



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA

**ESTUDI D'ESTRATÈGIES DE CULTIU
PER A CÈL·LULES ANIMALS, BASADES EN EINES
D'INSTRUMENTACIÓ I CONTROL.**

Memòria que per optar al grau de
Doctor per la UAB, programa de
doctorat Biotecnologia llicenciat en
Ciències Químiques, presenta:

XAVIER GÁMEZ MONTOYA

Bellaterra, novembre de 2000

FRANCESC GÒDIA i CASABLANCAS, Catedràtic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i JORDI JOAN CAIRÓ i BADILLO, Professor associat del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que el llicenciat Xavier Gámez Montoya ha dut a terme sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química, el treball que amb el títol de: **Estudi d'estratègies de cultiu per a cèl·lules animals, basades en eines d'instrumentació i control**, es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al grau de Doctor en Ciències Químiques.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem davant de l'Escola de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi signant aquesta certificació a

Bellaterra, novembre de 2000

Francesc Gòdia i Casablanca

Jordi Joan Cairó i Badillo

a l'Elvira

AGRAÏMENTS

Avui, poc més de cinc anys després de la meva entrada al Departament d'Enginyeria Química, em trobo davant de l'ordinador escrivint el capítol d'agraïments. Si en aquella alçada de la meva vida algú m'hagués preguntat si finalitzaria el doctorat, la meva resposta hagués estat: “no ho tinc massa clar”. Durant aquest període, més d'una vegada m'he preguntat si el meu lloc estava en aquest camp o realment s'estaven desaprofitant les meves capacitats com a professional a la indústria. Fa cosa de dos anys es va produir un canvi en l'enfocament del treball, així com una motivació real per la feina que estava realitzant. D'aquest últim fet, haig de fer responsable a l'Elvira que, a més ha estat en tot moment recolzant-me en les decisions que he anat prenent. Per això, i moltes altres coses, et vull dedicar aquest treball. El segon fet que haig de remarcar és la gran aportació en la definició del treball per en Carles Paredes, així com la predisposició dels meus directors per aprovar els seus suggeriments. En ocasions, es pensa que els directors que no segueixen el dia a dia del treball de laboratori podrien ser prescindibles. En el cas del meu director, en Quico Gòdia, aquesta afirmació seria totalment injusta, ja que a més d'invertir moltes hores en la gestió i representació dels interessos del grup de MABS, dintre i fora del Departament, és un referent científic sempre disposat a oferir-te el seu ajut, molt valuós quan se t'han acabat les idees, o bé estàs desesperat perquè un experiment no surt o no acabes d'entendre allò que et porta de cap. A més a més, les seves correccions han fet que aquesta memòria no sigui tan “tediosa de llegir”. Com a contrapès d'en Quico, tenim en Jordi Cairó. Si algú ha cregut en la meva persona és ell. Suposo que finalment li haig de donar la raó de tot allò que fa alguns anys en parlàvem, i jo no hi estava massa d'acord. Gràcies per la teva perseverança i generositat, a més de la paciència que has tingut en tot moment. Espero que el camí que hem recorregut fins aquí, sigui només l'inici de l'èxit dels grans reptes que ens hem marcat.

Gran part d'aquest treball no hagués estat possible sense la col·laboració de dues persones alienes al Departament: en Màrius Tresánchez i en Ramon Bragós. A més de passar bones estones treballant i intercanviant coneixements, us considero un referent de com s'han de fer bé les coses. Tampoc voldria deixar de mencionar a aquelles persones del Departament que han estat disponibles quan m'ha calgut un cop de mà: Toni, Rossi, Manuel, o han suportat les meves entrades i sortides del seu laboratori, o bé, hem compartit bones converses de passadís o de despatx: Fernando, Núria, Oriol, Juan, Joan, Eva, Sílvia. A tots vosaltres, moltes gràcies!.

També a les institucions i empreses que han finançat la nostra activitat. No són menys que els altres però si més impersonals.

La meva relació amb en Julio és un cas a banda. Plegats vàrem començar aquest viatge i, segurament, junts l'acabarem. El seu suport, tant en la faceta professional com en la personal, ha estat ferm, sense fissures. Considero que persones d'aquesta naturalesa són difícils de trobar, pel que tinc molta sort de tenir-lo com amic.

També vull tenir paraules d'agraïment a tots aquells que s'han preocupat per mi des de Palafrugell (Imma, Glòria, Juli, Pere), des del carrer Aragó (Ignasi) o des de Cerdanyola (Marina). Tampoc em podria oblidar de la meva família de Sant Cugat, en què m'he pogut recolzar sempre que ho he necessitat. Per finalitzar, gràcies a la meva família de Palafrugell, singularitzant-ho en la persona de la meva mare i el meu germà, pel costat i suport rebut durant tot aquest temps.

ÍNDEX.

1. RESUM.	1
2. INTRODUCCIÓ.	5
2.1. EL CULTIU DE CÈL·LULES ANIMALS.	5
2.1.1. Perspectiva històrica dels cultius <i>in vitro</i> de cèl·lules animals.	5
2.1.2. Interès i aplicacions del cultiu <i>in vitro</i> de cèl·lules animals.	7
2.1.3. Trets distintius de la cèl·lula animal.	8
2.1.4. Característiques dels cultius <i>in vitro</i> de cèl·lules animals.	10
2.1.5. Cèl·lules animals i línies cel·lulars emprades en cultius <i>in vitro</i> .	12
2.1.6. Evolució d'un cultiu cel·lular.	13
2.2. HIBRIDOMES I ANTICOSSOS MONOCLONALS.	14
2.2.1. Obtenció d'hibridomes.	15
2.2.2. Estructura dels anticossos monoclonals.	16
2.2.3. Producció d'anticossos monoclonals mitjançant hibridomes.	17
2.3. OPTIMIZACIÓ DELS CULTIUS <i>IN VITRO</i> D'HIBRIDOMES.	18
2.3.1. Definició del medi de cultiu.	18
2.3.2. Purificació.	19
2.3.3. Metabolisme i fisiologia cel·lular.	19
2.3.4. Paràmetres fisicoquímics.	20
2.3.5. Sistemes de cultiu.	20
2.3.6. Monitoratge i control.	22
3. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL.	25
4. DESENVOLUPAMENT I IMPLEMENTACIÓ DE MESURES EN LÍNIA.	27
4.1. LA MESURA EN ELS CULTIUS CEL·LULARS.	27
4.2. LA MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR.	28

4.3. ESPECTROSCÒPIA D'IMPEDÀNCIA.	31
4.3.1. Elecció del rang de freqüències.	35
4.3.2. Estudis preliminars.	36
4.3.3. Validació del mètode de mesura.	36
4.4. MÈTODES ÒPTICS.	40
4.4.1. Calibratge extern de la sonda.	43
4.4.2. Comportament de la sonda Aquasant en el seguiment de cultius en bioreactor.	44
4.5. BALANÇ MÀSSIC D'OXIGEN.	49
4.5.1. Caracterització del sistema d'aeració.	51
4.5.2. Mesura de la OUR mitjançant el mètode dinàmic.	55
4.5.3. Precisió de la mesura de OUR.	58
4.5.4. Monitoratge de la OUR en línia.	58
5. DESENVOLUPAMENT DEL PROGRAMARI DE CONTROL DEL PROCÉS.	63
5.1. MOTIVACIONS DE LA SEVA CONSTRUCCIÓ.	63
5.2. DEFINICIÓ DELS REQUERIMENTS.	63
5.3. CRITERIS DE SELECCIÓ DE L'ENTORN DE PROGRAMACIÓ.	64
5.4. ESPECIFICACIONS TÈCNiques.	65
5.5. FUNCIONS I DISSENY TÈCNIC.	67
5.5.1. Mòduls de comunicacions.	68
5.5.1.1. Mòdul DCU_lib: controlador de la DCU.	68
5.5.1.2. Mòdul PCL_lib: controlador de la targeta d'adquisició de dades.	71
5.5.1.3. Mòdul Bom_lib: controlador de les bombes.	71
5.5.1.4. Mòdul ELV_lib: controlador de les electrovàlvules.	72
5.5.1.5. Mòdul BIO_lib: controlador del turbidímetre.	73
5.5.2. Mòduls de control lògic de l'aplicació.	74
5.5.2.1. Mòdul Sequen.	74
5.5.2.2. Mòdul Protocol.	75
5.5.2.3. Mòdul Proces.	76

5.2.3. Altres mòduls.	77
5.5.4. Interfície gràfica d'usuari.	77
5.5.5. Registre de dades.	81
5.5.6. Errors durant l'execució.	81
5.5.7. Sintaxi d'ordres Sequen.	82
5.5.7.1. Ordres per a la gestió d'equips.	82
5.5.7.2. Ordres per inicialitzar dispositius (equips + detectors).	83
5.5.7.3. Ordres per a la gestió en l'adquisició de dades.	83
5.5.7.4. Etiquetes i sentències d'operació amb arxius de protocol i subrutines.	84
5.5.7.5. Sentències de decisió lògiques.	85
5.5.7.6. Ordres de l'arxiu de registre (Sequen.log).	86
5.5.7.7. Ordres amb la variable temps.	86
5.5.7.8. Crida a Processa ().	87
5.5.7.9. Assignacions i operacions amb variables.	87
5.5.7.10. Anàlisi d'arxius de protocol: Exemples.	89
5.6. L'APLICACIÓ SUPERVIS.	94
6. ESTRATÈGIES D'OPERACIÓ I CONTROL DE NUTRIENTS EN CULTIUS D'HIBRIDOMES.	99
6.1. ESTRATÈGIES D'OPERACIÓ AMB CÈL·LULES ANIMALS.	99
6.2. OPERACIÓ EN DISCONTINU.	100
6.2.1. Funcionament i posta a punt del cultiu en discontinu.	100
6.2.2. Caracterització del cultiu d'hibridomes en discontinu.	103
6.2.3. Fortificació del medi basal DMEM.	107
6.2.4. Relacions estequiomètriques i velocitats específiques.	110
6.3. OPERACIÓ EN DISCONTINU ALIMENTAT O <i>FED-BATCH</i> .	118
6.3.1. Funcionament i posta a punt del cultiu en <i>fed-batch</i> .	119
6.3.2. <i>Fed-batch</i> amb control dinàmic de nutrients en línia.	126
6.3.2.1. Cultiu en <i>fed-batch</i> FB01.	126
6.3.2.2. Cultiu en <i>fed-batch</i> FB02.	130
6.3.2.3. Cultiu en <i>fed-batch</i> FB03.	132
6.3.3. Estudi de la toxicitat del brou final dels cultius en discontinu i <i>fed-batch</i> .	140

6.4. OPERACIÓ EN CONTINU AMB PERFUSIÓ.	142
6.4.1. Funcionament i posta a punt del cultiu en continu amb perfusió.	143
6.4.1.1. Elecció del sistema de retenció cel·lular.	143
6.4.1.2. Elecció de la velocitat de recirculació.	144
6.4.1.3. Caracterització del nou sistema d'aeració.	146
6.4.1.4. Funcionament i connexions de l'operació en perfusió.	148
6.4.1.5. Esquema de control de la velocitat de perfusió.	149
6.4.2. Control de l'entorn cel·lular mitjançant l'ajust de la velocitat de perfusió.	152
6.4.2.1. Fase d'acumulació cel·lular.	153
6.4.2.2. Fase de producció.	157
6.4.3. Comparació amb d'altres modes d'operació en bioreactor.	165
7. CONCLUSIONS.	169
8. MATERIALS I MÈTODES.	171
8.1. EQUIPS DE CULTIU DE CÈL·LULES ANIMALS.	171
8.1.1. Flascons de cultiu.	171
8.1.2. Flascons de cultius agitats.	171
8.1.3. Bioreactor Biostat MCD.	172
8.2. INSTRUMENTACIÓ I EQUIPAMENT ASSOCIAT AL BIOREACTOR.	174
8.2.1. Sistema de bombolleig.	174
8.2.2. Mòdul de microfiltració CellFlo.	175
8.2.3. Sonda Aquasant AF44 CS/R.	176
8.2.4. Turbidímetre Aquasant AS82.	176
8.2.5. Electrovàlvula de 3-vies Sirai.	176
8.2.6. Unitats de bombeig.	177
8.2.7. Fonts suplementàries d'energia.	177
8.3. EQUIPAMENT PER A LA GESTIÓ DE LA INSTRUMENTACIÓ I L'ADQUISICIÓ DE DADES.	178
8.3.1. Ordinador de gestió.	179
8.3.2. Targeta Advantech PCL-812-PG.	179
8.3.3. Caixa de comunicacions i cablatge.	179
8.3.4. Targeta Opto22 AC24AT.	180

8.4. LENGUATGES DE PROGRAMACIÓ.	181
8.4.1. Llenguatge ANSI C.	181
8.4.2. LabWindows/CVI.	182
8.5. LÍNIA CEL·LULAR.	184
8.6. MEDIS DE CULTIU.	184
8.6.1. Medi base.	184
8.6.2. Medi d'alimentació per al cultiu en <i>fed-batch</i>.	186
8.6.3. Medis basals concentrats.	187
8.6.4. Preparació d'estocs dels components per suplementar als medis.	188
8.7. MANTENIMENT DE LA LÍNIA CEL·LULAR.	190
8.7.1. Congelació d'hibridomes.	190
8.7.2. Descongelació d'hibridomes.	191
8.7.3. Manteniment de la línia cel·lular en un cultiu en suspensió.	192
8.7.4. Control de l'esterilitat dels cultius.	193
8.8. CONFIGURACIONS I PROCEDIMENTS OPERACIONALS EN EL BIOSTAT MCD.	194
8.8.1. Operació en discontinu.	194
8.8.1.1. Configuració.	194
8.8.1.2. Preparació del bioreactor.	199
8.8.2. Operació en <i>fed-batch</i>.	201
8.8.2.1. Configuració.	201
8.8.2.2. Preparació del bioreactor.	201
8.8.3. Operació en continu amb perfusió.	203
8.8.3.1. Configuració.	203
8.8.3.2. Preparació del mòdul CellFlo.	205
8.8.3.3. Preparació del bioreactor.	206
8.9. MÈTODES ANALÍTICS.	207
8.9.1. Recompte cel·lular.	207
8.9.2. Determinació de la concentració de substrats i productes cel·lulars.	208
8.9.2.1. Anàlisi de glucosa i lactat.	208
8.9.2.2. Anàlisi d'aminoàcids i amoni.	209
8.9.2.3. Determinació de la concentració de l'anticòs monoclonal.	210

8.10. MESURA D'IMPEDÀNCIA ELÈCTRICA.	214
8.10.1. Equipament per a la mesura d'impedància elèctrica.	214
8.10.1.1. HP4192A.	215
8.10.1.2. Etapa frontal remota (<i>front-end</i>).	215
8.10.1.3. Ordinador i programa de gestió.	215
8.10.1.4. Configuració del sistema per a l'obtenció del senyal elèctric.	216
8.10.2. Obtenció i tractament de les dades d'impedància.	217
8.10.2.1. Obtenció.	217
8.10.2.2. Mètode de calibratge en línia.	217
8.10.2.3. Mètode de calibratge a tres referències.	217
8.10.3. Procediment experimental per a la mesura d'impedància.	218
8.10.3.1. Línies cel·lulars i manteniment.	218
8.10.3.2. Medis de cultiu.	219
8.10.3.3. Preparació dels inòculs.	219
8.10.3.4. Procediment amb la cubeta estàtica.	219
8.10.4. Determinació del pes sec.	220
9. BIBLIOGRAFIA.	221
10. NOMENCLATURA.	235
APÈNDIXS.	243
APÈNDIX A. EXEMPLES DE COMUNICACIÓ ENTRE L'ORDINADOR I LA DCU.	243
APÈNDIX B. ARXIUS DE PROTOCOL PER A CADA ESTRATÈGIA DE CULTIU.	248
APÈNDIX C. CORBES DE CALIBRATGE DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR.	255

1. RESUM.

1. RESUM.

En les últimes dues dècades, s'han desenvolupat processos de producció d'una gran quantitat de biomolècules d'interès terapèutic, com els anticossos monoclonals i les proteïnes derivades de la manipulació genètica, mitjançant el cultiu de cèl·lules animals. Les configuracions simples d'operació, cas del discontinu o dels sistemes en continu sense retenció cel·lular, han permès desenvolupar cultius encara limitats, amb baixes concentracions de cèl·lules viables i baixes productivitats volumètriques. Per aquest motiu, s'han de realitzar esforços per desenvolupar sistemes de producció amb altes concentracions cel·lulars i llargs períodes de producció. No obstant, un dels principals problemes que cal abordar per augmentar la durada del cultiu i la productivitat és evitar, tant com sia possible, l'acumulació de subproductes inhibitoris per al creixement i alimentar el cultiu amb tots els nutrients essencials en concentracions suficients. Però per portar a terme aquests requisits, i obtenir així un creixement òptim del cultiu de cèl·lules animals al bioreactor, és molt important el monitoratge en línia de l'entorn cel·lular per després actuar sobre el cultiu amb la informació adquirida.

En aquest treball s'ha abordat el problema de l'optimització dels cultius de cèl·lules animals, més específicament dels hibridomes, des de l'estudi de l'aplicació de diferents estratègies de cultiu, com les operacions en discontinu o *batch*, discontinu alimentat o *fed-batch*, i continu amb perfusió. Aquestes estratègies de cultiu s'han realitzat en un bioreactor de tanc agitat amb l'ajut d'eines d'instrumentació i control que genèricament s'han utilitzat per obtenir informació i poder actuar, en els casos que ha estat necessari, sobre l'entorn cel·lular. En l'estratègia en discontinu s'han validat les mesures de concentració cel·lular i d'activitat cel·lular, utilitzades per obtenir informació en línia de l'estat del cultiu, i s'ha optimitzat l'operació mitjançant la fortificació del medi de cultiu, encara que l'increment de rendiment obtingut no ha estat gaire significatiu respecte als cultius realitzats amb medi estàndard. Tot i que aquest és el sistema d'operació més estès des del punt de vista industrial, bàsicament per la seva simplicitat, es demostra que és clarament subòptim, ja que les cèl·lules es troben sotmeses sempre a un ambient canviant en què les condicions de cultiu són poc favorables: presència de concentracions excessivament elevades dels diferents nutrients al principi del cultiu, valors alts d'osmolaritat i acumulació de productes tòxics en els estadis finals del cultiu. Mitjançant l'operació en *fed-batch* s'ha intentat donar solució als problemes de l'operació en discontinu, tot canviant el metabolisme cel·lular fixant els substrats majoritaris a baixos nivells de concentració, i així poder reduir la producció de subproductes inhibitoris i, per tant, augmentar la concentració cel·lular i perllongar la vida del cultiu. Per a tal propòsit, s'ha fet necessari l'ús de diferents esquemes de control de nutrients amb l'ajut de les mesures implementades en línia i del disseny d'una solució concentrada d'addició. En

concret, les estratègies desenvolupades graviten sobre dues mesures en línia, la de la concentració cel·lular i la del consum d'oxigen, indicativa de l'activitat cel·lular. De totes formes, encara que els subproductes es redueixen i la concentració cel·lular augmenta, no ho fa en prou quantia respecte al cultiu amb medi fortificat i, per tant, la productivitat augmenta molt lleument.

Per eliminar els problemes tant de l'operació en discontinu com de l'operació en *fed-batch*, les cèl·lules són retingudes a l'interior del reactor mitjançant un mòdul de microfiltració extern i són cultivades amb una aportació constant de medi, de manera que es garanteix una presència dels diferents nutrients essencials a unes concentracions adequades per a les cèl·lules i s'aconsegueix eliminar els diferents subproductes cel·lulars que podrien esdevenir tòxics, aconseguint així unes condicions el més semblants possibles a les que tindria la cèl·lula *in vivo*. Per portar a terme l'operació del reactor en continu amb perfusió s'ha posat a punt tot el sistema de retenció cel·lular, s'ha implementat un nou sistema d'aeració per subministrar suficient oxigen dissolt al cultiu, s'ha dissenyat una configuració de control per aportar els nutrients necessaris al procés i permetre un millor entorn de cultiu i, un cop assolit valors de concentració cel·lular elevats, s'han provat diferents medis fortificats per augmentar el temps de residència del medi de cultiu dins del reactor, i així incrementar la concentració final de producte a la sortida del bioreactor. A partir dels resultats obtinguts s'ha pogut constatar que aquesta estratègia de cultiu permet obtenir elevades concentracions cel·lulars durant períodes de temps superiors als de les altres dues estratègies estudiades, incrementant-se també tant la productivitat com la concentració final d'anticòs monoclonal.

Aquesta memòria s'ha estructurat de manera que inicialment es fa una introducció (capítol 2) en què es revisa la importància dels cultius de cèl·lules animals en Biotecnologia, les seves principals aplicacions, els tipus de cèl·lules utilitzades, les característiques més importants del sistema de cultiu emprats i les possibles estratègies per poder millorar-ne la productivitat. Seguidament (capítol 3), es plantegen els principals objectius del treball. A continuació (capítol 4), s'enumeren quins són els principals mètodes de mesura de la concentració i l'activitat cel·lular que es poden emprar actualment per a cultius de cèl·lules animals, i es demostra, per a l'hibridoma KB-26.5, la validesa de les mesures en línia de l'espectroscòpia d'impedància, dels mètodes òptics i del mètode dinàmic de la demanda d'oxigen. Al capítol 5 es presenta el desenvolupament del software de control del procés per poder realitzar el control de nutrients, gestionar els diferents equips i adquirir tota la informació de l'evolució dels paràmetres cel·lulars. En el capítol 6 es descriuen les principals característiques de cadascuna de les estratègies utilitzades en el treball: discontinu, *fed-batch* i continu amb perfusió, així com les configuracions de control utilitzades, els medis de cultiu i alimentació, el comportament cel·lular avaluat a cada estratègia, i el rendiment del producte d'interès obtingut a cada cultiu. En el capítol 7 s'exposen les principals conclusions extretes

del treball. A continuació, es presenten els materials i mètodes emprats (capítol 8), s'enumeren les referències bibliogràfiques (capítol 9), es dóna un llistat de la nomenclatura utilitzada (capítol 10). Finalment, s'adjunten 3 annexos per complementar alguns aspectes concrets d'aquest treball.