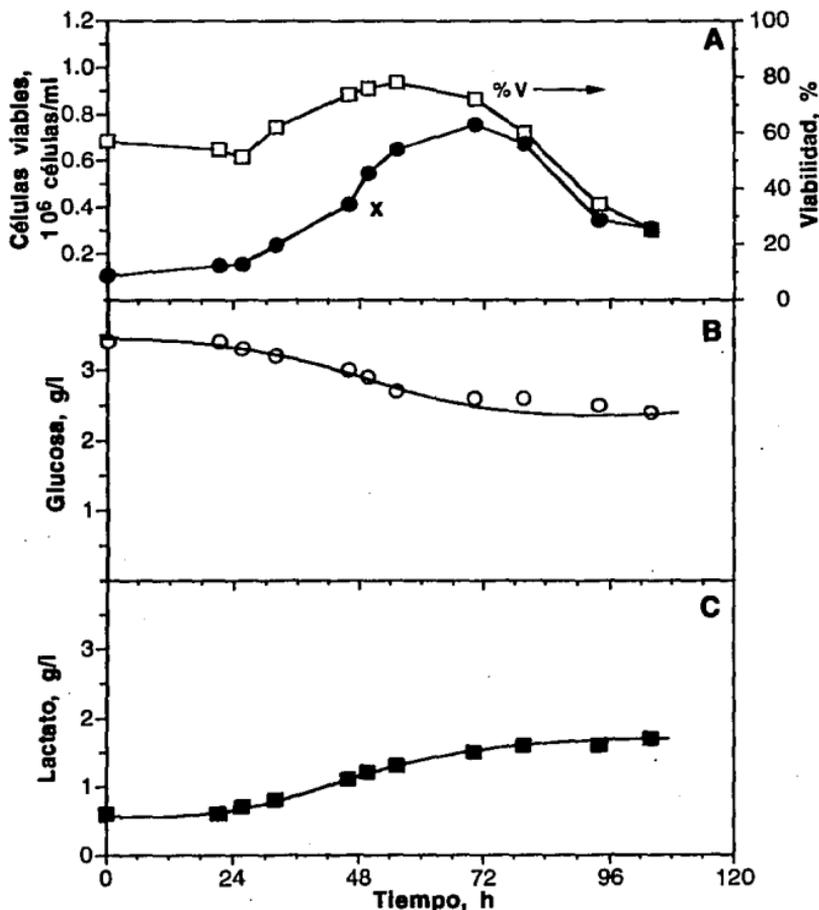


Figura F1. Cinéticas de crecimiento, consumo y producción de metabolitos en cultivos estáticos bajo limitación de glutamina (1 mM GLN, 4 g/l GLC).

APENDICE G
 CINÉTICAS DE CULTIVOS AGITADOS BAJO LIMITACION DE
 GLUTAMINA

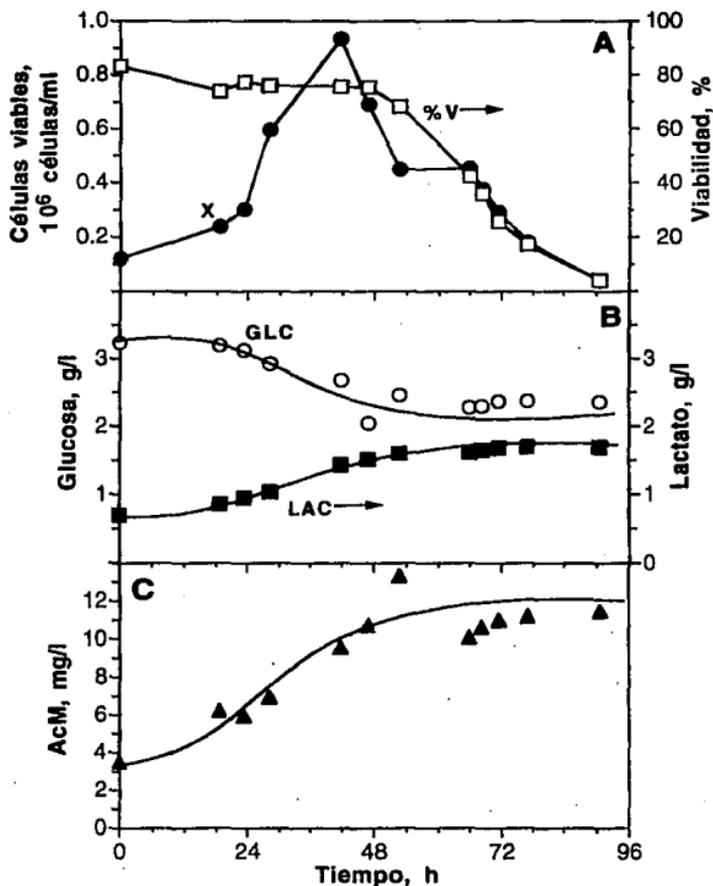


Figura G1. Cinéticas de crecimiento, consumo y producción de metabolitos en cultivos agitados bajo limitación de glutamina (1 mM GLN, 4 g/l GLC).

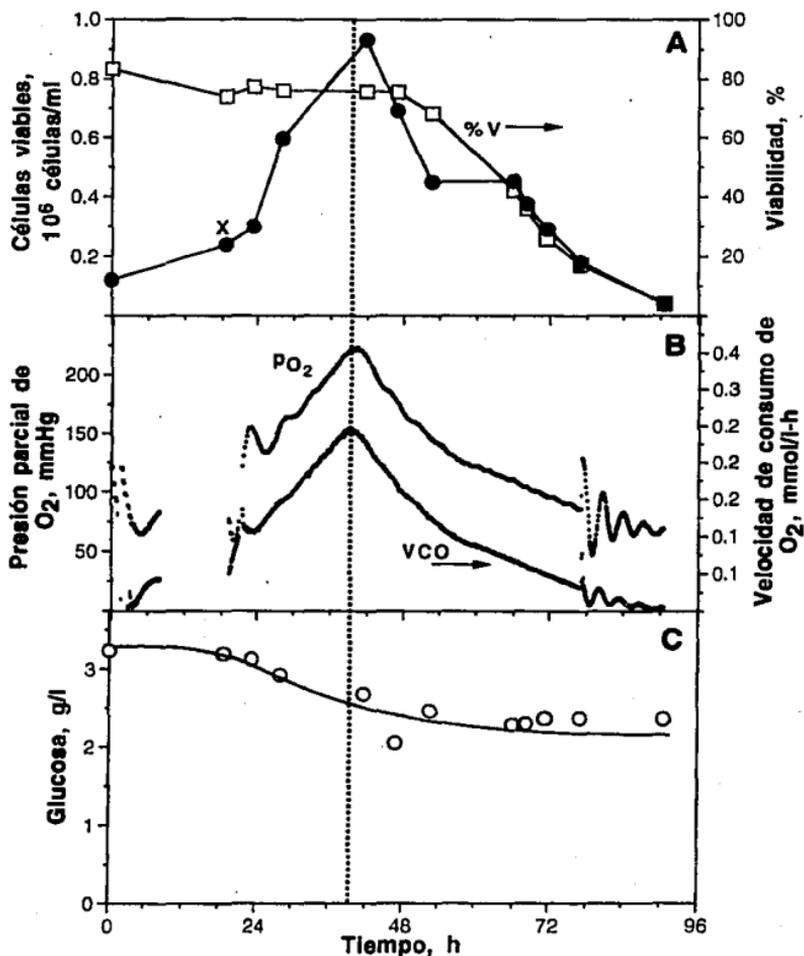


Figura G2. Estimación en-línea del agotamiento de glutamina en cultivos por lote (1 mM GLN, 4 g/l GLC). La línea punteada vertical corresponde al tiempo de agotamiento de GLN y los datos al cultivo mostrado en la figura G1.

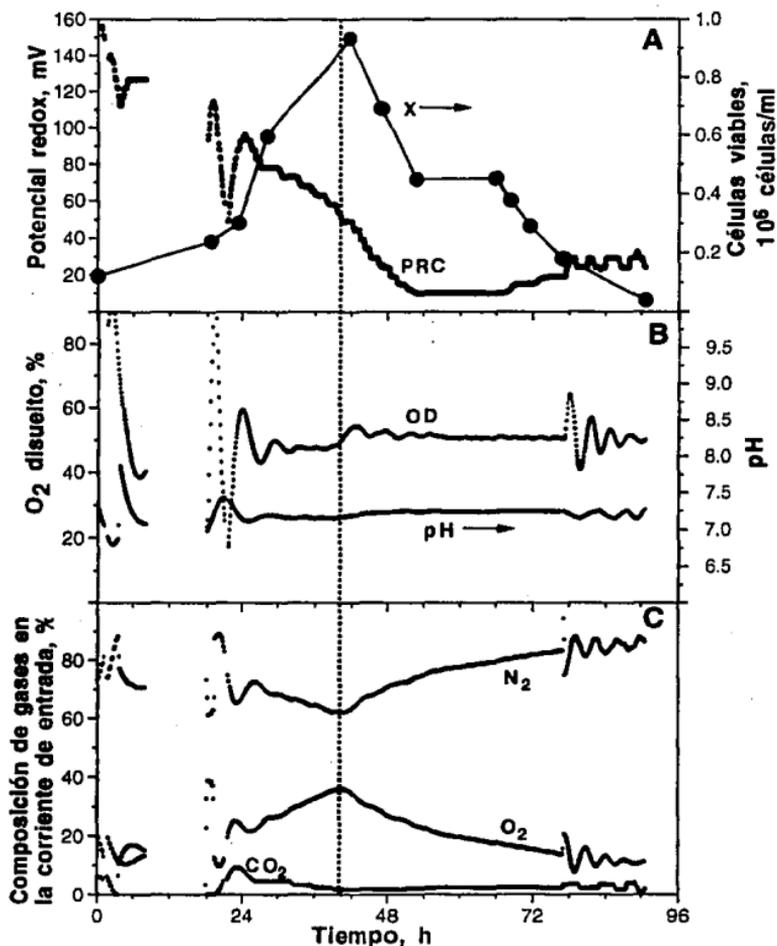


Figura G3. Perfiles de variables adquiridas y de control en cultivos por lote bajo limitación de glutamina (1 mM GLN, 4 g/l GLC). Los datos corresponden al cultivo mostrado en la figura G1.

APENDICE H EFECTO DEL SUERO FETAL BOVINO

Se realizaron cultivos en frascos-T para estudiar el efecto del suero fetal bovino (SFB) sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la productividad específica de AcM (q_{AcM}). Las células se cultivaron con medio de cultivo DMEM (4 mM GLN, 4 g/l GLC, 10% v/v SFB; ver secciones 4.2 y 4.4) hasta una densidad celular de aproximadamente 0.8×10^6 células viables/ml. Las células fueron centrifugadas a 700 rpm durante 10 min y resuspendidas en medio de cultivo sin suero (este paso se repitió una vez más para asegurar que no hubiese trazas de SFB). Se determinó la densidad celular y los volúmenes adecuados de SFB y medio de cultivo DMEM sin suero para iniciar cada experimento a las condiciones deseadas. La suspensión de células fue colocada y mezclada en frascos-T de 25 cm² para obtener un cultivo de 10 ml a concentraciones iniciales de 0.1×10^6 células viables/ml y concentraciones de 0.0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 2.0, 5.0 y 10.0% v/v de SFB. Se tomaron aproximadamente tres muestras diarias y el crecimiento celular se siguió durante 10 días. Se determinó el índice de viabilidad ($\int x dt$) como el área bajo la curva de concentración de células viables contra tiempo por el método integral de los trapecios. La velocidad específica de crecimiento aparente se determinó para la fase exponencial (ver sección 4.9.1).

Estos cultivos se realizaron simultáneamente e iniciaron a una concentración de 0.073×10^6 células viables/ml y a una viabilidad por arriba del 80%. Las figuras H1 y H2 muestran las cinéticas de crecimiento y los perfiles de viabilidad, respectivamente, durante el transcurso de estos cultivos. Se observó que a concentraciones muy bajas de SFB (0 y 0.3%), la densidad celular y la viabilidad del cultivo disminuyeron con respecto al tiempo de cultivo. A concentraciones bajas (0.6, 0.9 y 1.2%), la densidad celular se mantuvo relativamente constante y la viabilidad del cultivo disminuyó con respecto al tiempo de cultivo. A concentraciones intermedias y altas (2, 5 y 10%), la densidad celular y la viabilidad del cultivo incrementaron con respecto al tiempo de cultivo, alcanzando un máximo para luego pasar por las fases estacionaria y de muerte. Para los cultivos de 5 y 10% de SFB, la viabilidad del cultivo alcanzó valores máximos por arriba del 90%. Los cultivos de 5 y 10% de SFB alcanzaron densidades celulares máximas de 0.96×10^6 y 1.32×10^6 células viables/ml, respectivamente.

La figura H3 muestra el efecto de la concentración de SFB sobre la velocidad específica de crecimiento aparente (μ) y sobre el índice de viabilidad. Se observó que medida que aumenta la concentración inicial de SFB, la μ y el índice de viabilidad del cultivo aumentaron. Como se señaló anteriormente (sección 2.6), el índice de viabilidad es proporcional a la producción de AcM. De acuerdo con esta aseveración y con los resultados de las figuras H1 a H3, podemos inferir que el crecimiento celular, la velocidad específica de crecimiento aparente, el índice de viabilidad y la

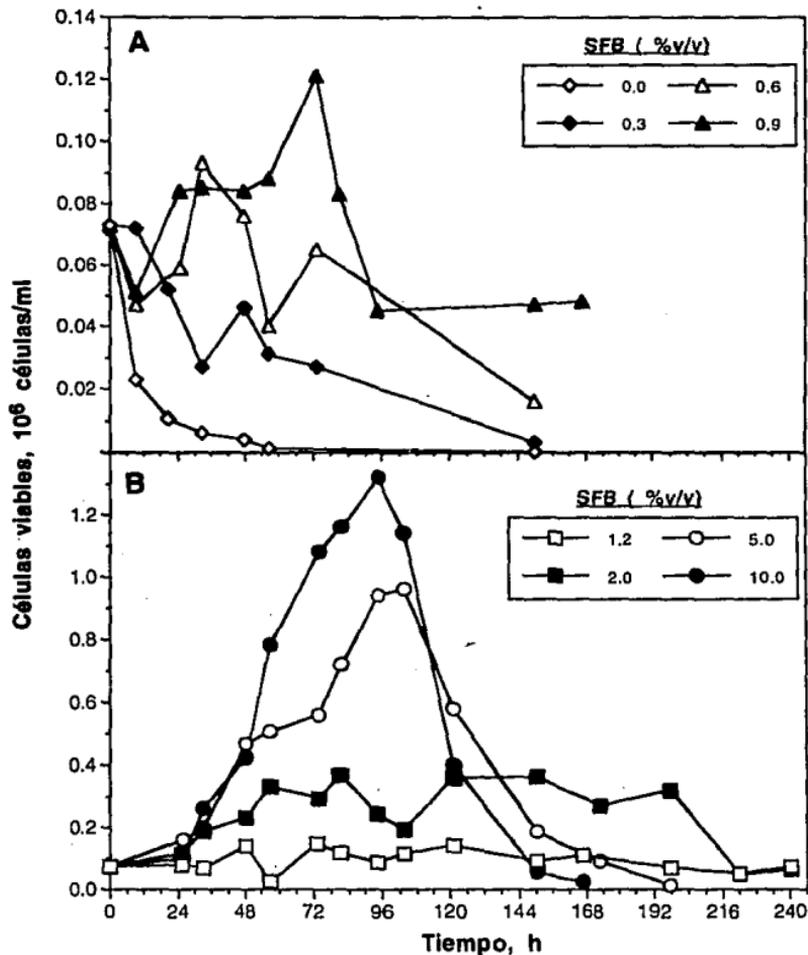


Figura H1. Perfiles de concentración celular a diferentes concentraciones de suero fetal bovino.

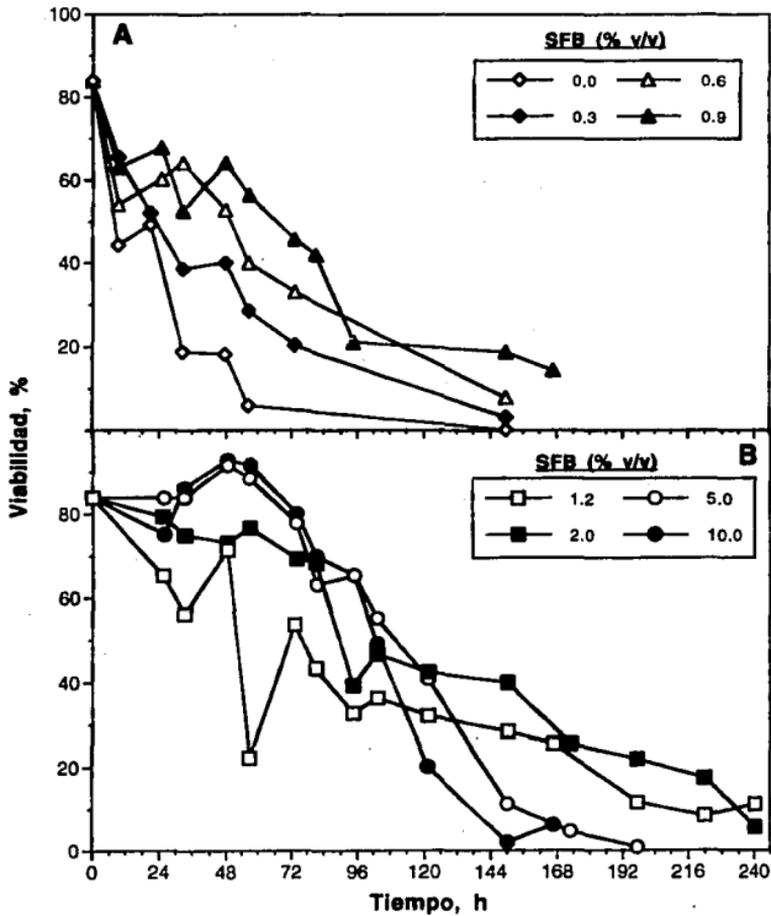


Figura H2. Perfiles de viabilidad a diferentes concentraciones de suero fetal bovino.

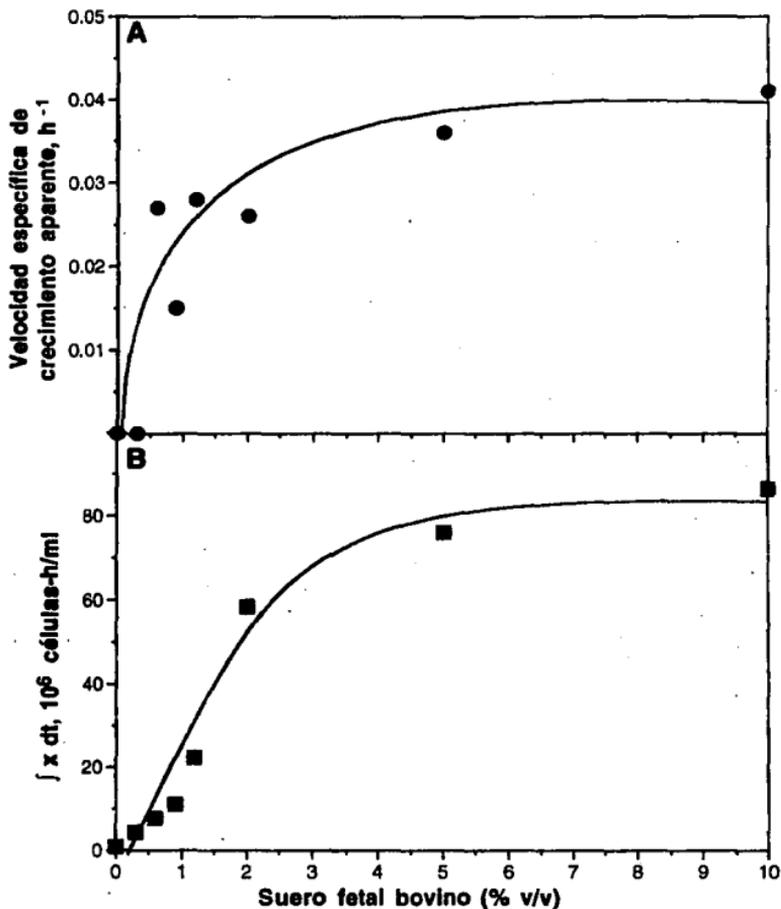


Figura H3. Efecto de la concentración de SFB sobre la velocidad específica de crecimiento aparente y sobre el índice de viabilidad.

producción de AcM aumentan a medida de aumenta la concentración de SFB. Adicionalmente, de la figura H3A podemos inferir que el efecto del SFB sobre la velocidad específica de crecimiento sigue una cinética tipo Monod. Estos resultados son similares a los encontrados por otros investigadores^{8,37,38,44}.

El suero proporciona una variedad de componentes necesarios para la proliferación celular⁴⁷. Los sueros incluyen nutrientes como lípidos y carbohidratos, hormonas como la prostaglandinas, factores de adhesión como la fibronectina, proteínas quelantes como la transferina, enzimas como la catalasa, e inhibidores de enzimas⁴⁷. Para asegurar que los diversos componentes del suero no se encuentren en concentraciones limitantes, la mayoría de los medios de cultivo son suplementados con un 10% v/v de suero. Sin embargo, el uso de suero presenta serias desventajas. Por ejemplo, el alto costo del suero, la composición compleja e indefinida del mismo (con variaciones de composición de lote a lote), la posible contaminación con virus o micoplasma, y el problema de separación en los procesos de purificación de AcM⁴⁷.

Con el fin de mejorar la economía del proceso de producción de AcM, se han realizado esfuerzos para reducir o eliminar el suero mediante la sustitución parcial o completa del mismo. En su sustitución, se han usado compuestos como la transferina, etanolamina, insulina, selenio, fibronectina, lipoproteínas y B-mercaptoetanol.^{47,55} Sin embargo, el costo sigue siendo elevado y siguen presentes proteínas que afectan el proceso de purificación. Además, la determinación de los requerimientos específicos para cada línea celular es costosa y laboriosa. Por otro lado, Ramírez *et al.*⁴⁴ emplearon calostro y leche de bovinos como sustituto completo del suero. Ellos lograron reducir en ocho veces el costo por mg de AcM producido. Sin embargo, el problema de la indefinición del medio sigue presente al emplear calostro o leche de bovinos.

Uno de los principales motivos por los que se emplean sueros es que proporcionan al cultivo factores de crecimiento. Sin embargo, se ha hipotetizado que los hibridomas secretan sus propios factores de crecimiento, pero que éstos no son suficientes si la densidad celular es baja^{24,37}. Por ejemplo, los resultados mostrados en la figura H4 sustentan esta hipótesis. La figura H4 muestra los perfiles de crecimiento para cinco cultivos (sin SFB) iniciados a diferentes concentraciones celulares: 0.1×10^6 , 0.3×10^6 , 0.5×10^6 , 0.7×10^6 y 0.9×10^6 células viables/ml (inóculos sin SFB). Cabe mencionar que la sensibilidad y precisión del método utilizado para la determinación de la concentración celular es de $\pm 0.05 \times 10^6$ células/ml (indicado en la figura H4 como la barra de error). Por lo mismo, se observó que solamente hubo crecimiento celular apreciable en el cultivo iniciado a 0.9×10^6 células viables/ml. En el resto de los cultivos, la densidad celular disminuyó o se mantuvo a concentraciones relativamente bajas. Öztürk y Pålsson³⁷ reportaron resultados similares, atribuyendo

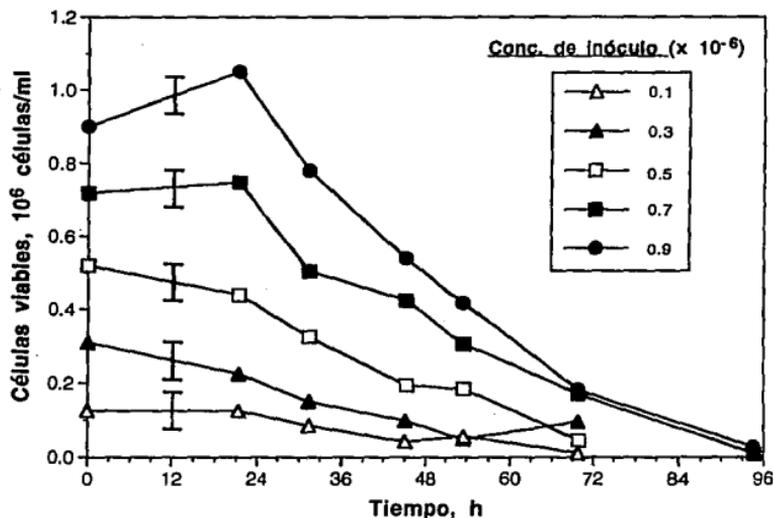


Figura H4. Efecto de la concentración de inóculo, en cultivos sin SFB, sobre el crecimiento celular. La barras indican la precisión de la técnica de conteo de células y se muestra sólo para poder apreciar las tendencias de crecimiento en los distintos experimentos mostrados en esta figura.

el crecimiento celular (en cultivos con altas concentraciones celulares iniciales) a la existencia de factores de crecimiento secretados por las propias células.

La importancia de estos resultados radica en la posibilidad de reducir el requerimiento de SFB a través de métodos de cultivo que mantengan una concentración celular alta desde la inoculación y a lo largo del cultivo. Un posible método es el cultivo exponencialmente alimentado, el cual se describe en el apéndice I. Por ejemplo, un cultivo exponencialmente alimentado que inicie con una alta concentración celular podría emplear medio libre de suero (o por lo menos en menores concentraciones) en la corriente de alimentación, reduciendo el uso global del mismo.

APENDICE I

CULTIVOS EXPONENCIALMENTE ALIMENTADOS

APENDICE I.1

Artículo "Metabolic and kinetic studies of hybridomas in exponentially fed-batch cultures using T-flasks" por A.E. Higareda, L.D. Possani y O.T. Ramírez

**METABOLIC AND KINETIC STUDIES OF HYBRIDOMAS IN
EXPONENTIALLY FED-BATCH CULTURES USING T-FLASKS**

Ana E. Higareda¹, Lourival D. Possani², and Octavio T. Ramírez^{1*}

Departments of Bioengineering¹ and Biochemistry²

Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional Autónoma de México

Avenida Universidad 2001, Apdo. Postal 510-3

Cuernavaca, Morelos 62271, México

Tel.: 52-73-114900. Fax: 52-73-172388

E-mail: tonatiuh@pbr322.ceingebi.unam.mx

Key words: hybridoma cell culture, monoclonal antibody, exponentially fed-batch, culture kinetics, metabolism, chemostat.

Accepted for publication to *Cytotechnology*, July 12, 1994.

Running title: Exponentially fed-batch cultures of hybridomas in T-flasks

* To whom correspondence should be addressed.

Abstract

Exponentially fed-batch cultures (EFBC) of a murine hybridoma in T-flasks were explored as a simple alternative experimental tool to chemostats for the study of metabolism, growth and monoclonal antibody (MAb) production kinetics. EFBC were operated in the variable volume mode using an exponentially increasing and predetermined stepwise feeding profile of fresh complete medium. The dynamic and steady-state behaviors of the EFBC coincided with those reported for chemostats at dilution rates below the maximum growth rate. In particular, steady-state for growth rate and concentration of viable cells, glucose, and lactate was attained at different dilution rates between 0.005 and 0.05 h^{-1} . For such a range, the glucose and lactate metabolic quotients and the steady-state glucose concentration increased, whereas total MAb, volumetric, and specific MAb production rates decreased 65-, 6-, and 3- fold, respectively, with increasing dilution rates. The lactate from glucose yield remained relatively constant for dilution rates up to 0.03 h^{-1} , where it started to decrease. In contrast, viability remained above 80% at high dilution rates but rapidly decreased at dilution rates below 0.02 h^{-1} . No true washout occurred during operation above the maximum growth, as concluded from the constant viable cell number. However, growth rate decreased to as low as 0.01 h^{-1} , suggesting the requirement of a minimum cell density, and concomitant autocrine growth factors, for growth. Chemostat operation drawbacks were avoided by EFBC in T-flasks. Namely, simple and stable operation was obtained at dilution rates ranging from very low to above the maximum growth rate. Furthermore, simultaneous operation of multiple experiments in reduced size was possible, minimizing start-up time, media and equipment costs.

Abbreviations: EFBC: exponentially-fed batch culture; CSC: continuous suspended culture; MAb: monoclonal antibody; D: dilution rate; q: metabolic quotient or specific rate of consumption or production of i .

Introduction

Complete kinetic characterization of hybridoma cultures not only provides an important insight into cell physiology and metabolism, but is also a necessary prerequisite for successful optimization and scaling-up of monoclonal antibody (MAb) production. The reported dissimilar behaviors between different hybridoma cell lines emphasize the importance of conducting kinetic studies in every case. For instance, there exists contradictory information as to the effect of growth rate on the specific MAb

production rate (q_{Mab}). While many authors have shown that q_{Mab} increases with decreasing growth rate (Miller et al., 1988; Ramfrez and Mutharasan, 1990; Martens et al., 1993), others have shown, either the opposite behavior (Low et al., 1987), an optimum at intermediate growth rates (Ray et al., 1989), or no effect at all (Flickinger et al., 1990). A broad range in q_{Mab} has also been reported; from as low as 0.2×10^{-10} mg/cell-h (Leno et al., 1992) to as high as 33×10^{-10} mg/cell-h (Kurokawa et al., 1993). Stability of Mab production (Frame and Hu, 1990) and sensitivity to ammonia and lactate (Omasa et al., Ozturk et al., 1992) also varies widely among cell lines. In particular, Reuveny et al. (Reuveny et al., 1987) have found that the commonly toxic lactate can stimulate growth of an hybridoma cell line at concentrations below 22 mM. While most data indicate that the yield of lactate from glucose increases with increasing growth rate (Miller et al., 1988; Ramfrez and Mutharasan, 1990) other studies show the opposite behavior (Ray et al., 1989). Furthermore, environmental factors, such as hydrodynamic (Papoutsakis, 1991) and osmotic stress (Reddy et al., 1994) have also been shown to be cell line and growth rate dependent.

The effect of environmental parameters on cell growth, metabolism and product formation of various hybridoma cell lines has been determined in continuous suspension culture (CSC) (Miller et al., 1988; Frame and Hu, 1990; Hiller et al., 1991; Kurokawa et al., Martens et al., 1993). CSC is usually considered the most appropriate operation mode for such studies since homogeneous and constant environmental conditions can be maintained. Nevertheless, CSC can be plagued by significant drawbacks. Namely, CSC operation is expensive due to the inefficient use of sophisticated media and the need of costly equipment and instrumentation, especially if multiple simultaneous experiments are performed. CSC operation at low dilution rates can be problematic due to the higher death rates and lower viability of hybridomas, possibly due to increased shear sensitivity at reduced growth (Boraston et al., 1984; Miller et al., 1988; Ramfrez and Mutharasan, 1990). An accurate control of volume and flow rates is also difficult in such regions (Yamané and Shimizu, 1984). Likewise, CSC presents increased risk of contamination during long operating times at low dilution rates, and due to cell line instability a true steady state might not be attainable (Frame and Hu, 1990, and Martens et al., 1993). Furthermore, washout of the culture can occur at high dilution rates. Such disadvantages have drawn cell culturists to use batch operation as a simpler tool for hybridoma characterization. Nevertheless, batch culture data can provide misleading information (Miller et al., 1988).

Fed-batch culture has proven to be a powerful experimental tool for microbial energetics and kinetic studies (Keller and Dunn, 1978; Esener et al., 1981). Accordingly, such mode of operation can represent an attractive alternative to CSC. Nonetheless, application of fed-batch culture has been mainly restricted to its conventional form of operation in which only small volume variations are allowed and where the main goal is the achievement of high cell densities and productivities (Glacken

et al., 1989; Ramfrez and Mutharasan, 1990; Hu and Piret, 1992; Jo et al., 1993a). In conventional fed-batch operation, medium containing a highly concentrated carbon or energy source, but usually deficient in other nutrients, is fed in several modes and a quasi-steady state is attained only for a single limiting substrate. In contrast, Ramfrez et al. (Ramfrez et al., 1994a, 1994b) have shown for microbial systems that a steady state condition can be attained for most parameters if a variable volume exponentially fed-batch culture (EFBC) is employed. The dynamic and steady state behavior of EFBC is the same as CSC. However, EFBC are technically simpler to run and permit stable operation in regions where continuous cultivation is not feasible, i.e. very low or high dilution rates. Furthermore, equipment, medium utilization, and start-up time are minimized in fed-batch culture of hybridomas in T-flasks, and multiple experiments can be performed simultaneously with reduced risk of contamination (Truskey et al., 1990).

Fed-batch operation using various modes of feedback flow rate control has been used for different mammalian cells (Glacken et al., 1989; Truskey et al., 1990; Omasa et al., 1992; Chevalot and Marc, 1993). In such studies, the pseudo-steady state condition has been attained only for a limited number of parameters. Semicontinuous or repeated fed-batch operation has also been used as a means of approximating continuous operation in plant and animal cell culture (Tharakan and Chau, 1986; Ramfrez and Mutharasan, 1990; Lee et al., Westgate et al., 1991; Leno et al., Schmid et al., 1992; Jo et al., 1993b; Salazar-Kish and Heath, 1993). In this work, we report for the first time the use of predetermined variable-volume EFBC in T-flasks as an alternative to CSC for hybridoma kinetic characterization studies. The effect of dilution rate on hybridoma growth, glucose consumption, and lactate and MAb production is presented.

Materials and methods

Cell line and culture medium

A murine hybridoma, designated BCF2, that secretes a neutralizing monoclonal antibody (MAb) specific to toxin 2 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann was generated and used in this study. Generation of the hybridoma cell line and the *in vivo* neutralizing activity of MAb has been described elsewhere (Zamudio et al., 1992). The medium used was Dulbecco's modified Eagle's medium prepared from powdered formulation (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). The final medium contained 4 g/l glucose, 4 mM L-glutamine, 2.2 g/l NaHCO₃, 13.2 mg/l oxaloacetic acid, 0.8 mg/l crystalline insulin, 5.5 mg/l sodium pyruvate, 1 % (v/v) of 100X nonessential amino acid solution (Sigma), 1 % (v/v) of antibiotic antimycotic solution [penicillin (100,000 U/l), streptomycin (100 mg/l), amphotericin B (250 µg/l)] (Sigma), and 10 % (v/v) fetal bovine serum (Sigma). The concentration of antibiotics was much lower than those known to be cytotoxic.

Exponentially fed-batch cultures

All fed-batch experiments were performed in 75-cm² T-flasks maintained in a CO₂ incubator (37°C, 6% CO₂). Seven dilution rates, divided in two groups, were tested. In the first group of cultures, operated at dilution rates of 0.005, 0.01, 0.02 and 0.07 h⁻¹, the flasks initially contained a 4-ml cell suspension consisting of hybridomas from mid-exponential phase of batch cultures and sufficient fresh culture medium to give a concentration below 0.5 X 10⁶ cell/ml. For the second group, operated at dilution rates of 0.03, 0.04 and 0.05 h⁻¹, a 4-ml cell suspension of late-exponential phase hybridomas was placed directly in the flasks without diluting in fresh medium in order to give an initial concentration of 0.9 X 10⁶ cell/ml. After allowing the cells to grow in batch mode for a predetermined period of time, a known volume of fresh culture medium was added and a sample was removed for cell number determination and other assays. The sample volume never exceeded 1-ml and was typically 0.65-ml. Homogeneity of T-flasks before sampling and after medium addition was achieved by gentle mixing; the remaining time, the T-flasks remained static. This procedure was repeated successively until a final volume of 40-ml was reached. Only the cultures operated at a dilution rate of 0.03, 0.04, and 0.05 h⁻¹ were allowed to grow in batch mode after the final volume was reached and until cell viability decreased to less than 30 %. The time between medium additions and the volume added in every instance was adjusted in order to obtain a volume profile that increased exponentially with time. The time between medium additions never exceeded 24 h, and the volume added in every occasion remained between 1 and 4-ml. A fraction of the medium added corresponded to the volume removed during sampling. Such a procedure resulted in a stepwise profile that closely traced the ideal exponential profile that would be generated if a continuous feeding had been established. As described below, a constant and predetermined dilution rate can be fixed through the use of exponentially-fed batch cultures. In addition to the fed-batch experiments, batch control cultures in 30-ml T-flasks were also performed.

Analytical methods

Cell number was determined by trypan blue exclusion method. Samples of supernatant taken from the cultures were frozen at -20°C for later determination of glucose, lactate, and MAb concentration. Glucose and lactic acid were determined enzymatically with a YSI model 2700 analyzer (Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, OH). MAb concentration was determined, as described before (Ramírez and Mutharasan 1990), by an alkaline phosphatase "sandwich" ELISA technique. ELISA plates were read at 405 nm with a Titertek Multiscan MCC/340 reader (Flow Laboratories, McLean, VA) and reported MAb titers were obtained from the average of 12 wells. The values of MAb concentration reported correspond only to the fed-batch phase.

Mathematical considerations

For a well-mixed fed-batch culture with sterile feed and no outflow, a cell balance over the T-flask is

given by:

$$\frac{d(xV)}{dt} = \mu (xV) \quad (1)$$

where x , V , t , and μ are viable cell concentration, culture volume, time, and apparent specific growth rate, respectively. Thus, upon integration of eq. (1), μ can be readily obtained from the slope of a curve of $\ln[xV]$ versus time. As described elsewhere (Ramirez et al., 1994a), a constant and predetermined dilution rate, D , can be obtained in a fed-batch culture if an exponentially increasing feeding flow rate, $F(t)$, is set as:

$$\frac{dV}{dt} = F(t) = V_0 D \exp(Dt) \quad (2)$$

where the subindex 0 refers to the time of feeding initiation. Combining eqs. (1) and (2), and rearranging, yields:

$$\frac{d(\ln x)}{dt} = \mu - D \quad (3)$$

Similarly, a substrate balance yields:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_r - S) - \frac{\mu x}{Y} \quad (4)$$

where S and S_r are the substrate concentrations in the T-flask and in the feed, respectively, and Y is the yield of biomass on substrate. As shown by eqs. (3) and (4), the dynamic and steady state behavior of an EFBC is identical to that of a CSC, underscoring the utility of the former as an alternative to the latter.

The specific glucose consumption, q_G , and lactate production, q_L , rates were determined as the average of the individual rates between medium additions, which in turn were determined as:

$$q_{G,i} = \frac{[(G_i V_i) - (G_{i+1} V_{i+1}) + G_r (V_{i+1} - V_i)]}{[(t_{i+1} - t_i) \left(\frac{x_{i+1} V_{i+1} + x_i V_i}{2} \right)]} \quad (5)$$

$$q_{L,i} = \frac{[(L_{i+1} V_{i+1}) - (L_i V_i) - L_r (V_{i+1} - V_i)]}{[(t_{i+1} - t_i) \left(\frac{x_{i+1} V_{i+1} + x_i V_i}{2} \right)]} \quad (6)$$

where G_i and L_i are residual glucose and lactate concentrations, respectively, at the i^{th} time interval. The subindex r refers to the concentration in feeding medium. The apparent molar yield of lactate from

glucose was determined by dividing the average lactate and glucose metabolic molar quotients. The total MAb produced, ΔMAB ; the overall volumetric MAb production rate, r_{MAB} ; and the average specific MAb production rate were determined from equations 7, 8 and 9, respectively.

$$\Delta\text{MAB} = \text{MAB}_f V_f - \text{MAB}_0 V_0 \quad (7)$$

$$r_{\text{MAB}} = \frac{\Delta\text{MAB}}{(t_f - t_0) V_f} \quad (8)$$

$$q_{\text{MAB}} = \frac{\Delta\text{MAB}}{(t_f - t_0) \bar{x}} \quad (9)$$

where $[\text{MAB}]$ is the antibody concentration, the subindex f refers to the concentration at the end of the fed-batch phase, and \bar{x} is the average viable cell number defined as:

$$\bar{x} = \frac{\int_0^t (xV)dt}{(t_f - t_0)} = \frac{\sum_{i=0}^{f-1} \left[\frac{(\bar{x}_{i+1} V_{i+1} + \bar{x}_i V_i)}{2} (t_{i+1} - t_i) \right]}{(t_f - t_0)} \quad (10)$$

Results and discussion

Batch culture

Figure 1 shows typical behavior of BCF2 hybridoma batch culture in 75-cm² T-flasks. After a maximum viable cell concentration of 1.3×10^6 cell/ml was attained, a rapid decrease in viability was observed. We have previously shown (Higareda et al., 1993) that for BCF2 hybridomas in serum containing media, glucose and glutamine are the main carbon and energy source, respectively, and that depletion of either one limits growth. Therefore, the observed growth cessation in batch is possibly due to accumulation of toxic metabolic byproducts, such as lactate or ammonia, since glutamine (data not shown) and glucose were still present at non-limiting concentrations. The maximum growth rate, calculated for the exponential growth phase, was 0.046 h^{-1} . As shown in Fig. 1B, glucose consumption and lactate production ceased a few hours after the maximum viable cell concentration was attained, whereas MAB continued to increase until the end of the culture where a maximum of 36 mg/l was reached (Fig. 1C). The batch metabolic quotients for glucose and lactate, calculated as the ratio of maximum growth rate to the corresponding cell yield, were 2.9×10^{-13} and 5.7×10^{-13} mol/cell-h, respectively. The apparent lactate from glucose yield was 1.96 mol/mol, suggesting that during batch growth glucose is converted almost entirely into lactate and that little is catabolized through the TCA cycle. Such a high yield has also been reported for continuous or pseudocontinuous

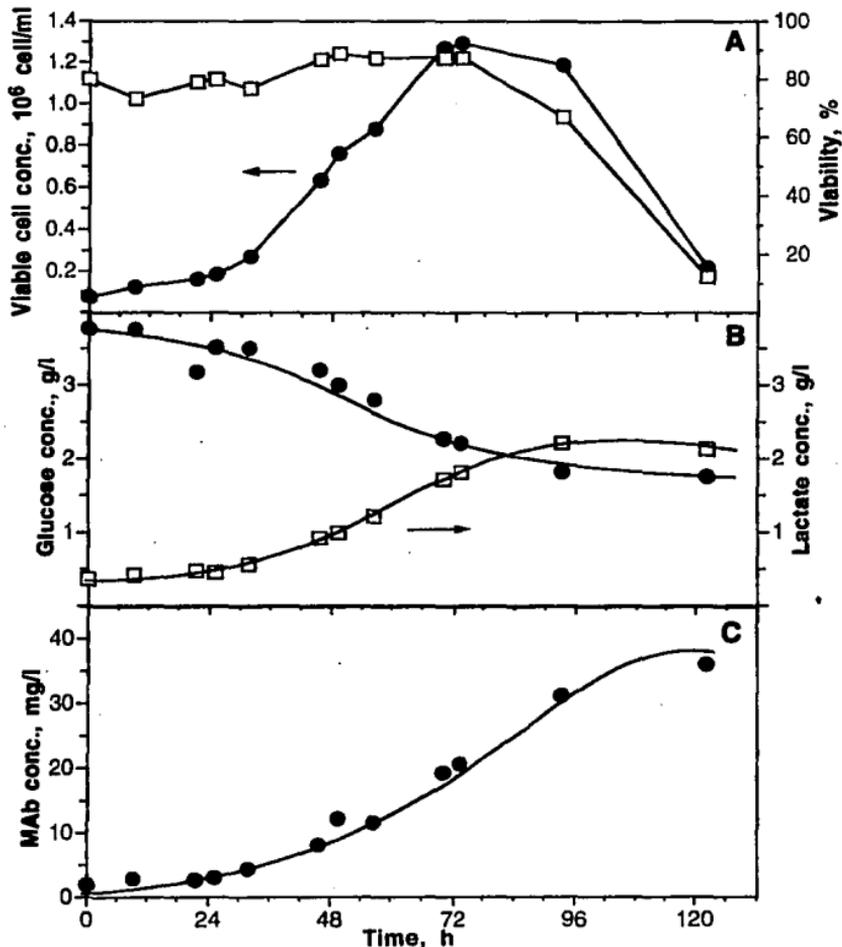


Figure 1. Batch culture of BCF2 hybridoma in 75-cm² T-flask. A; viable cell concentration (closed circles) and viability (open squares). B; glucose (closed circles) and lactate (open squares) concentration. C; MAb concentration (closed circles).

culture at high growth rates (Miller et al., 1988; Ramírez and Mutharasan, 1990). The total MAb produced and the volumetric and specific MAb production rates were 1.02 mg (1.4 mg if corrected for 40-ml), 0.28 mg/l-h, and 4.2×10^{10} mg/cell-h, respectively.

Exponentially fed-batch cultures

Figure 2 shows the results of BCF2 cells during EFBC in T-flasks at a dilution rate of 0.01 h^{-1} . Such results illustrate the typical behavior observed at intermediate dilution rates. As shown by the dotted-line in Fig. 2A, viable cell number increased exponentially, indicating that a constant growth rate was attained. Cell viability rapidly decreased from 98% to around 70% during the first 2 days of culture, but then remained at a relatively constant value of about 65% (Fig. 2A). Cell concentration increased from 0.38×10^6 cell/ml at inoculation, to a steady-state value of 0.98×10^6 cell/ml after 8 days of operation. Residual glucose and lactate concentrations also approached steady-state values after the same time period (Fig. 2B). No pH determinations were made, however from the lactate data and the color of the indicator phenol red in the medium, it can be inferred that pH also reached a steady-state. It should be noted that steady-state was attained using only a stepwise predetermined feeding profile, which is in contrast to other more complicated systems where some means of feedback control is required for maintaining a desired condition (Glacken et al., 1989; Truskey et al., 1990; Ormasa et al., 1992). Furthermore, in other types of fed-batch operation, steady-state condition is usually attained only for a limited number of parameters, whereas large variations occur in the remaining (Glacken et al., 1989; Chevalot and Marc, 1993; Jo et al., 1993b). As seen in Figure 2C, MAb concentration did not reach a steady-state but continuously increased, with accumulated MAb exponentially increasing. The complete MAb production profile was determined just for this culture, whereas only the MAb concentrations at the beginning and end of the fed-batch phase were determined for the other dilution rates tested.

Figures 3 and 4 present the results of the EFBC operated at dilution rates of 0.005 and 0.07 h^{-1} , respectively, the lowest and highest dilution rates tested. Such a broad range in dilution rates has not been, to our knowledge, studied before for an hybridoma cell line. Most CSC reports have only studied a 1.5- to 5.3-fold increase in dilution rate (Miller et al., 1988; Ray, 1989; Frame and Hu, 1990; Hiller et al., 1991; Martens et al., 1993), being the range between 0.008 to 0.055 h^{-1} among the broadest one described (Leno et al. 1992). Small scale bioreactor operation in continuous mode at very low dilution rates can present significant problems, such as difficulties in maintaining a constant volume due to inaccurate control of low flow rates and losses by evaporation, increased risk of contamination, and increased shear sensitivity. On the other hand, stable continuous or pseudocontinuous operation at growth rates close to the maximum is difficult and culture washout occurs if the critical dilution rate is exceeded. Such difficulties may explain the limited range of

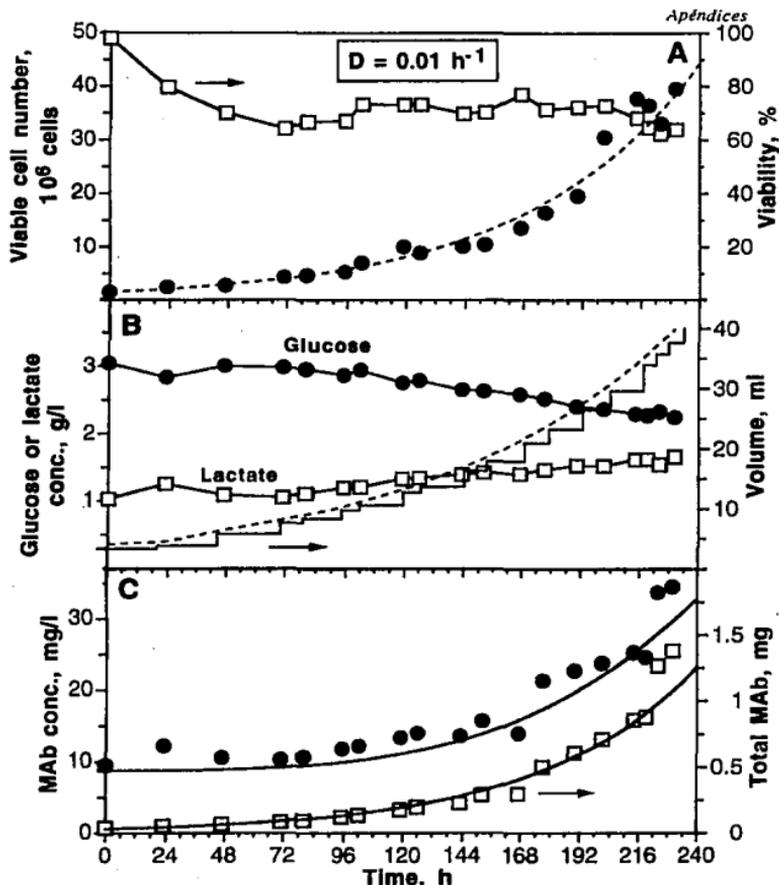


Figure 2. Exponentially fed-batch culture of BCF2 hybridoma in 75-cm² T-flask at a dilution rate of 0.01 h⁻¹. A; viable cell number and viability. B; glucose and lactate concentration. C; MAb concentration and total MAb (open squares). Symbols as in Fig. 1. The continuous and dotted-lines in A and C correspond to an exponential fit. In panel B, the dotted-line corresponds to the ideal exponentially increasing volume profile that would have been generated if a continuous feeding had been established, and the stepwise profile corresponds to the actual volume.

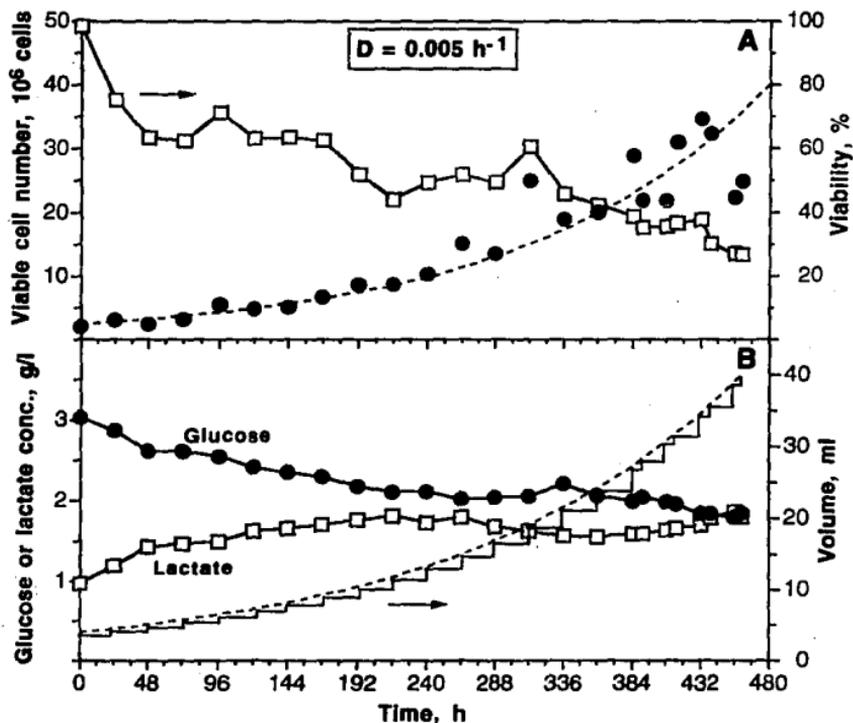


Figure 3. Exponentially fed-batch culture of BCF2 hybridoma in 75-cm^2 T-flask at dilution rate of 0.005 h^{-1} . Rest of legend as in Fig. 2.

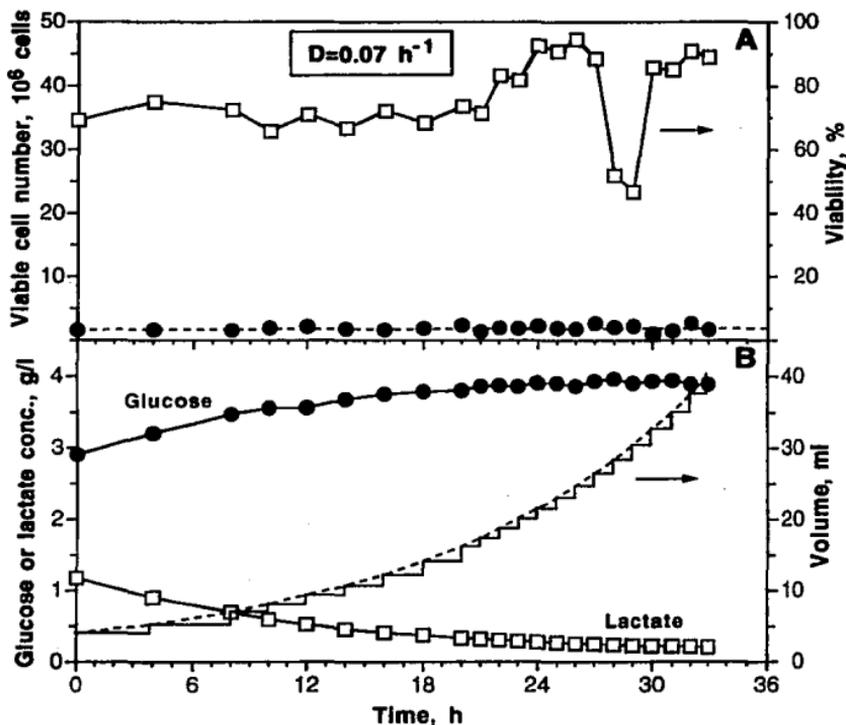


Figure 4. Exponentially fed-batch culture of BCF2 hybridoma in 75-cm² T-flask at a dilution rate of 0.07 h⁻¹. Rest of legend as in Fig. 2. In A, the same scale as in Figs. 2 and 3 was maintained to facilitate comparison.

dilution rates studied in CSC. In contrast, EFBC permitted simple operation at a dilution rate almost one order of magnitude lower than the maximum growth rate (Fig. 3). Furthermore, since no cell removal exists in the EFBC, a true washout will not occur. This is shown in Figure 4 where even at a dilution rate considerably higher than the batch maximum growth rate, the viable cell number slightly increased from 1.5×10^6 to 2×10^6 cells, even though the cell concentration decreased. Operation at such a high dilution rate resulted in the plentiful supply of all nutrients at non-limiting concentrations and very low concentration of toxic metabolic wastes, as illustrated in Fig. 4B for glucose and lactate concentration.

As exemplified in Figs. 2 to 4, the trajectory followed by the various parameters towards steady-state corresponds to the expected behavior of a first order system following Monod-type kinetics (see eqs., (3) and (4)). Namely, a steep initial response succeeded by a slower direct, i.e. non oscillating, approach to steady-state. Such a transient behavior is the same as the one traced during start-up and step perturbations of CSC, with each particular system requiring a characteristic response time to reach steady-state. For instance, more than 13 residence times were needed to reach steady-state glucose concentration during CSC start-up and dilution rate step increases (Frame and Hu, 1990; Hiller et al., 1991). In contrast, less than 3 residence times were needed for lactate concentration to reach steady-state after a step reduction in the feed medium glucose concentration (Ray et al. 1989). The observed response times in the EFBC for the various parameters ranged between those cited above (see Figs. 2 to 4), underscoring the similarities between EFBC and CSC.

Effect of dilution rate

Figures 5 to 7 summarize the results of the EFBC at all dilution rates (D) tested. As seen in Figure 5, the steady-state viable cell concentration showed a maximum around 1×10^6 cell/ml at a D of 0.01 h^{-1} , but rapidly decreased at lower or higher D. A similar behavior has been reported for hybridomas in CSC or pseudocontinuous culture where maximum steady-state cell concentration has been found to occur between D of 0.015 to 0.03 h^{-1} (Miller et al., 1988; Ray et al., 1989; Ramfrez and Mutharasan, 1990; Hiller et al., 1991; Leno et al., 1992). Residual glucose approached the concentration of feeding medium as D increased. Glucose did not limit growth as it remained above 1.9 g/l for all the conditions tested. Cell viability remained relatively constant at 80 % for D above 0.02 h^{-1} , but rapidly decreased to less than 30 % as D decreased to 0.005 h^{-1} . Such a high sensitivity of the viability at low dilution rates has been described previously for pseudocontinuous (Ramfrez and Mutharasan, 1990) and CSC (Boraston et al., 1984; Miller et al., 1988), and is probably caused, at least partially, by the higher levels of byproducts and lower concentration of essential nutrients. For instance, as seen in Figs. 2 to 4, the steady-state lactate concentration decreased from 1.8 to 0.2 g/l as D increased from 0.005 to 0.07 h^{-1} . Such a change in lactate concentration corresponds to a change in pH of only 0.06.

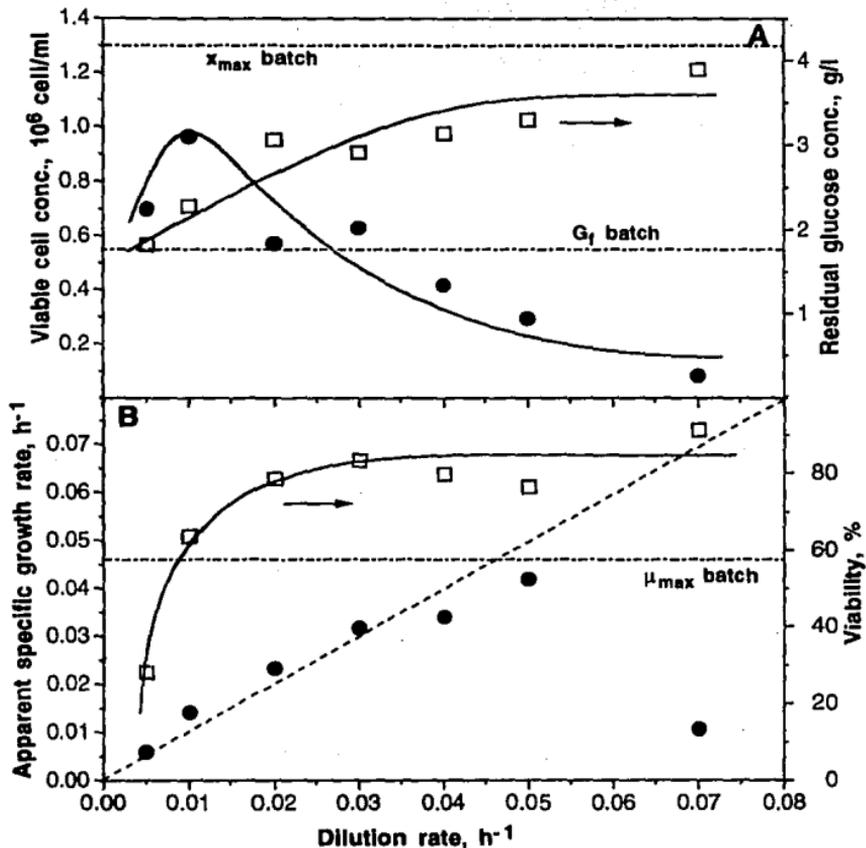


Figure 5. Summary of exponentially fed-batch cultures. A; viable cell (closed circles) and residual glucose (open squares) conc. B; apparent specific growth rate (closed circles) and viability (open squares). All data points represent the average of the values at steady-state. The horizontal dotted-lines represent the values obtained during batch culture shown in Fig. 1. The diagonal dotted-line in B represents the ideal case where $\mu = D$. Continuous lines drawn to show trend.

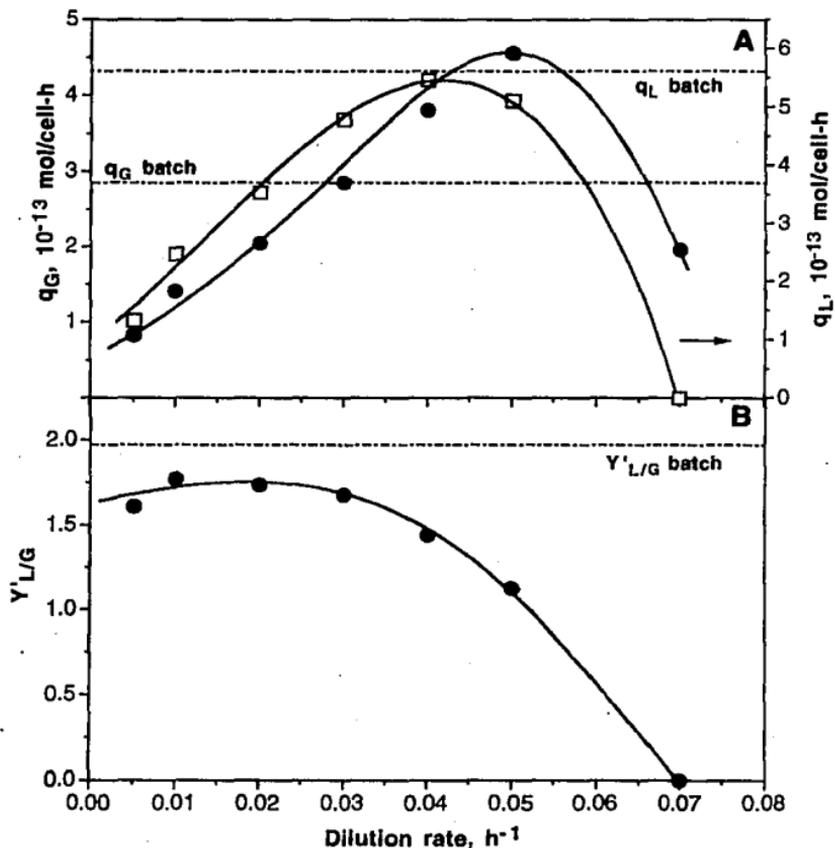


Figure 6. Summary of exponentially fed-batch cultures. A; metabolic quotients for glucose (closed circles) and lactate (open squares). B; apparent molar yield of lactate from glucose. The horizontal dotted-lines represent the values obtained during batch culture shown in Fig. 1. Continuous lines drawn to show trend.

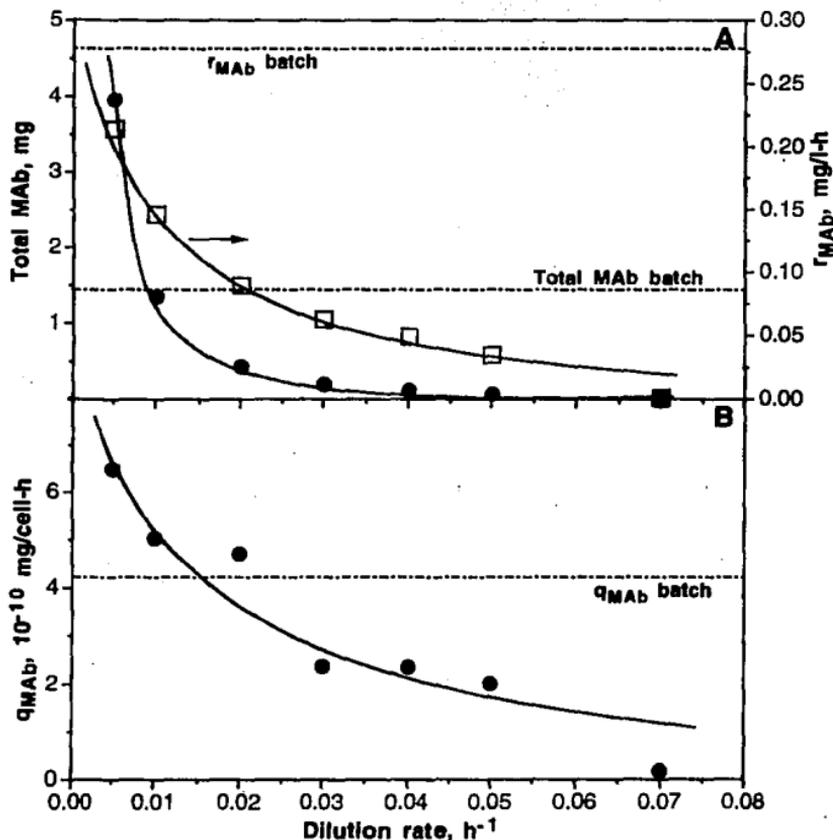


Figure 7. Summary of exponentially fed-batch cultures. A; total MAb (closed circles) and volumetric rate of MAb production (open squares). B; specific MAb production rate. The data points represent overall parameters for the fed-batch phase. The horizontal dotted-lines represent the values obtained during batch culture shown in Fig. 1, and have been corrected for 40-ml culture volume to allow comparison. Continuous lines drawn to show trend.

as measured in cell-free control medium. Thus, differences in viability and other parameters discussed below, such as MAb production, between the various dilution rates cannot be attributed to the differences in pH. The rate at which the viability decreased as D decreased was found to be lower in the EFBC than in the CSC reports. This suggests that at low growth rates the death rates in the EFBC are lower than in the agitated CSC, which can be explained by the absence of hydrodynamic damage in the static culture conditions.

Figure 5B shows that the growth rate at steady-state followed the same behavior of an ideal CSC (indicated in the graph by the dotted-diagonal line) for growth rates below the maximum observed in batch cultures (indicated by the dotted-horizontal line). That is, a predetermined growth rate equal to the dilution rate can be attained. Surprisingly, for D above the maximum growth rate, the apparent specific growth rate did not remain at its maximum, but rather decreased rapidly to very low values. Such a behavior contrasts with that of microbial EFBC where the specific growth rate has been found to remain at its maximum value as D increased above the maximum specific growth rate (Ramírez et al., 1994a). As mentioned before, even though a net increase of 0.5×10^6 cells was observed in the EFBC at a D of 0.07 h^{-1} , the high rate of medium addition caused a decrease in cell concentration from an initial value of $0.4 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ to less than $0.07 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ after 24 h of operation. Therefore, the low growth rate observed at such a high dilution indicates that a minimum cell density is needed for active growth to occur. Such a requirement also strongly suggests the existence of autocrine growth factors necessary for hybridoma proliferation. Similar requirements, in medium with or without serum, and evidence of the existence of autocrine growth factors have been reported before (Tharakan and Chau, 1986; Lee et al., 1991). The work of Leno et al. (Leno et al., 1992) was found to be the only report of a culture operated at D above the batch maximum specific growth rate. In contrast to this work, they found growth rates as much as 25 % higher than the maximum batch specific growth rate, which may be explained by the much higher cell concentration present when the high D were initiated, as well as the possibility of substantial growth on walls due to the particular system employed.

The average specific glucose uptake rate (q_G) and the average specific lactate production rate (q_L) as a function of D are shown in Figure 6A. As observed by others (Miller et al., 1988; Ramírez and Mutharasan, 1990; Hiller et al., 1991) q_G and q_L increased linearly with D for growth rates below the maximum. For D above 0.045 h^{-1} , q_G and q_L decreased due to the lower apparent specific growth rates that occurred during such high D . The apparent yield of lactate from glucose ($Y_{L/G}$) remained relatively constant at around 1.7 mol/mol up to a D of 0.03 h^{-1} where it started to decrease (Fig. 6B). Hiller et al. (Hiller et al., 1991) have also observed that $Y_{L/G}$ remains relatively constant in CSC between D of 0.015 to 0.03 h^{-1} , but in contrast to this work, they observed an increasing $Y_{L/G}$ as D

increased above 0.03 h^{-1} . The $Y_{L/G}$ at all the D tested in the EFBC were lower than in the batch culture, which indicates a higher efficiency of glucose utilization under the controlled growth conditions.

The effect of D on MAb production during EFBC is summarized in Figure 7. The data points represent the overall parameters determined from the MAb concentrations at the initiation and end of the fed-batch phase (eqs. (7) to (9)). It should be noted that the culture volume increased from 4 to 40-ml during all the EFBC. Therefore, in every condition tested, the same mean number of 3.33 cell generations was allowed. Accordingly, such a protocol results in a more reliable comparison between experiments and avoids interpretation problems due to generation-associated phenomena, such as loss of MAb productivity due to cell line instability (Frame and Hu, 1990; Hiller et al., 1991). For instance, Martens et al. (Martens et al., 1993) have observed in CSC the occurrence of two distinctive hybridoma populations and a drop in specific MAb productivity after about 30 generations. Such behavior should caution on the use of CSC for extended periods of time during hybridoma kinetic studies. As seen in Figure 7A, the volumetric MAb production rate and the total MAb produced during the fed-batch phase decreased 65- and 6-fold, respectively, with increasing D . Likewise, the specific MAb production rate decreased from $6.5 \times 10^{-10} \text{ mg/cell-h}$ at a D of 0.005 h^{-1} to around $2 \times 10^{-10} \text{ mg/cell-h}$ at a D of 0.05 h^{-1} (Fig. 7B). Such a negative correlation between MAb secretion rate and growth rate has been commonly reported for different hybridoma cell lines (Boraston et al., 1984; Miller et al., 1988; Ramfrez and Mutharasan, 1990; Leno et al., 1992; Martens et al., 1993). For instance, Ramfrez and Mutharasan (Ramfrez and Mutharasan, 1990) observed that q_{MAb} decreased from 2×10^{-10} to $0.5 \times 10^{-10} \text{ mg/cell-h}$ as dilution rate increased from 0.007 to 0.042 h^{-1} , and attributed such a behavior to a higher MAb production rate of G_1 cells compared to cells traversing through mitosis and other stages of interphase. Likewise, Miller et al. (Miller et al., 1988) found an approximately 16- and 2- fold increase in antibody concentration and q_{MAb} , respectively, for a 2.5-fold decrease in dilution rate. Such an increase was proposed to be either due to a stressed condition that favored protein production or to differential MAb production rates during the various phases of the cell cycle. In addition to such possibilities, it has also been discussed (Martens et al., 1993) that the increased MAb production at low dilution rates could be due to an increased passive release of antibodies or its fractions by the larger concentration of dead cells under such conditions. Nevertheless, independently of the explanation given for the observed behavior, it can be seen that the EFBC can be used as an important experimental tool to determine such trends, especially since dissimilar behaviors exist between different hybridoma cells. For instance, increasing q_{MAb} with increasing D (Low et al., 1987), an optimum q_{MAb} at intermediate growth rates (Ray et al., 1989), or no effect at all (Flickinger et al., 1990) have also been reported. Any of these behaviors can be explained from simulation analysis of the assembly rate of the heavy and light chains of the antibody molecule (Flickinger et al., 1992).

Finally, results of the batch culture, corrected for 40-ml culture volume, have also been included in Figure 7 for comparison and are represented as the horizontal dotted lines. As seen, the overall volumetric MAb productivity obtained in batch culture was higher than in EFBC at any of the dilution rates tested. This results from the higher cell concentration maintained during a longer period of time in batch compared to the EFBC. In contrast, the total MAb and q_{MAB} in batch culture only reached the values obtained at intermediate dilution rates in the EFBC. Since in batch culture cells grow from very low to very high rates as they progress through the various phases, it is reasonable that the total and specific MAb values correspond to those of an average intermediate growth rate.

Conclusions

The results of this study show that exponentially fed-batch cultures of hybridomas in T-flasks can be used as a simple alternative experimental tool to chemostats for the study of metabolism, growth, and MAb production kinetics. EFBC allowed simple and stable operation of simultaneous multiple experiments at either very low or very high dilution rates, minimizing the start-up time, equipment cost, media utilization, and risk of contamination. Furthermore, the dynamic and steady-state behaviors of the EFBC were found to be similar to those reported for CSC. For the hybridoma cell line generated and studied here, it was found that with increasing growth rate the viability, metabolic quotients for glucose and lactate, and residual glucose concentration increased; whereas viable cell concentration, total MAb, MAb specific and volumetric production rates, and residual lactate decreased. Finally, low growth rates observed at dilution rates above the batch maximum growth rate suggest the requirement of a minimum cell density, and concomitant autocrine growth factors, for growth. Production studies, underway, on the implementation of EFBC in bioreactors should overcome interpretation difficulties due to the lack of an accurate control of pH and dissolved oxygen; such limitations are always associated with any study performed in T-flasks.

Acknowledgements

This research was supported by grants DGAPA-National University of Mexico No. 1N300991 and National Council of Science and Technology Mexico No. 1105-N9201. We wish to express our gratitude to Mrs. Maribel Flores Martínez and Mr. Jesus Martínez Dorantes for their technical assistance in this work.

References

- Boraston R, Thompson PW, Garland S and Birch JR (1984) Growth and oxygen requirements of antibody producing mouse hybridoma cells in suspension culture. *Dev. Biol. Stand.* 55: 103-111.
- Chevalot I & Marc A (1993) Interest of fed-batch culture for the production of a membrane-bound protein by an adherent animal cell. *Biotech. Letts.* 15: 791-796.
- Escner AA, Roels JA & Kossen NWF (1981) Fed-batch culture: modeling and applications in the study of microbial energetics. *Biotech. Bioeng.* 23: 1851-1871.
- Flickinger MC, Goebel NK & Bohn MA (1990) Determination of specific monoclonal antibody secretion rate during very slow hybridoma growth. *Bioproc. Eng.* 5: 155-164.
- Flickinger MC, Bibila TA & Kitchin K (1992) Prediction and experimental investigation of the effect of altered peptide chain assembly rate on antibody secretion using a structured model of antibody synthesis and secretion. In: Ladisch MR and Bose A (ed.) *Harnessing Biotechnology for the 21st Century*. (pp.345-350) American Chemical Society.
- Frame KK & Hu WS (1990) The loss of antibody productivity in continuous culture of hybridoma cells. *Biotech. Bioeng.* 35: 469-476.
- Glacken MW, Huang C & Sinskey AJ (1989) Mathematical descriptions of hybridoma culture kinetics. III. Simulation of fed-batch bioreactors. *J. Biotech.* 10: 39-66.
- Higareda AE, Possani LD & Ramfrez OT (1993) Use of on-line culture redox potential and oxygen uptake rate measurements in advanced computerized nutrient feeding strategies for optimization of MAb production. Paper 104g American Institute of Chemical Engineers Annual Meeting. St. Louis MO, U.S.A.
- Hiller GW, Aeschlimann, AD, Clark DS & Blanch HW (1991) A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum-free medium. *Biotech. Bioeng.* 38: 733-741.
- Hu WS & Piret JM (1992) Mammalian cell culture processes. *Curr. Opinion Biotech.* 3: 110-114.
- Jo ECh, Kim DI & Moon HM (1993a) Step-fortifications of nutrients in mammalian cell culture. *Biotech. Bioeng.* 42: 1218-1228.
- Jo ECh, Park HJ, Kim DI & Moon HM (1993b) Repeated fed-batch culture of hybridoma cells in nutrient-fortified high-density medium. *Biotech. Bioeng.* 42: 1229-1237.
- Keller R & Dunn IJ (1978) Fed-batch microbial culture: models, errors and applications. *J. Appl. Chem. Biotech.* 28: 508-514.
- Kurokawa H, Ogawa T, Kamihira M, Park YS, Iijima S & Kobayashi T (1993) Kinetic study of hybridoma metabolism and antibody production in continuous culture using serum-free medium. *J. Ferm. Bioeng.* 76: 128-133.

- Lee GM, Varma A and Palsson BO (1991) Production of monoclonal antibody using free-suspended and immobilized hybridoma cells: effect of serum. *Biotech. Bioeng.* 38: 821-830.
- Leno M, Merten OW & Hache J (1992) Kinetic analysis of hybridoma growth and monoclonal antibody production in semicontinuous culture. *Biotech. Bioeng.* 39: 596-606.
- Low KS, Harbour C, Barford JP (1987) A study of hybridoma cell growth and antibody production kinetics in continuous culture. *Biotech. Tech.* 1: 239-244.
- Martens DE, de Gooijer CD, Velden-de Groot CAM, Beuvery, EC & Tramper J (1993) Effect of dilution rate on growth, productivity, cell cycle and size and shear sensitivity of a hybridoma cell in a continuous culture. *Biotech. Bioeng.* 41: 429-439.
- Miller WM, Blanch HW & Wilke CR (1988) A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate and pH. *Biotech. Bioeng.* 32: 947-965.
- Omasa T, Higashiyama K, Shioya S & Suga Ki (1992) Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. *Biotech. Bioeng.* 39: 556-564.
- Ozturk SS, Riley MR & Palsson BO (1992) Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism and antibody production. *Biotech. Bioeng.* 39: 418-431.
- Papoutsakis ET (1991) Media additives for protecting freely suspended animal cells agitation and aeration damage. *TIBTECH.* 9: 316-324.
- Ramírez OT & Mutharasan R (1990) Cell cycle and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotech. Bioeng.* 36: 839-848.
- Ramírez OT, Zamora R, Quintero R & López-Munguía A (1994a) Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme Microb. Tech.* (in press).
- Ramírez OT, Aguilar-Aguila A & Quintero R (1994b) Dynamic behavior of activated-sludge in exponentially fed-batch cultures subjected to step perturbations. In: Galindo E and Ramírez OT (eds.) *Advances in Bioprocess Engineering*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 345 - 353.
- Ray NG, Karkare SB & Runstadler PW (1989) Cultivation of hybridoma cells in continuous cultures: kinetics of growth and product formation. *Biotech. Bioeng.* 33: 724-730.
- Reddy S, Bauer KD, Miller, WM Determination of antibody content in live versus dead hybridoma cells: analysis of antibody production in osmotically-stressed cultures. *Biotech. Bioeng.* (in press).
- Reuveny S, Velez D, Macmillan JD & Miller L (1987) Factors affecting monoclonal antibody production in culture. *Dev. Biol. Stand.* 66: 169-174.
- Salazar-Kish JM & Heath CA (1993) Comparison of a quadroma and its parent hybridomas in fed-batch culture. *J. Biotech.* 30: 351-365.

- Schmid G, Zilg H & Johannsen R (1992) Repeated batch cultivation of rBHK cells on cytodex 3 microcarriers: antithrombin III, amino acid, and fatty acid metabolic quotients. *Appl. Microb. Biotech.* 38: 328-333.
- Tharakan JP & Chau PC (1986) Serum free fed batch production of IgM. *Biotech. Letts.* 8: 457-462.
- Truskey GA, Nicolakis DP, DiMasi D, Haberman A & Swartz RW (1990) Kinetic studies and unstructured models of lymphocyte metabolism in fed-batch culture. *Biotech. Bioeng.* 36: 797-807.
- Westgate PJ, Wayne CR, Emery AH, Hasegawa PM & Heinstein PF (1991) Approximation of continuous growth of *Cephalotaxus harringtonia* plant cell cultures using fed-batch operation. *Biotech. Bioeng.* 38: 241-246.
- Yamané T & Shimizu S (1984) Fed-batch techniques in microbial processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* 30: 145-194.
- Zamudio F, Saavedra R, Martin BM, Gurrola-Briones G, Herion P and Possani LD (1992) Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *J. Biochem.* 204: 281-292.

APENDICE I.2
 COMPLEMENTO DEL ARTICULO

En esta sección se presentan las figuras de los cultivos exponencialmente alimentados, mencionados pero no mostrados en el artículo (apéndice I.1).

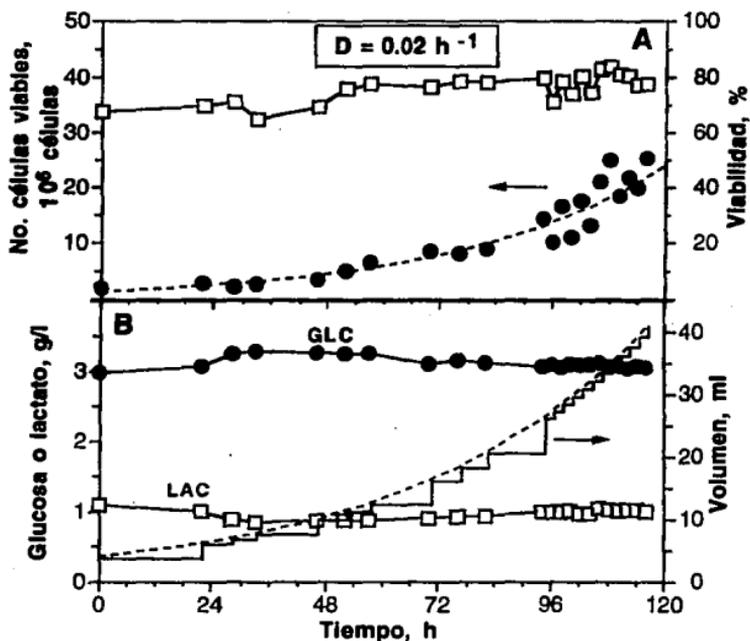


Figura I2.1. Cultivo exponencialmente alimentado a una tasa de dilución de 0.02 h^{-1} .

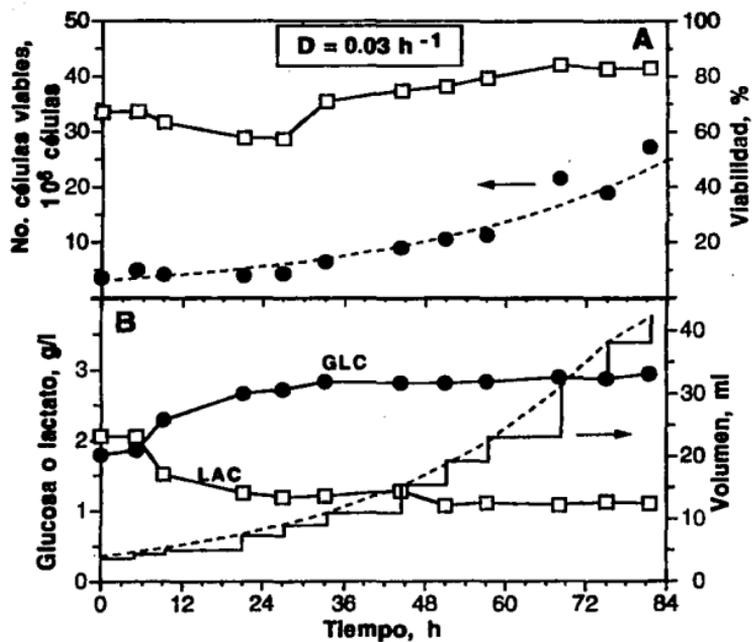


Figura 12.2. Cultivo exponencialmente alimentado a una tasa de dilución de 0.03 h^{-1} .

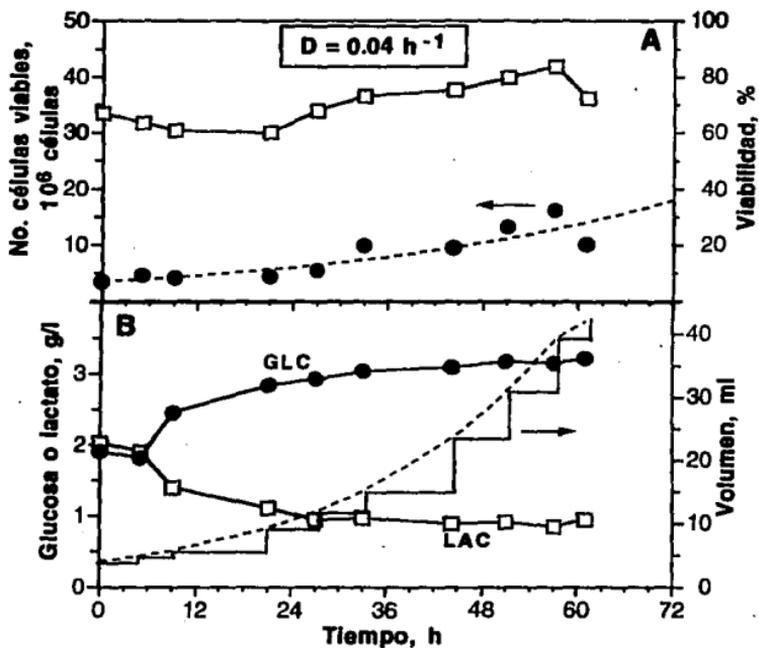


Figura 12.3. Cultivo exponencialmente alimentado a una tasa de dilución de 0.04 h^{-1} .

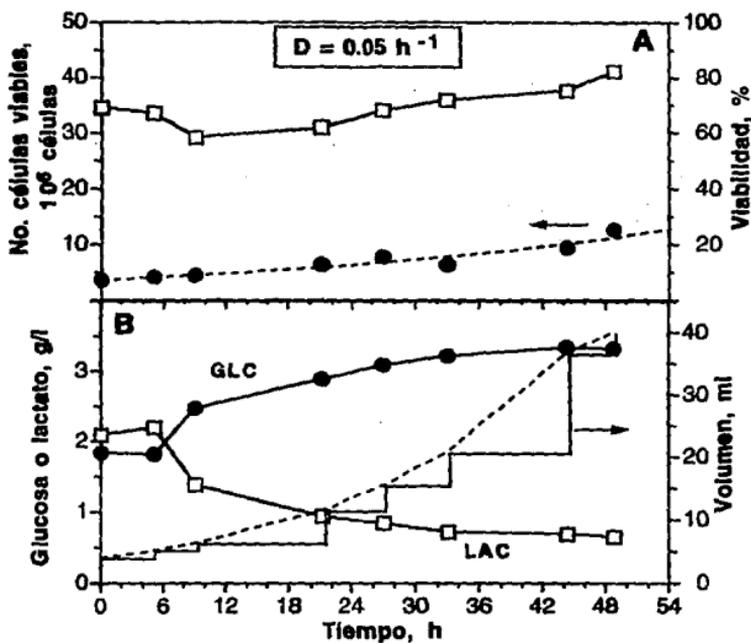


Figura 12.4. Cultivo exponencialmente alimentado a una tasa de dilución de 0.05 h^{-1} .