



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,  
BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

**DISEÑO Y ANÁLISIS DE ESTRATEGIAS DE AJUSTE EN LA  
COMPOSICIÓN DE LA ALIMENTACIÓN PARA EL CULTIVO EN  
CÉLULAS CHO, COMO PARTE DE UNA PLATAFORMA DE  
OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO E  
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

**BASTIÁN DAVID CARVAJAL MARTÍNEZ**

PROFESORA GUÍA:  
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

PROFESOR COGUÍA:  
J. CRISTIAN SALGADO HERRERA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por ANID, Programa IDeA, Proyecto  
Fondef-IDEA ID18I10308

SANTIAGO DE CHILE  
2021

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERÍA CIVIL QUÍMICA E INGENIERÍA CIVIL EN  
BIOTECNOLOGÍA

POR: Bastián David Carvajal Martínez

FECHA: 19 de diciembre de 2021

PROFESORA GUÍA: Ziomara Gerdtzen Hakim

DISEÑO Y ANÁLISIS DE ESTRATEGIAS DE AJUSTE EN LA COMPOSICIÓN DE LA  
ALIMENTACIÓN PARA EL CULTIVO EN CÉLULAS CHO, COMO PARTE DE UNA  
PLATAFORMA DE OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

La síntesis de bio-productos a partir de células en condiciones controladas requiere que sean suplementadas con todos los nutrientes necesarios. Dentro de ellos, los aminoácidos son fundamentales como precursores de proteínas y metabolitos, y como fuentes energéticas.

Para concebir cómo se debe realizar la producción en células y cómo llevar a cabo la suplementación, se han desarrollado metodologías computacionales de diseño, permitiendo acelerar la concepción y reducir costos. Allí se enmarca el proyecto ID18I10308, consistente en la creación de una plataforma de diseño de cultivos celulares. El presente trabajo tiene por objetivo adecuar esta plataforma, al incluir una metodología que calcula una composición de aminoácidos a alimentar en cultivos fed-batch de la línea celular CHO-tPA, a fin de proveer correctamente los nutrientes aminoacídicos y aumentar la síntesis del bio-producto.

Se implementó un método de análisis de datos biológicos, en el que se calculan *ratios* estequiométricos entre las tasas específicas de consumo de aminoácidos, utilizando siempre uno de referencia. Ésta correspondió al aminoácido que la plataforma ajusta (glutamato o glutamina), y se estructuró el ajuste como una función implementable en el software utilizado en el proyecto; con ello, el mismo modelo estimaría los coeficientes y los emplearía para calcular la composición a utilizar. Se simuló para ambas etapas de diseño, y se comparó con el escenario donde se usó una composición ya definida. Además, se intentó cumplir con los requerimientos nutricionales en diferentes fases del cultivo al calcular la composición en más de un instante, fraccionando la simulación y en cada tramo utilizando la función de ajuste.

Las predicciones obtenidas indicaron que el ajuste, usado para calcular una única nueva composición, mejora la productividad específica de los cultivos en un promedio de 7 %, pero el nivel de tPA depende principalmente de la cantidad de células viables disponibles más que de la concentración de los aminoácidos. Al incluir un segundo ajuste, la productividad específica disminuye entre 1 y 5 %, y se confirmó una relación directa entre la cantidad de células y la de tPA, pues hubo incremento de éste sólo cuando aumentan las células, y en igual nivel. Sin embargo, la modificación realizada para incorporar un ajuste adicional implicó que el sistema no pudiera ser modelado correctamente, ya que el controlador se desestabiliza en todos los casos y la magnitud de la fluctuación depende del punto de detención de la simulación.

El ajuste implementado permitió nivelar las concentraciones de los aminoácidos alimentados en base a sus consumos, pero para aumentar la síntesis de bio-producto (según el modelo) es necesario maximizar el número de células. Si se modifica el ajuste para ese fin, será posible incluirlo definitivamente al proyecto, pues además es aplicable a otras líneas celulares al sólo analizar datos experimentales de cantidad de células y metabolitos medibles.

*Labor Omnia Vincit*

*Virgilio, "Geórgicas"*

# Agradecimientos

Caminos largos, caminos arduos, caminos desafiantes. Y cada uno de ellos se deben sortear con toda la entereza y seguridad de que uno puede lograrlo, que uno es capaz; y si además el camino te agrada, te motiva, te llena, estás donde perteneces y mereces. Así puedo definir mi paso por la universidad, por el DIQBM, y también mis caminos previos.

Mi familia ha sido mi apoyo desde siempre, desde que tengo uso de razón. Con ellos he aprendido que el amor y el apoyo es incondicional, y que el esfuerzo y la perseverancia son el motor del trabajo propio. Tendría que escribir mil páginas o más para agradecerles a mi mamá, a mi papá, a mi hermano, a mi abuela, a mi tío, a mi abuelo que desde otro plano me acompaña y me guía, por todo lo que me han aportado para ser la persona que soy actualmente. Agradeceré cada día por tenerlos en mi vida, por mostrarme lo hermoso que es la vida familiar y por saber que cuento con cada uno por siempre.

Mis amigas y amigos, otro aspecto de mi vida que me mantiene pleno y me da energía. Amigos de todos lados: universidad, colegio, fútbol, de la vida misma. Amigos como Cata, Lucho, Consu, Javi, Ami, Alex, los Infelices. Algunos están más, algunos están menos, pero son gente incondicional que espero tener toda la vida, muchas gracias por acompañarme hasta ahora.

Quisiera agradecer finalmente a mis profesores. A Ziomara, por darme la oportunidad de participar de un proyecto que representaba un gran desafío para mí, por confiar en mi trabajo y apoyarme no sólo ahora sino que los últimos años. A Cristián, por ser un apoyo durante estos meses y mostrarme que ser metodológico y dar pequeños pasos sin adelantarse siempre permite un mejor progreso.

Espero que la vida siga siendo tan o más linda de lo que ha sido hasta ahora, y nunca olvidar la consigna “el trabajo todo lo vence” que tanto me marcó en mi época escolar. Porque es cierto, el esfuerzo, la confianza en uno mismo y la humildad son el motor de una vida buena, de una vida feliz.

# Tabla de contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes generales . . . . .	2
1.1.1. Manufactura de bio-productos . . . . .	2
1.1.2. Diseño de cultivos y análisis de datos biológicos . . . . .	3
1.1.3. Proyecto Fondef ID18I10308 . . . . .	6
1.1.4. Motivación e impacto del trabajo . . . . .	10
1.2. Estado del Arte . . . . .	10
1.2.1. Metodologías de ajuste y diseño de cultivos . . . . .	10
1.2.2. <i>Machine Learning</i> en métodos de diseño . . . . .	11
1.2.3. Análisis comparativo . . . . .	12
1.3. Objetivos . . . . .	14
1.3.1. Objetivo general . . . . .	14
1.3.2. Objetivos específicos . . . . .	14
1.4. Alcances y limitaciones . . . . .	14
<b>2. Plan de trabajo y metodología</b>	<b>15</b>
2.1. Metodología general . . . . .	15
<b>3. Métodos de ajuste y de predicción</b>	<b>16</b>
3.1. Metodología específica . . . . .	17
3.2. Ajuste estequiométrico de composición de medio . . . . .	17
3.2.1. Descripción del método . . . . .	17
3.2.2. Análisis de funcionamiento . . . . .	20
3.3. Predicción de consumos en el tiempo . . . . .	24
3.4. Discusión . . . . .	25
<b>4. Implementación de ajuste de composición</b>	<b>27</b>
4.1. Metodología específica . . . . .	27
4.2. Incorporación del método al modelo matemático . . . . .	28
4.3. Ajuste 1: diseño de cultivo fed-batch . . . . .	30
4.4. Ajuste 2: optimización del diseño fed-batch . . . . .	34
4.5. Discusión . . . . .	39
<b>5. Modificación de ajuste en el tiempo</b>	<b>42</b>
5.1. Metodología específica . . . . .	43
5.2. Determinación de momentos de cambio . . . . .	44
5.3. Incorporación de reajuste al modelo . . . . .	46

5.4. Ajuste 1: diseño de cultivo fed-batch . . . . .	47
5.5. Ajuste 2: optimización del diseño fed-batch . . . . .	50
5.6. Discusión . . . . .	55
<b>6. Discusión y consideraciones finales</b>	<b>57</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>60</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>65</b>
<b>Anexos</b>	<b>66</b>
<b>A. Testeo del método de análisis de Umulis y Hu y cálculo de <i>ratios</i></b>	<b>67</b>
<b>B. Plantilla de ingreso de datos medidos en el proyecto</b>	<b>69</b>
<b>C. Modelo cinético-dinámico de la plataforma de diseño</b>	<b>70</b>
<b>D. Códigos de programación para cálculo de <i>ratios</i></b>	<b>73</b>
D.1. Ajuste a partir de cultivo batch . . . . .	73
D.2. Ajuste a partir de cultivo fed-batch . . . . .	74
<b>E. Incorporación del ajuste de composición al código de programación de diseño</b>	<b>76</b>
E.1. Inclusión en el ajuste 1 (diseño de cultivo fed-batch) . . . . .	76
E.2. Inclusión en el ajuste 2 (optimización de cultivo fed-batch) . . . . .	77
<b>F. Simulaciones obtenidas para el ajuste 1 (cultivo fed-batch)</b>	<b>78</b>
F.1. Simulación con composición estandarizada . . . . .	79
F.2. Simulación con composición ajustada . . . . .	81
<b>G. Simulaciones obtenidas para el ajuste 2 (cultivo fed-batch optimizado)</b>	<b>83</b>
G.1. Simulación con composición estandarizada . . . . .	84
G.2. Simulación con composición ajustada . . . . .	86
<b>H. Análisis de consumos y tasas específicas en cultivos a escala de laboratorio</b>	<b>88</b>
<b>I. Simulaciones obtenidas para cultivo fed-batch preliminar con más de un ajuste de composición</b>	<b>90</b>
I.1. Segundo ajuste de composición a las 90 horas . . . . .	91
I.2. Segundo ajuste de composición a las 140 horas . . . . .	94
<b>J. Simulaciones obtenidas para cultivo fed-batch optimizado con más de un ajuste de composición</b>	<b>97</b>
J.1. Segundo ajuste de composición a las 85 horas . . . . .	98
J.2. Segundo ajuste de composición a las 135 horas . . . . .	101

# Índice de tablas

1.1. Tabla comparativa del trabajo presentado en contraste con las investigaciones estudiadas. . . . .	13
4.1. Resultados de productividad y concentración de células viables para la simulación del cultivo fed-batch no optimizado, en ambos escenarios (con y sin ajuste de composición). . . . .	30
4.2. Resultados de productividad y concentración de células viables para la simulación del cultivo fed-batch optimizado, en ambos escenarios (con y sin ajuste de composición). . . . .	34
5.1. Análisis de comportamiento de los cultivos desarrollados en laboratorio, anteriores al ajuste de composición. . . . .	45
5.2. Intervalos de tiempo definidos para realizar el diseño de cultivos por tramos. . . . .	46
5.3. Resultados de productividad y concentración de células viables para las iteraciones con más de un cambio de composición, en la simulación de cultivo fed-batch no optimizado. . . . .	47
5.4. Resultados de productividad y concentración de células viables para las iteraciones con más de un cambio de composición, en la simulación de cultivo fed-batch optimizado. . . . .	50
H.1. Comportamientos globales de las concentraciones y tasas de consumo de cada aminoácido medido en el cultivo batch. . . . .	88
H.2. Comportamientos globales de las concentraciones y tasas de consumo de cada aminoácido medido en el cultivo fed-batch. . . . .	89

# Índice de figuras

1.1. Alternativas de biorreactores agitados. Para cultivo de células animales se controla temperatura, pH y demanda biológica de oxígeno (DBO) [12]. . . .	3
1.2. Modelos para cultivos de células animales. Se presentan los diferentes caminos para sistemas biológicos dinámicos [13]. . . . .	4
1.3. Comparación de la producción de anticuerpo alcanzada entre el cultivo original y el optimizado [17]. . . . .	7
1.4. Diagrama de la operación del servicio [16]. . . . .	7
1.5. Metodología del servicio para el diseño de medios de cultivo y estrategias de alimentación para cultivos fed-batch. . . . .	8
1.6. Curvas de alimentación para aminoácidos y glucosa (costado izquierdo), junto con el perfil de los nutrientes en el tiempo y cómo se comportan respecto al <i>setpoint</i> definido (costado derecho) [19]. . . . .	9
4.1. Predicción de la productividad de tPA y tasa específica de producción para el cultivo fed-batch no optimizado, en el escenario con composición estandarizada. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	31
4.2. Predicción de la productividad de tPA y tasa específica de producción para el cultivo fed-batch no optimizado, en el escenario con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	31
4.3. Integral de células viables ( <i>IVCC</i> ) predicha para el cultivo no optimizado, para ambos escenarios: composición estándar (izquierda) y composición ajustada (derecha). La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	32
4.4. Rendimiento sustrato a producto ( $Y_{P/S}$ ) de cada aminoácido alimentado, para ambos escenarios en el diseño de cultivo fed-batch no optimizado. Para arginina, asparatato, asparragina y triptofano no se aprecian valores, lo que se traduce en la menor influencia que tienen estos aminoácidos en la generación de tPA. . . . .	33
4.5. Composición del medio a alimentar para ambos escenarios (estandarizada y calculada), en el diseño de cultivo fed-batch no optimizado. La ausencia de rectángulos implican una concentración nula. . . . .	34
4.6. Predicción de la productividad de tPA y tasa específica de producción para el cultivo fed-batch optimizado, en el escenario con composición estandarizada. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	35
4.7. Predicción de la productividad de tPA y tasa específica de producción para el cultivo fed-batch optimizado, en el escenario con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	36



4.8.	Integral de células viables ( <i>IVCC</i> ) predicha para el cultivo optimizado, para ambos escenarios: composición estándar (izquierda) y composición ajustada (derecha). La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	36
4.9.	Rendimiento sustrato a producto ( $Y_{P/S}$ ) de cada aminoácido alimentado, para ambos escenarios en el diseño de cultivo fed-batch optimizado. Para arginina, asparatato, asparragina y triptofano no se aprecian valores, lo que se traduce en la menor influencia que tienen teóricamente estos aminoácidos en la generación de tPA. . . . .	37
4.10.	Composición del medio a alimentar para ambos escenarios (estandarizada y calculada), en el diseño de cultivo fed-batch optimizado. La ausencia de rectángulos implican una concentración nula. . . . .	38
5.1.	Curva típica de biomasa, o también conocida como curva de crecimiento celular. Se presentan las células viables (línea continua) y biomasa total (línea punteada) como función del tiempo. Las fases del cultivo se muestran con corchetes, además de presentar gráficamente el parámetro IVCC (IVCD en la figura). [21] . . . . .	42
5.2.	Rendimiento sustrato a producto ( $Y_{P/S}$ ) de cada aminoácido alimentado, para más de un ajuste de composición en el diseño de cultivo fed-batch no optimizado. Para arginina, asparatato, asparragina y triptofano no se aprecian valores, lo que se traduce en la menor influencia que tienen estos aminoácidos en la generación de tPA. . . . .	48
5.3.	Composición del medio a alimentar por tramos, considerando un segundo cambio a las 90 [h] en el diseño de cultivo fed-batch no optimizado. La ausencia de rectángulos implican una concentración nula. . . . .	49
5.4.	Composición del medio a alimentar por tramos, considerando un segundo cambio a las 140 [h] en el diseño de cultivo fed-batch no optimizado. La ausencia de rectángulos implican una concentración nula. . . . .	49
5.5.	Rendimiento sustrato a producto ( $Y_{P/S}$ ) de cada aminoácido alimentado, para más de un ajuste de composición en el diseño de cultivo fed-batch optimizado. Para arginina, asparatato, asparragina y triptofano no se aprecian valores, lo que se traduce en la menor influencia que tienen estos aminoácidos en la generación de tPA. . . . .	51
5.6.	Composición del medio a alimentar por tramos, considerando un segundo cambio a las 85 [h] en el diseño de cultivo fed-batch optimizado. La ausencia de rectángulos implican una concentración nula. . . . .	52
5.7.	Composición del medio a alimentar por tramos, considerando un segundo cambio a las 135 [h] en el diseño de cultivo fed-batch optimizado. La ausencia de rectángulos implican una concentración nula. . . . .	52
5.8.	Predicción de la trayectoria de los nutrientes críticos (glucosa y glutamina), en el diseño de cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas (iteración 1). . . . .	53
5.9.	Predicción de la trayectoria de los nutrientes críticos (glucosa y glutamina), en el diseño de cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas (iteración 2). . . . .	54

5.10. Predicción de la trayectoria de los nutrientes críticos (glucosa y glutamina), en el diseño de cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 160 horas. . . . .	54
F.1. Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch no optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	79
F.2. Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	79
F.3. Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	80
F.4. Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch no optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	80
F.5. Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch no optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	81
F.6. Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	81
F.7. Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	82
F.8. Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch no optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	82
G.1. Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	84
G.2. Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	84
G.3. Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	85
G.4. Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	85
G.5. Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	86
G.6. Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	86
G.7. Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	87

G.8. Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	87
I.1. Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 90 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	91
I.2. Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 90 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	91
I.3. Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo Fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 90 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	92
I.4. Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 90 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	92
I.5. Producción de tPA y productividad específica, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 90 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	93
I.6. Integral de células viables, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 90 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	93
I.7. Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 140 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	94
I.8. Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 140 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	94
I.9. Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 140 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	95
I.10. Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 140 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	95
I.11. Producción de tPA y productividad específica, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 140 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	96
I.12. Integral de células viables, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 140 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	96
J.1. Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	98

J.2. Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	98
J.3. Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	99
J.4. Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	99
J.5. Producción de tPA y productividad específica, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	100
J.6. Integral de células viables, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	100
J.7. Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	101
J.8. Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	101
J.9. Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	102
J.10. Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	102
J.11. Producción de tPA y productividad específica, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	103
J.12. Integral de células viables, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB. . . . .	103

# Capítulo 1

## Introducción

A nivel mundial, los bio-productos representan la alternativa o camino a seguir para dar solución a diversas necesidades de la población, como nuevas fuentes de energía que sean limpias y renovables, materiales de construcción biodegradables pero de alta resistencia, alimentos, fármacos (vacunas, hormonas, factores de crecimiento), catalizadores reutilizables, entre muchos otros. En particular, la producción de bio-fármacos es un nicho económico y tecnológico de gran interés, con proyecciones de crecimiento de 7,3% anual hacia el año 2025 [1].

Un bio-producto o producto biológico se obtiene a partir del cultivo de cepas o líneas celulares específicas, que pueden producir el compuesto de forma nativa o por medio de recombinación genética, funcionando como “huésped” o máquina productora exógena [2]. Estos cultivos se realizan en reactores especializados para el tratamiento de células, o “biorreactores”, diseñados tanto el equipo como el funcionamiento del cultivo en forma minuciosa y precisa.

Este diseño, particularmente el del funcionamiento, corresponde a la mayor problemática para la generación de cultivos celulares, puesto que actualmente se realiza en forma empírica [3]. Es decir, toda estrategia de confección, ya sea diseño de vectores, optimización (de condiciones, de medio de cultivo, de estrategias de alimentación), o sistemas de control, requiere experimentación basada en la experiencia. Por tanto, concebir un cultivo celular implica un costo considerable debido al alto número de experimentos necesarios.

Para tratar de dar solución a lo anterior han surgido durante los últimos 10 años distintos modelos matemáticos, que den agilidad al proceso de diseño y permitan ahorrar los recursos asociados a experimentación. Sin embargo, muchos de éstos se basan en composiciones generales de células, sin un estudio acabado de la línea celular a trabajar. O se conciben en base al costo de materias primas del cultivo, desestimando las repercusiones que pueda tener a nivel productivo el no cumplimiento de todos los requerimientos nutricionales de la célula.

De esta forma, es necesario concebir nuevas estrategias de diseño que apunten al cumplimiento de necesidades nutricionales de la célula, a maximizar la cantidad de bio-producto obtenido y a seleccionar las materias primas generando un desarrollo celular óptimo. Estos nuevos métodos pueden ser realizados mediante modelos matemáticos de metabolismo celular y metodologías de ajuste, herramientas que serán utilizadas en el presente trabajo como parte de la confección de una plataforma de diseño de cultivos.

## 1.1. Antecedentes generales

### 1.1.1. Manufactura de bio-productos

Para obtener un producto biológico desde una especie particular es necesario aislar la especie y permitir su crecimiento en condiciones controladas, que induzcan la síntesis del compuesto de interés. Esto es lo que se define como **cultivo celular**: extraer células de un animal o planta (o en otros casos aislar bacterias u hongos) y crecerlas en un ambiente artificial favorable [3].

Pero para llegar a producir controladamente un bio-producto desde un aislamiento celular existe una serie de pasos, no es algo directo. Una vez que se aísla, la célula debe ser cultivada para que logre crecer lejos de su organismo complejo; si lo hace, se obtiene un **cultivo primario**. Luego de ello, se genera un **sub-cultivo** en un nuevo medio fresco, para que el crecimiento no se estanque, lo que permite obtener una **línea celular** o **sub-clón**. Si además de obtener un crecimiento sostenido se realiza un proceso de transformación, mediante el cual se rompe la barrera de crecimiento finito que poseen células animales y vegetales, se obtiene una **línea celular continua**, capaz de multiplicarse infinitas veces en forma estable si las condiciones de cultivo así lo permiten [3].

Una vez que la línea celular se ha estabilizado, es posible utilizarla para sintetizar un metabolito específico. Éstos se obtienen mediante el metabolismo central de las células o vías alternativas, utilizando precursores del metabolismo central para ello [4]. He ahí la necesidad de comprender el comportamiento metabólico de la línea celular a utilizar, lo que se traduce en que comúnmente se emplean modelos metabólicos para ello, pues permiten reconstruir el funcionamiento bioquímico de la célula [5].

Actualmente, la necesidad de bio-productos ha crecido en los últimos años, con un incremento del 100 % en la cantidad de productos aprobados a nivel mundial en el intervalo 2014-2018 [6] y un crecimiento de mercado estimado de 8,1 % entre 2020 y 2025 [7]. Este incremento atañe principalmente a bio-fármacos, por la continua aparición de nuevas enfermedades y ausencia de tratamientos. En ese sentido, el uso de células animales cobra fuerza por sobre células vegetales, bacterias y hongos [8]. Las células eucariontes, particularmente las animales, permiten modificaciones post-traduccionales, lo que implica obtener un producto listo para su uso sin necesidad de operaciones *downstream* asociadas a su activación [9]. Además, generan líneas celulares estables, pues si el metabolito a producir es exógeno, es posible integrar la información al genoma del huésped permitiendo la producción en todo el horizonte de cultivo [9].

## Cultivos celulares a nivel industrial

El cultivo de células se realiza en equipos denominados **biorreactores**, es decir un recipiente en donde una reacción biológica ocurre por acción de células que se encuentran en un ambiente favorable para ello [10]. Para desarrollar cultivos industrialmente existen tres métodos de operación principales [8]:

- **Batch:** En el reactor se incluye todo al inicio, tanto el inóculo de células como el medio nutritivo. El cultivo funciona como un sistema cerrado, sin intercambio de materia con el exterior (al no incorporar nuevo medio de cultivo o extrayendo producto) [11].
- **Fed-batch:** Se alimentan ciertos nutrientes (los críticos, que se agotan primero) en forma continua, sin extracción alguna. Esto evita el agotamiento celular que suele ocurrir en cultivos batch y prolonga la viabilidad del cultivo [8].
- **Perfusión:** Es un sistema continuo, donde se alimenta medio de cultivo fresco y existe una corriente de salida que luego es separada en producto en suspensión y células viables, siendo estas últimas reincorporadas al reactor. Es decir, existe una “retención celular” que prolonga la viabilidad. Además, las corrientes de entrada y salida permiten que el volumen del cultivo sea constante [11].

La Figura 1.1 esquematiza los tres regímenes de operación antes mencionados. Cabe destacar que a nivel industrial éstos se utilizan debido a que un cultivo en suspensión, en comparación a la fijación de células, permite un mayor control de condiciones como temperatura, pH y oxígeno disuelto. Además, la extracción del producto de interés es facilitada por la existencia de un medio líquido.

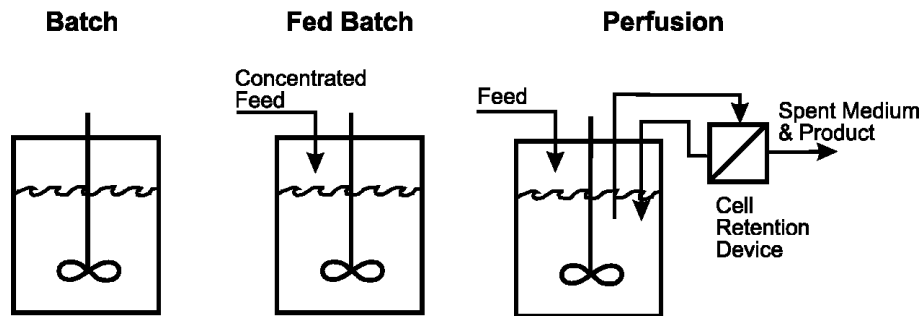


Figura 1.1: Alternativas de biorreactores agitados. Para cultivo de células animales se controla temperatura, pH y demanda biológica de oxígeno (DBO) [12].

### 1.1.2. Diseño de cultivos y análisis de datos biológicos

Si bien podría parecer sencillo el cultivo de células, dado que éstas se incorporan al medio y se espera a que las reacciones ocurran, lo cierto es que es un proceso complejo. Se debe controlar un gran número de parámetros, ya sea intrínsecos de la línea celular (tasa de crecimiento, productividad, regulación transcripcional) o asociados a las condiciones ambientales (temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, agitación, entre otros). Por tanto, implementar un cultivo celular implica diseñarlo detalladamente.

En particular, el diseño de medios de cultivo y de estrategias de alimentación (es decir, a qué flujo debe ingresar y qué composición debe tener el medio fresco), es un paso crucial en la concepción de un cultivo celular [9]. Como se mencionó previamente, hasta hace algunos años la práctica más usada para diseñar era la experimentación, variando concentraciones en forma manual en base a resultados previos y ajustando ensayo tras ensayo. Sin embargo, esta ruta es extensa y costosa, y no responde de buena forma a la necesidad de cultivos eficaces y rápidos. Sin embargo, en los últimos 10 años ha comenzado a utilizarse el diseño *in silico*, es decir simulación de procesos y optimización computacional [9].

Estas nuevas metodologías pueden ser estructuradas o no estructuradas, donde “estructurado” hace referencia a considerar lo que ocurre dentro de la célula, particularmente todas las rutas metabólicas [13] tal como muestra la Figura 1.2. Además, se pueden clasificar como segregados o no segregados si consideran o no la heterogeneidad de la población celular (si están en distintas fases del cultivo).

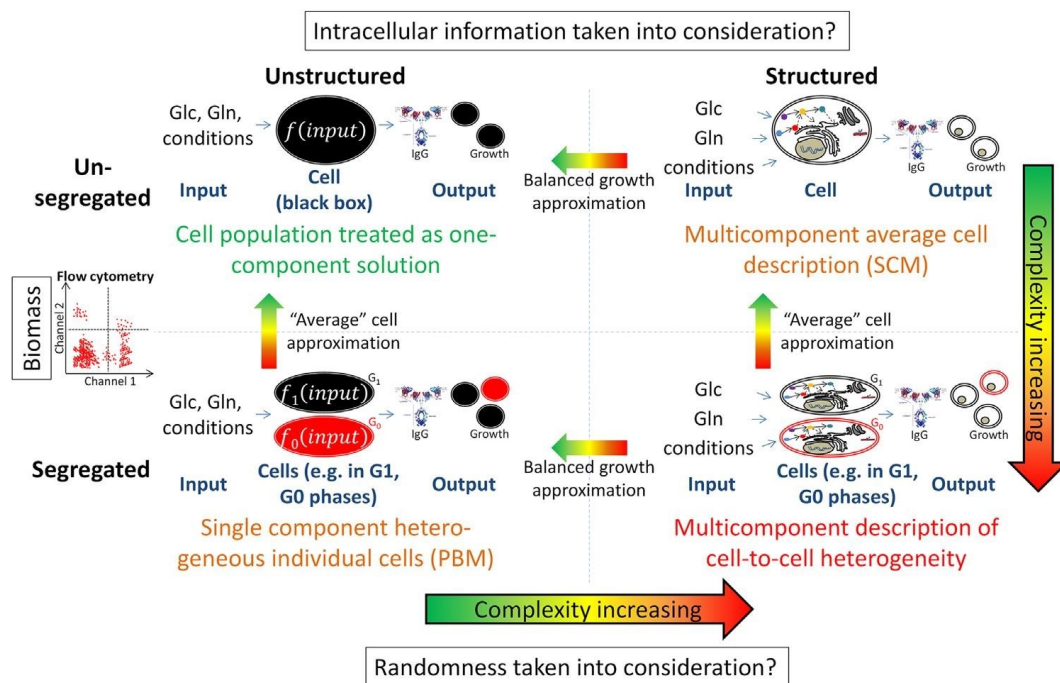


Figura 1.2: Modelos para cultivos de células animales. Se presentan los diferentes caminos para sistemas biológicos dinámicos [13].

Para diseñar la composición del medio, el tiempo de cultivo, la estrategia de alimentación y el nivel de producción es necesario conocer el comportamiento del cultivo. Es decir, si se determina la composición de la línea celular, nivel de productividad, qué nutrientes requiere para sintetizar el producto de interés, para mantenerse y para duplicarse, y cuántas células existen en cada momento del cultivo, se podrá calcular una alimentación que permita obtener una cantidad de producto determinada [9].

El diseño *in silico* de cultivo celulares requiere modelar cada uno de los parámetros antes mencionados como expresiones matemáticas, las que se muestran a continuación:



- **Composición celular y nutrientes:** se utilizan determinaciones experimentales para definir reacciones para cada componente. A partir de ellos, es posible definir balances de masa [13]:

$$\frac{d(C_i \cdot V)}{dt} = F_{IN} \cdot C_{IN} - F_{OUT} \cdot C_i + q_i \cdot X_V \cdot V + K_i \cdot C_i \cdot V \quad (1.1)$$

Donde  $C$  corresponde a la concentración del componente,  $V$  al volumen del cultivo,  $F$  al flujo,  $q$  a la producción o consumo específico,  $X_V$  a la concentración de células viables, y  $K_i$  a la tasa de degradación.

- **Productividad:** el nivel de producción es una medida de la conversión de un elemento del cultivo en otro. Hace referencia a cuánto nutriente (o biomasa) se utiliza para producir el compuesto de interés. Existen diferentes parámetros asociados a productividad:

- **Rendimiento:** es el cociente entre la cantidad de producto obtenido (ya sea un compuesto particular o biomasa) y la cantidad de sustrato utilizado (ya sea un nutriente o la biomasa) [14]:

$$Y_{P/S} = \frac{\delta P}{\delta S} \vee \frac{dP}{dS} \approx \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (1.2)$$

$$Y_{X_V/S} = \frac{\delta X_V}{\delta S} \vee \frac{dX_V}{dS} \approx \frac{\Delta X_V}{\Delta S} \quad (1.3)$$

$$Y_{P/X_V} = \frac{\delta P}{\delta X_V} \vee \frac{dP}{dX_V} \approx \frac{\Delta P}{\Delta X_V} \quad (1.4)$$

Donde  $Y_{P/S}$  es el rendimiento de sustrato a producto,  $Y_{X_V/S}$  el de sustrato a biomasa viable, y  $Y_{P/X_V}$  el de biomasa viable a producto. En los tres casos, se aproxima la derivada al cociente de las diferencias.

- **Tasa específica:** corresponde a la cantidad de metabolito consumida o producida por unidad de tiempo, normalizada por la cantidad de células viables. Así, representa la producción o consumo que posee cada célula en una unidad de tiempo. En el caso de la producción de células mismas, el parámetro se denomina “tasa específica de crecimiento” ( $\mu$ ) [15].

$$q_S = -\frac{1}{X_V} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (1.5)$$

$$q_P = \frac{1}{X_V} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (1.6)$$

$$\mu = \frac{1}{X_V} \cdot \frac{dX_V}{dt} \quad (1.7)$$

- **Células existentes:** comúnmente se utiliza la “integral de la concentración de células viables” (IVCC), definida como la cantidad de células viables en un tiempo determinado [14]:

$$IVCC = \int_0^t X_V dt \quad (1.8)$$

Con ella, se puede obtener el consumo o producción de un cierto componente, conociendo su consumo o productividad específica. Con esto, es posible determinar cuánto nutriente se consume o cuánto producto se genera en un cierto período del cultivo.

A partir de parámetros como los antes descritos, es posible desarrollar modelos que diseñen el medio de cultivo específico a utilizar y cómo éste debe ser administrado. Sin embargo, deben acoplarse a un modelo matemático metabólico o cinético de la línea celular a emplear.

### 1.1.3. Proyecto Fondef ID18I10308

Como respuesta a las dificultades descritas para diseñar medios y estrategias de cultivo, el Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB) de la Universidad de Chile, en asociación con el Instituto Milenio de Dinámica Celular y Biotecnología (ICDB) de la misma casa universitaria y Veterquímica S.A., han desarrollado un proyecto financiado estatalmente por FONDEF, consistente en una plataforma de diseños de cultivo [16]. Éste busca la creación de un entorno computacional que entregue la estrategia de alimentación óptima para un cultivo celular específico, sin necesidad de un gran número de experimentos para determinar la cantidad de nutrientes requerida a fin de obtener la máxima productividad.

El proyecto plantea la posibilidad de desarrollar un modelo matemático que simule el comportamiento del cultivo en el tiempo, prediciendo la síntesis de un metabolito específico y la concentración de nutrientes límites, lo que permite optimizar la composición del medio de cultivo y la estrategia de alimentación [16]. Para ello, se utilizó como base el modelo creado por Ana Quiroga-Campano (participante del actual proyecto), el cual predice la producción de ATP en células GS-NS0 y separa el consumo de nutrientes en: proliferación celular, síntesis de proteína recombinante y metabolismo energético. Esto permite re-diseñar el cultivo y obtener productividades y longevidades del cultivo más altas, aumentando en su caso un 125 % y 50 % respectivamente tal como muestra la Figura 1.3 [17].

Utilizando este modelo dinámico, se planteó entregar un servicio de diseño a través de una plataforma. Este servicio consta de dos hitos principales: determinación de requerimientos nutricionales y composiciones celulares de diversos organismos utilizados en la síntesis de bio-productos, y diseño del medio de cultivo por etapas (3: batch, fed-batch no optimizado, fed-batch optimizado). Con la determinación de las características de la línea celular a trabajar, el usuario entrega estos datos en la plataforma y por medio del modelo matemático se determina la composición del medio de cultivo y la estrategia de alimentación para cada etapa. Estas tres etapas son necesarias debido a que los cultivos poseen un comportamiento diferente en una configuración batch o fed-batch [18].

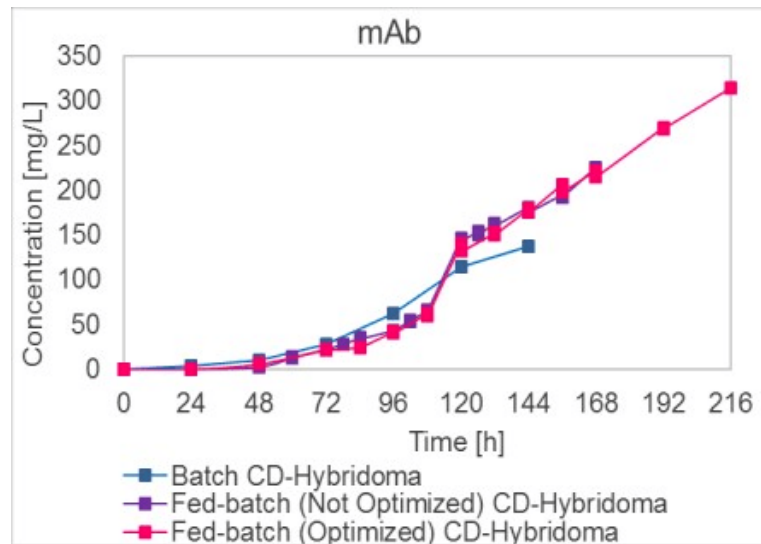


Figura 1.3: Comparación de la producción de anticuerpo alcanzada entre el cultivo original y el optimizado [17].

El servicio se resume en la Figura 1.4. Mediante la entrega de datos de composición por parte del usuario, en la plataforma se selecciona la línea celular a utilizar y se genera un diseño del bio-proceso de cultivo, que entregue la composición del medio a emplear y cómo cada requerimiento nutricional se debe cumplir para la generación del producto.

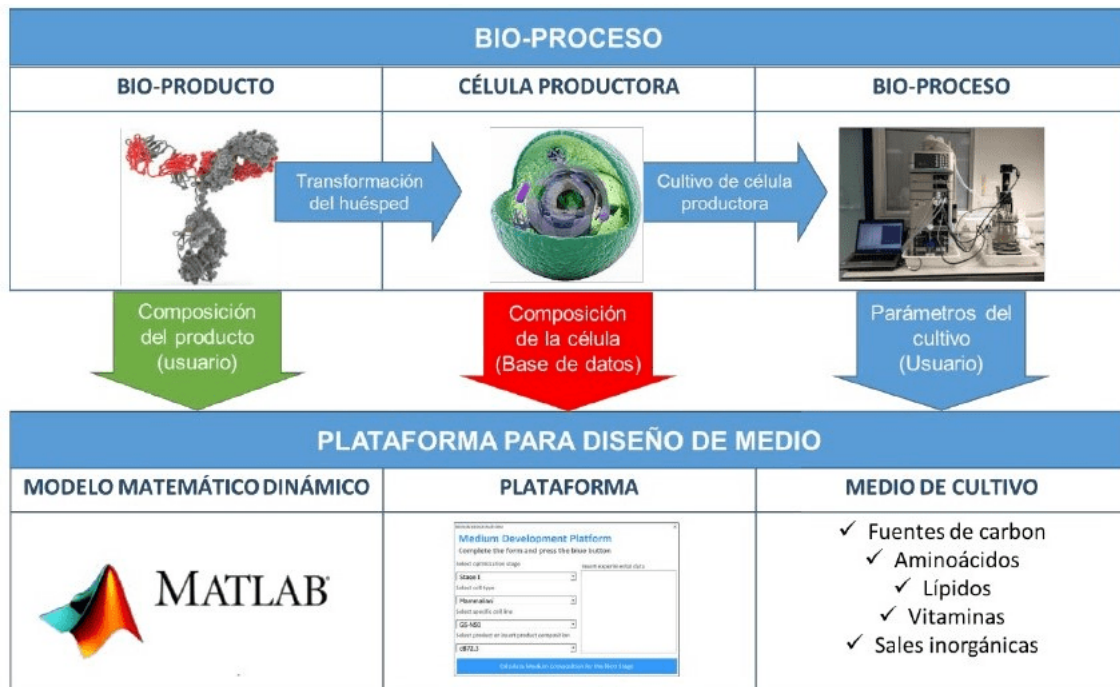


Figura 1.4: Diagrama de la operación del servicio [16].

La Figura 1.5, por su parte, explica paso a paso las etapas requeridas para el diseño óptimo del medio de cultivo y la estrategia de alimentación. Como fue mencionado, existen tres etapas o fases del desarrollo. En la primera, se genera un cultivo batch para obtener datos de consumo y producción que permitan diseñar el cultivo fed-batch. En la segunda etapa se emplean estos datos para ajustar el modelo dinámico y así entregar una estrategia de cultivo. En la última, se utilizan los datos de la etapa anterior para refinar la estrategia fed-batch y obtener el diseño final a reproducir por el cliente en su proceso.

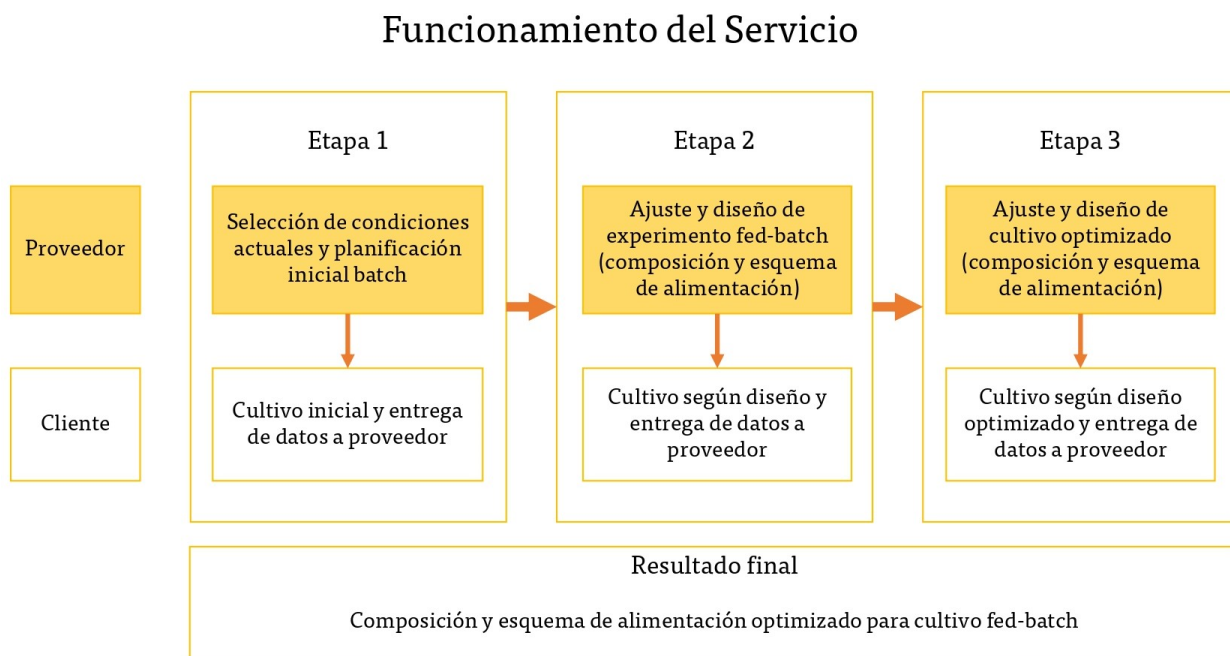


Figura 1.5: Metodología del servicio para el diseño de medios de cultivo y estrategias de alimentación para cultivos fed-batch.

El proyecto comenzó el año 2018, y actualmente posee definidos los protocolos para determinar composición celular y requerimientos nutricionales. Además, la plataforma computacional y la base de datos de cinco líneas celulares (PK15, HEK293, CHO-tPA, *P. pastoris* y *E. coli*) se encuentran en desarrollo [19]. El avance de mayor significancia corresponde a la determinación de una estrategia de alimentación, la cual se encuentra en fase preliminar.

Para determinar la composición de la alimentación y cómo debe ser administrada, el modelo metabólico considera dos nutrientes críticos: la fuente de carbono (glucosa) y la de nitrógeno (como glutamato o aspartato). A partir de ello, se incluyen dos *shifts* metabólicos, correspondientes al agotamiento de cada uno de los aminoácidos antes mencionados. De esta forma, el modelo entrega para cada etapa del servicio (ajuste fed-batch, optimización fed-batch) dos curvas de alimentación: una para aminoácidos (glutamato o glutamina, principalmente) y otra para glucosa, tal como se muestra en la Figura 1.6. Adicionalmente, se presenta el perfil de los sustratos en el tiempo.

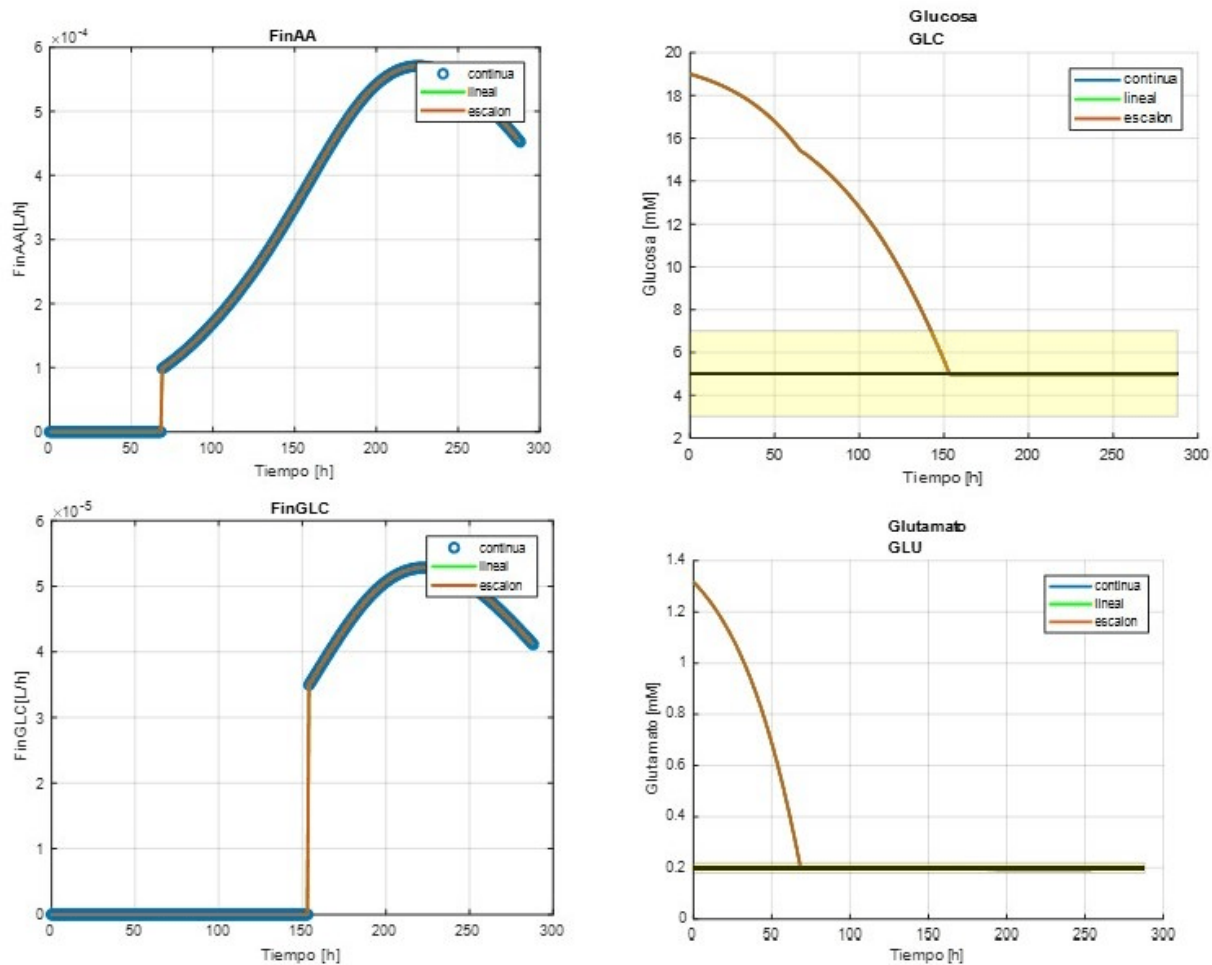


Figura 1.6: Curvas de alimentación para aminoácidos y glucosa (costado izquierdo), junto con el perfil de los nutrientes en el tiempo y cómo se comportan respecto al *setpoint* definido (costado derecho) [19].

Analizando detenidamente los gráficos se logra dilucidar la importancia del carácter preliminar del funcionamiento del modelo. En primer lugar, la alimentación sólo se define en base a dos nutrientes, siendo que por ejemplo se alimentan los 20 aminoácidos existentes y se ha reportado que, al menos para la línea celular CHO-tPA, existen alrededor de cinco aminoácidos que pueden ser un nutriente crítico [20]. En la plataforma, la cantidad suministrada de cada aminoácido no crítico no es estimada, sino que se asume como parte del medio de cultivo comercial utilizado, y no se cuantifica cuánto se consume efectivamente en cada configuración de cultivo.

En segundo lugar, se define un *setpoint* o valor óptimo en forma “arbitraria” a partir del requerimiento nutricional estimado, y una vez que la concentración en el cultivo llega a este valor se mantiene constante hasta el final del tiempo de realización del cultivo. Esto implica que la alimentación no es ajustada si existe alguna variación en el metabolismo del cultivo que implique la necesidad de una nutrición diferente. Por tanto, para entregar un servicio que prediga completamente lo que ocurre en la producción de bio-productos a partir de diferentes líneas celulares, se hace necesario resolver estas dificultades.

### 1.1.4. Motivación e impacto del trabajo

La importancia del presente trabajo recae en complementar la plataforma de diseño desarrollada en el proyecto Fondef ID18I10308, refinando las estrategias de alimentación entregadas por la plataforma en base a los requerimientos nutricionales específicos de la línea celular en estudio. Se busca proporcionar una metodología de ajuste de composición y una metodología de predicción de la misma para definir la alimentación del cultivo, lo que permitiría entregar un servicio de diseño íntegro. Así, se obtendrá un método de vanguardia y rápido para la concepción de cultivos celulares, que reemplace los métodos empíricos convencionales y genere cultivos con altas productividades.

El presente trabajo no ha sido desarrollado en Chile en conjunto con una plataforma de diseño, por lo que puede ser considerado como punto de partida para la elaboración de modelos adaptables que diseñen cultivos celulares de diferentes especies.

## 1.2. Estado del Arte

Existen diversos estudios que sustentan la propuesta del presente trabajo de título, pudiendo diferenciarlos en dos áreas. La primera corresponde a metodologías de ajuste y diseño de cultivos, específicamente estimación de consumos y requerimientos nutricionales, y modelación de biorreactores. La segunda, por su parte, está asociada a *Machine Learning* en métodos de diseño, generando modelos predictivos para producción de metabolitos o consumo de nutrientes. A continuación se presentan algunos ejemplos de cada área.

### 1.2.1. Metodologías de ajuste y diseño de cultivos

- **Investigación 1: Aplicación de análisis estequiométricos y cinéticos para caracterizar crecimiento celular y formación de productos, 2007 [21]:** Este trabajo, desarrollado por Biogen, Alexion Pharmaceuticals y la Universidad de Minnesota, es una recopilación de diferentes metodologías de análisis de cultivos celulares. Presenta métodos de descripción cuantitativa tanto de producción de metabolitos como de crecimiento celular; parámetros cinéticos asociados al crecimiento, consumo de nutrientes y formación de producto; estimación de parámetros a partir de datos experimentales; y modificaciones de cálculo dependiendo del tipo de reactor (batch, fed-batch). Si bien no presenta resultados, es útil la explicación de diferentes formas de cálculo para cultivos celulares, pues son métodos transversales a cualquier línea celular animal.
- **Investigación 2: Entorno para el diseño sistemático de estrategias de alimentación fed-batch en cultivos de células animales, 2014 [22]:** Esta investigación, realizada en el Centro de Ingeniería de Sistemas de Proceso del Imperial College London, presenta un método de cálculo para estimar la concentración de nutrientes necesaria en la alimentación de cultivos fed-batch, para la producción de anticuerpos en células CHO. Mediante el uso de parámetros cinéticos como la integral de concentración de células viables y las tasas específicas de consumo, la estrategia permite predecir la concentración de nutrientes exacta que requiere el cultivo en base al primer reactivo que se vuelve limitante, para un tiempo de cosecha (o de término

de viabilidad) determinado, dado por el mismo cálculo. A partir de esta predicción fue posible diseñar dos medios de alimentación, y compararlos experimentalmente con medios comerciales y la misma predicción inicial. Los resultados mostraron que las alimentaciones creadas aumentaron en 3,5 veces el rendimiento de producción y 2,5 veces la productividad específica, comparado con experimentos batch.

- **Investigación 3: Ingeniería metabólica con optimización multi-objetivo de modelos cinéticos, 2016 [23]:** Este trabajo corresponde a la creación de un modelo dinámico de optimización para maximizar la producción de anticuerpos en células CHO. En este modelo, que considera dos funciones objetivo (productividad específica y modificaciones enzimáticas), se busca que la línea celular sintetice la mayor cantidad de producto evitando la modificación de síntesis enzimática; para la definición de productividad se emplean parámetros cinéticos como productividad específica y crecimiento específico. La implementación del modelo permitió un espacio de solución que, a pesar de no predecir una mejor producción de anticuerpos, disminuyó considerablemente la síntesis de compuestos de desecho como amonio y lactato.

### 1.2.2. *Machine Learning* en métodos de diseño

- **Método de *machine learning* poli-ómico para predecir la producción de metabolitos en células CHO, 2017 [24]:** Esta investigación, presentada en la Segunda Conferencia Internacional Electrónica de Metabolómica, propone un modelo poli-ómico (modelo multi-base) que combina expresión génica y análisis de balance de flujos (FBA) para predecir la producción de lactato en diferentes condiciones de cultivo. El modelo consta de dos etapas: la primera es una red elástica que determina una configuración de condiciones óptimas de cultivo a partir del nivel de expresión génica y tasas de flujo metabólico; y la segunda es la predicción de producción a partir de los parámetros óptimos antes mencionados, y la expresión génica. Los resultados mostraron que la predicción que más se acerca a los resultados experimentales es la conjunción de ambos métodos, con un error cuadrático medio (MRSE) de 0,14, mientras que para cada ámbito en solitario el valor fue 0,19 para expresión génica y 1,08 para flujos.
- **Investigación 2: Modelo de red metabólica a escala genómica y *machine learning* para predicción de concentraciones de aminoácidos en cultivos de células de Ovario de Hámster Chino, 2020 [25]:** Este trabajo, realizado en una alianza de Pfizer con la Universidad de California, pretende resolver las dificultades que presentan los modelos metabólicos a escala genómica para monitorear la disponibilidad de nutrientes en cultivos celulares, al incluir aprendizaje automático al modelo. Mediante la inclusión de métodos estadísticos en un modelo metabólico de células CHO, específicamente modelos de regresión que utilizan parámetros globales del cultivo (tasa de consumo mínima, velocidad de consumo media), se logró predecir los consumos aminoacídicos en función del tiempo, lo que permitiría controlar la alimentación de nutrientes en el transcurso del cultivo.

### 1.2.3. Análisis comparativo

Constrastando los trabajos anteriormente descritos, tanto los problemas en los que se enfocan como las soluciones propuestas, es posible inferir lo siguiente:

- Dos de las tres investigaciones sobre metodologías de ajuste corresponden a usos o descripción de parámetros estequiométricos y cinéticos para ajustar la alimentación de cultivos, mientras que la otra se enfoca más en optimización y regulación transcripcional. No obstante, en las tres se utilizan parámetros estequiométricos para el desarrollo de un modelo matemático de cultivos.
- En los dos trabajos sobre aplicación de parámetros cinéticos (investigaciones 2 y 3 de la sección 1.2.1) se busca un objetivo similar: aumentar la productividad del cultivo, ya sea optimizando expresión génica o ajustando la alimentación. En ese sentido, el presente trabajo está inmerso en la conjunción de ambos trabajos: un modelo matemático que optimiza la productividad de las líneas celulares considerando un modelo dinámico, y el ajuste estequiométrico de las concentraciones de nutrientes para incluirlo en el modelo.
- Los dos trabajos sobre aprendizaje automático, a pesar de utilizar métodos distintos y con un objetivo diferente, predicen el comportamiento de cultivos de células CHO, basándose en las fluctuaciones de los flujos metabólicos. Además, ambos se basan en alguna parte de su metodología en modelos metabólicos a escala genómica de cepas de células CHO.

La presente memoria, en comparación a las investigaciones mencionadas, presenta ventajas y desventajas, las cuales se presentan en la Tabla 1.1. De acuerdo con ellas, la inclusión de un método de ajuste de composición de medio de cultivo a la plataforma del proyecto permite acoplar los consumos y producciones celulares con sus requerimientos nutricionales. Además, automatiza el cálculo de concentraciones de un medio a alimentar al incluir el ajuste dentro de un modelo matemático, y se enfoca únicamente en su composición sin considerar otros aspectos de un modelo metabólico (regulación enzimática, expresión génica).



Tabla 1.1: Tabla comparativa del trabajo presentado en contraste con las investigaciones estudiadas.

Investigación	Ventaja	Desventaja
Ajuste, investigación 1	El trabajo corresponde a la aplicación de los parámetros presentados, y no sólo a descripción teórica. Se emplean además estrategias que acoplan diferentes metodologías allí presentadas.	No hay una desventaja apreciable dado que la investigación corresponde a una recopilación de metodologías, y no a una aplicación de éstas.
Ajuste, investigación 2	El modelo de la plataforma considera más de un nutriente como límite, además de incorporar el ajuste al modelo matemático y no sólo realizar un cálculo manual. Junto con ello, la posible inclusión de aprendizaje automático permite ajustar la alimentación en el tiempo.	El diseño del cultivo se realiza para una frontera de tiempo muy grande, y no considera como límite para ésta una viabilidad alta de células (sobre el 80 %). Además, el acoplar el ajuste a una plataforma de diseño implica un tiempo de realización considerablemente mayor.
Ajuste, investigación 3	El enfoque corresponde a ajustar la concentración en la alimentación como parte de una plataforma de diseño, y no a un problema multi-objetivo para una cepa específica. Eso incluye no considerar regulaciones transcripcionales en el problema.	A pesar de disminuir la dificultad al no incluir la modificación enzimática, eso implica un sesgo si no se incorpora un problema de optimización con una función objetivo asociada a regulación génica.
<i>Machine Learning</i> , investigación 1	Se considera la predicción como función del tiempo, y se considera como objetivo la composición de la alimentación.	Por escasez de tiempo de realización y dada la naturaleza del modelo de la plataforma, no se incluirá la expresión génica, sólo la concentración de nutrientes.
<i>Machine Learning</i> , investigación 2	Se acopla el ajuste estequiométrico con los métodos de predicción.	El modelo propuesto no incluye la optimización de productividad de más de un compuesto, en particular la síntesis de compuestos de desecho. Tampoco será posible incluir realmente aprendizaje automático.

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo general

Implementar una metodología para el ajuste de composición del medio de cultivo entrante en la estrategia de alimentación entregada por la plataforma de diseño de medios de cultivo, para la producción de tPA en células CHO.

### 1.3.2. Objetivos específicos

1. Ajustar estequiométricamente el medio a alimentar, previo análisis de tasas de consumo aminoacídicas de células CHO.
2. Implementar el ajuste en el modelo matemático para comprobar el aumento de producción como respuesta a éste.
3. Optimizar el ajuste y la simulación en función de los resultados obtenidos para obtener una estrategia de alimentación definitiva.
4. Desarrollar estrategias predictivas, vía *Machine Learning*, para la modificación de la alimentación en el tiempo, basándose en la determinación de fluctuaciones en el comportamiento del cultivo que impliquen la necesidad de cambios en la composición.

## 1.4. Alcances y limitaciones

La presente memoria se remitirá a los siguientes puntos para su realización:

- Se trabajará sólo con una de las líneas celulares modeladas por la plataforma: CHO-tPA. No obstante, ambas metodologías a desarrollar (ajuste estequiométrico y modificación de composición en el tiempo) podrían ser extrapoladas a todo el modelo matemático.
- Por dificultades para asistir a laboratorio en el contexto actual de pandemia, la comprobación empírica de las metodologías será realizada por terceros, y los resultados de ello no serán considerados como parte de esta memoria.
- El método de reajuste en el tiempo a desarrollar dependerá del tiempo disponible y de la capacidad que tiene el modelo actual para acoplar estas técnicas.
- Se implementará un único método de ajuste, debido principalmente al respaldo bibliográfico de éste y al tiempo disponible para la ejecución del trabajo.
- El trabajo en la plataforma será una modalidad dual. Por un lado, como usuario al analizar los resultados de las simulaciones y utilizarlas para cultivos experimentales (comprobación empírica). Y por otro, como operador al modificar el modelo matemático, incluyendo el ajuste de composición y ajustando la simulación para una estrategia factible.

# Capítulo 2

## Plan de trabajo y metodología

### 2.1. Metodología general

La metodología general seguida en el presente trabajo se describe a continuación:

1. Compresión de la metodología del ajuste de composición, y prueba de él en *Excel* <sup>®</sup> para cada tipo de reactor utilizado en el proyecto (batch y fed-batch), realizando el cálculo de los consumos específicos de cada compuesto para la determinación de coeficientes de razón estequiométrica.
2. Implementación de la metodología de ajuste en el modelo matemático en *Matlab* <sup>®</sup>. Se modeló como una función utilizable por la simulación para determinar los coeficientes de correlación y emplearlos para calcular la composición de la alimentación a partir del aminoácido limitante.
3. Simulación, análisis y optimización del modelo. La realización de las simulaciones para cada etapa del servicio (fed-batch no optimizado y optimizado), permitieron analizar los resultados para ajustar la simulación a una estrategia factible.
4. Determinación de fluctuaciones del cultivo en el tiempo, analizando los datos experimentales en los que se basa el modelo y las simulaciones ya realizadas.
5. Modificación del modelo matemático para recalcular la composición del medio de cultivo a alimentar en instantes de tiempo arbitrarios e instantes “estratégicos”, de acuerdo con las fluctuaciones encontradas anteriormente.
6. Simulación y análisis. Al igual que en la etapa anterior, la realización de las simulaciones para cada etapa del servicio permitió analizar los resultados para ajustar la simulación a una estrategia factible. Luego de ello, se analizó la productividad de cada simulación y se concluyó respecto al trabajo realizado.
7. Escritura del trabajo de título y corrección.

Se siguió además una metodología específica para cada etapa del trabajo, que será presentada en los siguientes capítulos para facilitar su comprensión. Adicionalmente, cada capítulo cuenta con un apartado de discusión parcial, donde se resume el contenido y se analizan los resultados de cada sección.

# Capítulo 3

## Métodos de ajuste y de predicción

En muchos cultivos celulares, tanto líquidos como sólidos, se utilizan medios comercializados con composiciones establecidas. Por ejemplo, el medio Luria Bertani (o caldo LB), utilizado para el crecimiento de microorganismos bacterianos, contiene una cantidad fija de triptona o peptona, extracto de levadura y cloruro de sodio [26]. El agar sangre, medio empleado en la diferenciación de patógenos hemolíticos, es una mezcla proporcionada de extracto de carne, peptona, cloruro de sodio y sangre (bovina o humana) desfibrinada estéril [27].

En el caso de células animales, es común utilizar medios basales útiles para diferentes líneas celulares y, según el requerimiento de cada cepa a cultivar, se modifica la composición de algunos de los componentes del medio. Específicamente para células CHO, los medios históricos utilizados son MEM (*Minimum Essential Media*), F12, y eRDF, todos medios basales con composiciones definidas [28]. Sin embargo, como fue mencionado anteriormente es posible optimizar la composición del medio de cultivo a utilizar de acuerdo con las necesidades de la cepa.

Para ello, es necesario identificar los nutrientes críticos, la cantidad efectiva consumida de cada nutriente y la citotoxicidad de los compuestos presentes en el cultivo (sintetizados o alimentados) [28]. Posteriormente, en los cultivos modelados por la plataforma se puede determinar cuánto alimentar de cada nutriente y cómo alimentarlo. Pero, antes de desarrollar en el modelo matemático una estrategia de cálculo de composición, se debe definir qué método de ajuste implementar y testear su funcionamiento previamente. Adicionalmente, la investigación debe extenderse a determinar si es posible obtener una metodología para detectar alguna modificación en el comportamiento del cultivo (*shifts* metabólicos, no uso de nutrientes, etc.) durante el transcurso del mismo, y si ésta es reproducible en el software utilizado en el proyecto.

## 3.1. Metodología específica

Los pasos seguidos para la determinación y testeo de los métodos a implementar se presentan a continuación:

- Selección del método de ajuste y análisis detallado de su funcionamiento.
- Reproducción del método en Microsoft Excel <sup>®</sup> y prueba con datos experimentales del proyecto.
- Investigación bibliográfica sobre métodos de predicción de consumos nutritivos en el tiempo, de detección de cambios significativos en el cultivo y de cálculo dinámico de composición de medios.

## 3.2. Ajuste estequiométrico de composición de medio

El método de ajuste seleccionado se basa en el uso de coeficientes de relación estequiométrica o *ratios* estequiométricos, metodología descrita por David Umulis y el grupo de trabajo del profesor Wei-Shou Hu de la Universidad de Minnesota [29]. Estos coeficientes, definidos como la proporción entre la tasa de consumo o producción de un nutriente y la tasa de un nutriente de referencia escogido [29], permiten calcular la concentración de cada nutriente en un medio de cultivo a alimentar, especialmente en reactores fed-batch y continuos.

Con el coeficiente de relación estequiométrica es posible diseñar la composición de la alimentación cuando uno de los nutrientes es considerado “crítico”, o dicho de otro modo es el que posee la mayor tasa de consumo, mientras que los otros no son consumidos en el mismo orden de magnitud. Así, de acuerdo a esta relación de consumo efectivo, la concentración de cada nutriente en la alimentación será proporcional al nutriente crítico.

### 3.2.1. Descripción del método

En la metodología de Umulis y Hu se determinan los *ratios* estequiométricos mediante el procesamiento de datos experimentales de las concentraciones de cada compuesto en el cultivo (incluyendo la cantidad de células). Esto permite, además, analizar el comportamiento del cultivo durante su realización y una vez que haya terminado (análisis *In Process* y *Post Process*). El método original, en efecto, propone la utilización de los *ratios* para comparar la alimentación utilizada con el consumo efectivo de cada nutriente.

La metodología se resume a los siguientes pasos:

1. Cálculo de consumos o producciones acumuladas de los compuestos medidos.
2. Cálculo de tasas específicas de consumo o producción entre mediciones consecutivas.
3. Regresión polinomial (“no lineal”) para recalcular la tasa específica, ahora corregida.
4. Cálculo de *ratios* estequiométricos con tasas específicas corregidas.

## 1. Cálculo de consumos o producciones acumuladas

El primer paso corresponde a estimar cuánto se consume o produce acumulativamente de cada compuesto a lo largo del cultivo. El cálculo acumulativo permite obtener un valor real del consumo o producción, puesto que la medición de concentración en el tiempo desestima el aumento o disminución por efecto de flujos entrantes o salientes. En forma similar, es necesario determinar el crecimiento/decrecimiento acumulado de células viables en el tiempo, a fin de poder calcular las tasas específicas.

El consumo acumulado de un metabolito hasta el instante de tiempo  $t$ , para un reactor fed-batch, está dado por la ecuación 3.1.

$$\bar{S}_t = \int_0^t q_{S,t} \cdot X_V \cdot V \cdot dt \approx V_{t_0} \cdot S_{t_0} - V_t \cdot S_t + \sum_0^k V_{F,k} \cdot S_{F,k} \quad (3.1)$$

En la ecuación 3.1,  $\bar{S}$  es la cantidad consumida (en moles) acumulada,  $q_S$  es la tasa específica de consumo (explicada más adelante),  $V$  es el volumen total del cultivo,  $S$  es la concentración medida,  $V_F$  es el volumen alimentado,  $S_F$  es la concentración del compuesto en la alimentación y  $k$  es la cantidad de veces en que se alimentó hasta el tiempo  $t$ . De esta forma, el consumo o producción acumulada hasta el instante  $t$  queda definida por la concentración inicial, la concentración final y eliminando el efecto de la alimentación. Cuando el valor de la cantidad acumulada es negativo, implica producción del metabolito. En el caso de un reactor batch, el término asociado a la alimentación no se considera.

Para compuestos cuyo comportamiento productivo es conocido, como el número de células viables, lactato o el bio-producto, la diferencia de concentración en la ecuación 3.1 se calcula en forma inversa y el término de la alimentación se desestima. Es decir, en el caso de estos compuestos, la producción acumulada está dada por la ecuación 3.2.

$$\bar{P}_t = \int_0^t q_{P,t} \cdot X_V \cdot V \cdot dt \approx V_t \cdot P_t - V_{t_0} \cdot P_{t_0} \quad (3.2)$$

## 2. Cálculo de tasas específicas de consumo

Paralelamente a estimar los consumos acumulados, existe un segundo parámetro que permite analizar *In Process* el cultivo, y a la vez realizar una aproximación de los *ratios* estequiométricos: la tasa específica de consumo (o producción) de un metabolito. Como fue definido en la ecuación 1.5, corresponde al consumo o producción promedio por célula viable en el tiempo. En el caso del consumo acumulado, la expresión queda:

$$q_S = -\frac{1}{X_V} \cdot \frac{d\bar{S}}{dt} \quad (3.3)$$

Es decir, la tasa específica de consumo corresponde a la tasa volumétrica del nutriente  $S$  ( $\frac{dS}{dt}$ ) normalizada por la concentración celular. Aquí, se asume que las únicas células metabólicamente activas son las células viables ( $X_V$ ) [14]. En forma similar al consumo acumulado, un valor negativo de la tasa corresponde a producción del metabolito, y para reactores batch el término de la alimentación se desestima. Por su parte, para producciones conocidas la ecuación se modifica calculando la diferencia de concentraciones en forma inversa y no considerando la alimentación, resultando lo siguiente:

$$q_P = \frac{1}{X_V} \cdot \frac{d\bar{P}}{dt} \quad (3.4)$$

Y en el caso del crecimiento del cultivo (reproducción celular), se utiliza la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ), definida antes por la ecuación 1.7.

### 3. Regresión no lineal

Con el cultivo terminado, todos los datos de concentraciones disponibles y los consumos (o producciones) acumuladas calculadas, es posible realizar una regresión “no lineal” para ajustar un polinomio a estos datos. Esta regresión permite generar una curva suavizada que intenta eliminar el error asociado a la medición, particularmente referido a errores por intervalos de tiempo extensos entre cada medición [29].

El polinomio es suficiente que sea de grado 3 o 4 para ajustar correctamente a los consumos acumulados con respecto al tiempo de medición [29]. La idea de la regresión, entonces, es obtener una función como la que describe la ecuación 3.5.

$$S_{fit}^-(t) = a_1 \cdot t^3 + a_2 \cdot t^2 + a_3 \cdot t + a_4 \quad (3.5)$$

Con la regresión realizada, la tasa específica de consumo del metabolito se determina como la primera derivada de esta función, normalizada por la cantidad de células viables. Es decir:

$$q_{S,fit} = \frac{1}{(X_{V,fit} \cdot V)} \cdot \frac{dS_{fit}^-}{dt} \quad (3.6)$$

En la ecuación 3.6, la concentración de células viables  $X_{V,fit}$  se estima mediante una regresión no lineal igual a la descrita anteriormente, y se multiplica por el volumen del cultivo.

### 4. Cálculo de razones estequiométricas

Finalmente, los coeficientes de relación estequiométrica se calculan como la pendiente entre la tasa específica de consumo del nutriente y la tasa específica de consumo del nutriente de

referencia. En forma similar, la pendiente puede ser estimada con las diferencias de consumos acumulados si es que no es posible determinar las tasas, pero ello implica asumir los errores que arrastran las mediciones. Esta pendiente se traduce como el cociente entre las tasas específicas, tal como se muestra en la ecuación 3.7.

$$\alpha_j = \frac{q\bar{S}_{,j}}{q\bar{S}_{,r}} = \frac{\Delta S_j}{\Delta S_r} \quad (3.7)$$

Donde  $\alpha_j$  es el *ratio* estequiométrico del nutriente  $j$  con respecto al nutriente de referencia  $r$ . El cálculo de la pendiente no considera todo el intervalo de medición, sino que sólo se estima en el rango donde la relación entre las tasas específicas es lineal. De acuerdo con Hu, este comportamiento se cumple habitualmente en la fase exponencial de crecimiento del cultivo [14]; no obstante, como se verá más adelante para cada caso es posible obtener más de una región con comportamiento lineal, lo que permite calcular *ratios* estequiométricos para diferentes fases del cultivo.

### 3.2.2. Análisis de funcionamiento

Incorporar esta metodología al modelo matemático de la plataforma sólo puede llevarse a cabo si se comprueba su aplicabilidad. Umulis y Hu demostraron el funcionamiento de su método en Microsoft Excel, discretizando cada una de las ecuaciones descritas y utilizando el método de mínimos cuadrados ordinarios para la regresión polinomial [29], de manera que fuera reproducible en el software.

#### Discretización de las ecuaciones a utilizar

Considerando que todos los parámetros antes descritos se calculan a partir de datos experimentales, cada uno de ellos es posible aproximarlos mediante diferencias finitas con los datos consecutivos. Las ecuaciones anteriores consideran el intervalo entre el punto inicial y el punto de medición ( $t$ ), pero en la práctica ese intervalo no es continuo, sino que está segmentado por las mediciones realizadas. Con la finalidad de conocer el comportamiento de cada uno de los parámetros en el cultivo y tener los datos necesarios para la regresión mediante mínimo cuadrados, los cálculos discretos se realizan con dos datos consecutivos.

En primer lugar, en los consumos y producciones acumuladas descritos en las ecuaciones 3.1 y 3.2 la aproximación queda definida por la cantidad acumulada hasta el instante anterior, la nueva cantidad consumida/producida (diferencia entre la medición anterior y la actual) y eliminando el efecto de la alimentación en la concentración medida para el caso de los consumos. Es decir, se obtienen las siguientes expresiones para la acumulación en el instante  $i$ .

$$\bar{S}_i \approx \bar{S}_{i-1} + S_{i-1} \cdot V_{i-1} - S_i \cdot V_i + F_i \cdot S_{F,i} \quad (3.8)$$

$$\bar{P}_i \approx \bar{P}_{i-1} + P_i \cdot V_i - P_{i-1} \cdot V_{i-1} \quad (3.9)$$



De igual forma que antes, para la ecuación 3.8 cuando el valor de la cantidad acumulada es negativo, implica producción del metabolito. Y en el caso de un reactor batch, el término asociado a la alimentación no se considera.

En el caso de la tasa específica de consumo (o de producción) para el análisis durante el proceso, la discretización hace referencia a diferencias para aproximar la derivada. De esta forma, se obtienen las expresiones mostradas en las ecuaciones 3.10 y 3.11 para el instante  $i$ .

$$q_{S,i} = -\frac{1}{X_V} \cdot \frac{d\bar{S}}{dt} \approx \frac{1}{\frac{X_{V,i} \cdot V_i + X_{V,i-1} \cdot V_{i-1}}{2}} \cdot \frac{S_{i-1} \cdot V_{i-1} - S_i \cdot V_i + F_i \cdot S_{F,i}}{t_i - t_{i-1}} \quad (3.10)$$

$$q_{P,i} = \frac{1}{X_V} \cdot \frac{d\bar{P}}{dt} \approx \frac{1}{\frac{X_{V,i} \cdot V_i + X_{V,i-1} \cdot V_{i-1}}{2}} \cdot \frac{P_i \cdot V_i - P_{i-1} \cdot V_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} \quad (3.11)$$

Donde además de la discretización, la cantidad de células viables se considera como el promedio de las dos concentraciones medidas. La tasa específica de crecimiento, por su parte, se aproxima de la misma forma, resultando la expresión de la ecuación 3.12.

$$\mu = \frac{1}{X_V} \cdot \frac{dX_V}{dt} \approx \frac{1}{\frac{X_{V,i} \cdot V_i + X_{V,i-1} \cdot V_{i-1}}{2}} \cdot \frac{X_{V,i} \cdot V_i - X_{V,i-1} \cdot V_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} \quad (3.12)$$

Adicionalmente, como parte de los cálculos *In progress* se incluye la integral de células viables descrita en la sección 1.1.2 para analizar la generación de células a lo largo del cultivo. Este parámetro se discretiza según la ecuación 3.13

$$IVCC_i = \int_0^{t_i} X_V dt \approx IVCC_{i-1} + \frac{X_{V,i} + X_{V,i-1}}{2} \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (3.13)$$

## Implementación en Microsoft Excel

El desarrollo del método de Umulis y Hu computacionalmente fue realizado con la siguiente secuencia de funcionamiento:

### 1. Input (ingreso de datos):

Se ingresan las mediciones realizadas en el cultivo. Estos datos corresponden a las concentraciones de todos los metabolitos de interés en el medio (fuentes de nitrógeno, de carbono, de oxígeno, de azufre, productos, desechos metabólicos), concentración de células (viables, apoptóticas, muertas), y volumen de cultivo en cada momento de medición. En el caso de un cultivo fed-batch o continuo las mediciones incluyen la concentración de cada nutriente en la alimentación, y el flujo alimentado.

En el software, los datos se organizan como una matriz donde cada fila corresponde a un instante de medición, y cada columna a todas las mediciones de cada parámetro.

## 2. Procesamiento de datos durante el cultivo:

### (a) Cálculos en proceso:

Se utilizan las ecuaciones 3.8, 3.9, 3.10 y 3.11 para determinar los consumos y producciones acumuladas, y las tasa específicas de consumo/producción en cada punto de medición. En el software, el cálculo *In Process* se estructura como una matriz donde cada columna corresponde a cada parámetro (consumos y tasas específicas).

### (b) Creación de curvas cinéticas:

Se grafican los datos experimentales (concentraciones) de todos los parámetros medidos y las tasa específicas calculadas con datos consecutivos, todo en función del tiempo. Estos gráficos permiten analizar visualmente el comportamiento del cultivo, pudiendo detectar patrones de consumo, *shifts* metabólicos o fases de crecimiento.

## 3. Procesamiento de datos después del cultivo:

### (a) Regresión no lineal:

Como fue mencionado, Umulis y Hu emplearon mínimos cuadrados ordinarios para obtener un polinomio de grado 3 o 4 que relacione los consumos y producciones acumuladas con el tiempo de medición. La regresión polinomial, o análisis de regresión para obtener un polinomio de grado n, es posible modelarla en forma matricial como muestra la ecuación 3.14.

$$\bar{S} = t \cdot A + \epsilon \quad (3.14)$$

Donde  $\bar{S}$  es el vector con consumos o producciones acumuladas del metabolito,  $t$  es la matriz de tiempos de medición (elevados incrementalmente hasta la n-ésima potencia),  $A$  es el vector de coeficientes de regresión y  $\epsilon$  el vector de error. Es decir, reemplazando se obtiene lo siguiente:

$$\begin{bmatrix} \bar{S}_1 \\ \bar{S}_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \bar{S}_m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & t_1 & t_1^2 & \dots & t_1^n \\ 1 & t_2 & t_2^2 & \dots & t_2^n \\ \cdot & \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ 1 & t_m & t_m^2 & \dots & t_m^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ a_m \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \epsilon_1 \\ \epsilon_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \epsilon_m \end{bmatrix} \quad (3.15)$$

La resolución de la ecuación 3.15 para obtener los coeficientes de regresión se describe en la ecuación 3.16. Aquí, se considera que fue posible minimizar el error expresado por el vector  $\epsilon$  llevándolo a un valor 0. Esta regresión debe realizarse para cada metabolito medido, y también para el número de células viables a fin de poder calcular las tasa específicas de consumo ajustadas.

$$A = (t^T \cdot t)^{-1} \cdot t^T \cdot \bar{S} \quad (3.16)$$

(b) **Cálculos post proceso:**

El resultado de la regresión para cada metabolito permite obtener una curva predictiva para cada uno de ellos, y utilizando la ecuación 3.6 se estiman las tasas de consumo o producción específicas ajustadas. De la misma forma que para el caso del análisis *In Process*, en el software se estructura cada tasa específica como una columna dentro de una matriz.

Estos parámetros, junto con la predicción del consumo acumulado, se emplean para generar gráficos que permitan determinar si las curvas calculadas se ajustan a los datos experimentales, estimar visualmente el error asociado a mediciones y cómo estas curvas intentan disminuirlo a fin de obtener una predicción tanto numérica como fenomenológicamente correcta.

(c) **Selección de relación lineal y cálculo de *ratios*:**

Para determinar en qué fase (intervalo) del cultivo estimar el *ratio*, se grafican los consumos acumulados de cada aminoácido respecto al consumo acumulado del aminoácido crítico (glutamina o glutamato). En cada gráfico, visualmente se identifica el intervalo donde los consumos son linealmente proporcionales; en la mayoría de los casos, esta región se condice con la fase exponencial de crecimiento del cultivo.

Una vez determinado el intervalo de tiempo en que se cumple una relación lineal de consumos, se emplea la ecuación 3.7 para calcular los coeficientes de relación estequiométrica con las tasas específicas de consumo en este intervalo. En Microsoft Excel <sup>®</sup> se utilizó la función “SLOPE” (PENDIENTE) para el cálculo, donde la variable dependiente corresponde a la tasa del aminoácido respectivo y la variable independiente a la tasa del aminoácido de referencia.

Para comparar el valor obtenido con otras metodologías de cálculo, se estimó el *ratio* en el mismo intervalo de tiempo de otras dos formas: con los consumos acumulados y con la tasa específica pero no ajustada, es decir la obtenida con datos experimentales consecutivos. La representatividad de cada versión del *ratio* se analizó calculando el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), parámetro que permite cuantificar el nivel de linealidad de la proporción entre datos. Dentro de la misma planilla se compara el  $R^2$  de los tres *ratios* para cada aminoácido, entregando el que posea la relación “más lineal” entre los datos utilizados para calcularlo.

En el Anexo A se describe a modo de ejemplo la estructura general de las planillas realizadas para el testeo en cultivos batch y fed-batch. Para cada prueba se utilizaron los datos experimentales medidos en los cultivos realizados en el proyecto para la línea CHO-tPA. En ambos tipos de cultivo, el *ratio* estequiométrico que posee un  $R^2$  más alto es el calculado con las tasas específicas ajustadas en 10 aminoácidos, y un total de 14 aminoácidos obtienen la mejor relación lineal con las tasas específicas (ya sea ajustada o con datos experimentales consecutivos). Por tanto, estos resultados confirman que la metodología de ajuste planteada permite obtener coeficientes que relacionan los consumos efectivos de los aminoácidos con un consumo de referencia, y cuya relación de consumo es linealmente proporcional.

### 3.3. Predicción de consumos en el tiempo

En contraste con los nutrientes del metabolismo energético (glucosa, glutamina y/o glutamato), los sustratos para otras funciones metabólicas (biosíntesis, proteinogénesis, etc.) no son consumidos a la misma tasa específica por célula durante el cultivo [30]. Dependiendo de la fase de cultivo en que se encuentren, las células utilizan unos u otros aminoácidos para su funcionamiento, y algunos de ellos incluso pueden alterar negativamente su desarrollo.

Las curvas cinéticas obtenidas en la aplicación del método de Umulis y Hu en Excel demuestran lo anterior. En el caso de aminoácidos esenciales (Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp y Val), se genera un consumo hasta un nivel pseudo-constante tanto en modalidad batch como fed-batch, mientras que para los no esenciales los perfiles de concentración dependen del uso de cada nutriente en el metabolismo.

La dificultad entonces es cómo se suplen estas diferentes necesidades, y primeramente cómo detectar estos cambios en el consumo de cada aminoácido. Para identificar estas variaciones y predecir cuándo y cómo ocurrirán, es necesario un enfoque diferente. Este análisis puede tomar diversos rumbos, dependiendo del momento en que se requiera la información y del modelo que se tenga para representar el cultivo.

Contar con la información antes de realizar el cultivo (durante la etapa de diseño) o durante la experimentación, permite diferenciar estrategias de detección analíticas o en tiempo real. En el caso de una metodología en tiempo real, son necesarios dos ejes relevantes: un sistema de medición y control eficaz, y un modelo matemático de procesamiento que permita dar respuesta al instante de lo que ocurre en el cultivo y predecir lo que sucederá, en base a los mismos datos y datos históricos [31]. Un ejemplo de ellos es la estrategia de Schinn y colaboradores expuesta en la sección 1.2.1, donde se incluyeron métodos estadísticos (modelos de regresión lineal y funciones de decaimiento exponencial) para predecir el comportamiento de aminoácidos fraccionadamente: primero la regresión lineal genera una predicción para los primeros días de ucltivo (crecimiento exponencial), y luego se utilizan los datos experimentales recogidos de ese cultivo para determinar cómo se comportarán los aminoácidos los siguientes días con la función de decaimiento. De esta forma, mediante *Machine Learning* es posible predecir los perfiles de concentración y detectar cambios en el mismo cultivo en desarrollo [25].

En contraste, si se requiere la información para el diseño del cultivo (lo cual es el caso del proyecto), un método de predicción en tiempo real no es de mayor utilidad. Aquí, es posible nuevamente considerar dos planteamientos: utilizar patrones de cultivos realizados, lo cual requiere set de datos históricos (*Data Mining*); o basarse en cultivos experimentales desarrollados para el mismo diseño. En cualquiera de los casos, se utilizan modelos de regresión para obtener patrones en los consumos. Dentro de esta arista es posible considerar el método de procesamiento de datos de Umulis y Hu, pues permite obtener numérica y gráficamente el comportamiento de las tasas específicas de consumo o producción de cada metabolito medido en el cultivo.

El tipo de modelo que describa matemáticamente el cultivo celular también determinará cómo será posible predecir el consumo de nutrientes. Cuando se describe no sólo el sistema extracelular (biorreactor en conjunto) sino que también toda la maquinaria intracelular, se

utilizan modelos metabólicos a escala genómica (GSM) [32]. A partir de ellos, es posible predecir los flujos necesarios de cada nutriente utilizando herramientas como Análisis de Flujos Metabólicos (MFA) o Análisis de Variabilidad de Flujos (FVA) [33]. Sin embargo, emplear sólo esta metodología implica la suposición de estado estacionario (un óptimo de funcionamiento celular) [25], y por tanto no es posible predecir las diferencias en los requerimientos nutricionales a lo largo del cultivo. Para solucionarlo, se recurre a métodos estadísticos o parametrizaciones de los modelos [34], que corrijan y simplifiquen el sistema.

Cuando el objetivo es monitorear, controlar y optimizar el funcionamiento del cultivo, y donde es posible medir sólo algunos metabolitos, conocer los detalles del metabolismo intracelular se hace irrelevante. Así, los modelos no estructurados o “macroscópicos” permiten analizar la evolución dinámica de los componentes medibles del proceso, logrando entender y predecir la dinámica de un cultivo celular [35]. Estos modelos por lo general son un sistema de ecuaciones diferenciales correspondientes a balances de masa de los compuestos medibles (incluyendo células), y su resolución mediante algoritmos de optimización (redes neuronales, algoritmos genéticos, etc.) permiten predecir el comportamiento de estos metabolitos. Dentro de este conjunto se encuentra el modelo base utilizado para el proyecto.

### 3.4. Discusión

Lo estudiado en este capítulo sobre metodologías de análisis de datos experimentales, determinación de tasas de consumo y predicción de perfiles de concentración en el tiempo permite obtener una potencial estrategia de cálculo de composición de un medio, en base a los consumos de cada aminoácido en el cultivo base del diseño.

La metodología de procesamiento de datos biológicos descrita es coherente con el desarrollo de la plataforma de diseño, puesto que se utilizan datos experimentales de metabolitos medibles (células, fuentes de carbono, aminoácidos, productos y subproductos) para comprender gráfica y numéricamente el comportamiento del cultivo realizado, y estimar relaciones de consumo lineales de los sustratos. Estos datos de entrada de la metodología son del mismo formato que los datos medidos para el funcionamiento de la plataforma (un ejemplo de la planilla de datos utilizada en el proyecto se encuentra en el Anexo B), por lo que es posible entonces implementar el análisis de tasas específicas para calcular estos *ratios*. Así, se obtendrá una composición de alimentación para diseñar el siguiente cultivo, que responda a las necesidades nutricionales de las células, particularmente a fin de mejorar la viabilidad y el uso de nutrientes.

Los *ratios* se calculan en el intervalo de tiempo (y de datos) donde la relación entre tasas de consumo es lineal, lo cual no se cumplió en todos los casos, ya que en ambos tipos de biorreactor no en todos los aminoácidos el *ratio* que obtuvo un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) más alto fue el calculado con las tasas específicas ajustadas. La razón de ello es que para el mismo intervalo de tiempo los consumos de aminoácidos difieren unos de otros, obteniendo relaciones lineales con el consumo del aminoácido de referencia en diferentes instantes del cultivo. Esto puede afectar los cálculos futuros en el modelo matemático de la plataforma, puesto que a diferencia del ajuste manual en Excel no es posible identificar el tramo lineal de cada aminoácido, sino que la automatización requiere definir un criterio

común que determine el intervalo de cálculo. En ese sentido, podría de igual manera sub o sobre estimarse la concentración necesaria. Pese a ello, como el 75 % de los aminoácidos obtienen relaciones lineales en el intervalo de crecimiento celular, el supuesto es adecuado para la implementación en el modelo matemático.

Otro hecho que puede afectar el cálculo de *ratios* es el método de regresión para obtener los consumos acumulados ajustados. En Excel, el método de regresión polinomial implica la utilización de álgebra matricial y sumatorias de datos, lo que puede sobrestimar los cálculos. Por lo tanto, en la implementación de ajuste es imperativo emplear un método de regresión que no induzca estos errores.

La identificación y predicción de patrones de consumo de cada aminoácido depende tanto del objetivo del modelo matemático como de la disponibilidad de datos. Considerando que el modelo base de la plataforma es dinámico y macroscópico, y que el funcionamiento del proyecto es predecir un diseño de cultivo celular basándose en cultivos previos, sólo el análisis manual de datos experimentales y el uso de *Machine Learning* (funciones de decaimiento particularmente) permitiría detectar instantes donde la composición deba ser recalculada, para ajustar la alimentación a las necesidades celulares una vez que el cultivo haya comenzado.

# Capítulo 4

## Implementación de ajuste de composición

El mecanismo de *ratios* estequiométricos permite relacionar los consumos efectivos de los nutrientes (aminoácidos) de un cultivo, y obtener un parámetro de proporcionalidad que permite calcular la composición necesaria del medio a partir de un nutriente de referencia, buscando minimizar la sobre o sub incorporación de cada aminoácido no crítico en el nuevo cultivo. Esta metodología resulta de utilidad para el proyecto FONDEF ID18I10308, puesto que el modelo matemático desarrollado en él diseña un cultivo celular ajustando dos nutrientes críticos y considerando que los otros (particularmente aminoácidos) no lo son, pero sí son necesarios para el crecimiento y metabolismo celular.

Los análisis preliminares de cultivos batch y fed-batch de CHO-tPA en Microsoft Excel, demostraron la capacidad del método de obtener estas relaciones de proporcionalidad para diseñar la alimentación. Dada esta efectividad preliminar, es posible entonces incorporar el método en el mismo software del modelo matemático de la plataforma de diseño, testear su funcionamiento conjunto y determinar su eficacia en comparación al uso de un medio estandarizado.

A continuación se presenta la metodología específica para abarcar este análisis, considerando que principalmente se pueden comparar las simulaciones obtenidas de la plataforma. Sin embargo, es posible incluir una etapa de análisis de cultivos experimentales, desarrollados por personal encargado de ello en el proyecto, pero cuyos resultados no serán considerados dentro de la presente memoria.

### 4.1. Metodología específica

Los pasos seguidos en la implementación del método de ajuste con *ratios* estequiométricos en el modelo matemático de la plataforma, y en el análisis de resultados de ésta, son los siguientes.

- Escritura del método de ajuste en MATLAB ®.

- Incorporación del método al modelo matemático para el cálculo de la composición, ya sea a partir de datos experimentales de un cultivo batch o de uno fed-batch.
- Ejecución del programa para la etapa de cultivo fed-batch preliminar, para la obtención de una simulación de CHO-tPA con composición ajustada.
- Ejecución del programa para la etapa de cultivo fed-batch optimizado, para la obtención de una simulación de CHO-tPA con composición optimizada.
- Análisis de resultados obtenidos, comparando las simulaciones nuevas con otras del mismo tipo celular y biorreactor, pero con composición estandarizada.

## 4.2. Incorporación del método al modelo matemático

Como se describe en la sección 1.1.3, la plataforma de diseño genera la simulación o predicción de un cultivo celular fed-batch resolviendo un modelo cinético-dinámico. Esta simulación hace referencia a diseñar la estrategia de alimentación a partir de dos nutrientes críticos (a pesar de que se incluyen más), y predecir cuánto se producirá del bio-producto de interés, cuántas células habrá a lo largo del cultivo y cómo se comportará el biorreactor (evolución del volumen y concentraciones de metabolitos medibles).

Dentro de esta simulación, desarrollada en el software científico MATLAB <sup>®</sup>, se utiliza un modelo de ecuaciones diferenciales parciales para representar matemáticamente el sistema de cultivo, el cual se detalla en el Anexo C. Con este modelo se elaboró un código que, a partir del ajuste de parámetros desarrollado con los datos experimentales de la etapa anterior, determina los parámetros de un controlador proporcional-integrativo (PI) que permitan mantener constante los niveles de los nutrientes críticos (glucosa y glutamato o glutamina). Con ello, se resuelve el sistema de ecuaciones del modelo dinámico a fin de obtener la alimentación necesaria para cumplir con el funcionamiento del controlador. Adicionalmente, se incluye la aproximación a pulsos y escalones de la alimentación diseñada, dado que en la práctica las bombas empleadas en cultivos celulares utilizan alguna de estas dos estrategias para operar.

El funcionamiento de cada parte de este código, y del modelo, considera que tanto el medio de cultivo empleado como el medio a alimentar poseen una composición definida, la cual se carga al inicio como parte de los parámetros fijos del modelo, junto con los datos experimentales del cultivo anterior y otros parámetros del sistema que no son de mayor interés aquí. Es en esta parte del código y del modelo matemático donde es posible incorporar el método de ajuste, de manera de cargar como parámetros fijos las composiciones calculadas en lugar de las predefinidas.

Como el código desarrollado utiliza otros códigos anexos definidos como funciones implementables, y debido a su larga extensión, se decidió incluir el ajuste con *ratios* estequiométricos también como una función implementable en este código “madre”. Es decir, el método se desarrolló como un código tipo *function* que pudiera ser llamado desde el código principal de la plataforma, entregando los coeficientes de relación estequiométrica para calcular la alimentación.

La función desarrollada consta de seis pasos:



1. Cargar los datos experimentales.
2. Determinar el intervalo donde se realizará el ajuste.
3. Calcular consumos y producciones acumuladas.
4. Regresión de los consumos acumulados respecto al tiempo.
5. Calcular tasas específicas con los coeficientes de regresión.
6. Calcular y entregar los *ratios* estequiométricos.

El código de programación de la función de ajuste de composición para cada etapa del servicio (fed-batch no optimizado y fed-batch optimizado) se muestra en el Anexo D. Tal como allí se explicita, la función generada entrega un vector con las razones estequiométricas calculadas, con el mismo orden de aminoácidos que el de los datos experimentales y el utilizado en el código “madre”. Con estos coeficientes, se define en el programa principal la composición de cada aminoácido (fuera del de referencia) según la ecuación 4.1.

$$S_{j, feed} = \alpha_j \cdot S_{r, feed} \quad (4.1)$$

En la ecuación 4.1,  $S_{r, feed}$  es la concentración del aminoácido de referencia (glutamato o glutamina) definida en la alimentación. Dado que se tiene un medio de cultivo predefinido, se decidió emplear la concentración en ese medio como la concentración a utilizar en el medio ajustado (en particular, 60 [mM]). Es decir, de igual manera se deben cargar las concentraciones estandarizadas antes de calcular la composición para utilizar dicho valor. La inclusión de la función en el código de programación principal, para cada caso, se describe en el Anexo E.

El objetivo de la plataforma, como ya se ha mencionado, es diseñar computacionalmente un cultivo celular en miras de obtener la máxima producción posible de acuerdo con los supuestos tomados para desarrollar el modelo cinético-dinámico. Como el ajuste de composición busca un incremento en la productividad predicha, y que fuera del cálculo de composición de la alimentación no hay otros cambios en el modelo matemático desarrollado, para analizar la efectividad de uso del ajuste se compararán ambos escenarios mediante cuatro parámetros:

- **Productividad total:** cantidad total de producto acumulado al final del cultivo, en *mg*.
- **Productividad específica:** corresponde a la tasa específica de producción, calculada como el cociente entre el producto total y la integral de concentración de células viables. Ésta permite medir cuán activas estuvieron las células viables en la síntesis del bio-producto.
- **Concentración de células viables:** cantidad de células viables durante el cultivo, representada por la integral de concentración de células viables (IVCC).
- **Rendimiento de cada aminoácido:** tal como se definió en la sección 1.1.2, es la razón entre la cantidad de producto obtenido y la cantidad de aminoácido utilizado.

Las dos primeras métricas de comparación se obtienen directamente de resolver el sistema de ecuaciones y se representan gráficamente. Para las otras, en cambio, fue necesario incluir el cálculo en el código principal posterior a dicha resolución. Adicionalmente, se analiza para cada predicción con composición ajustada si las nuevas concentraciones son factibles, contrastando el valor obtenido con la solubilidad de cada aminoácido.

### 4.3. Ajuste 1: diseño de cultivo fed-batch

El primer paso para testear el ajuste en el diseño computacional es predecir un cultivo fed-batch a partir de un cultivo batch experimental. Uno de los supuestos tomados para la implementación es que el tiempo máximo nominal del cultivo es el doble del tiempo del cultivo experimental base, y a partir de allí se simula el sistema y se genera la predicción. No obstante, lo obtenido no necesariamente debe reproducirse completamente en laboratorio, sino que puede tomarse como guía para detener el cultivo en cualquier momento que represente un cambio metabólico irreversible (como disminución de células viables, por ejemplo).

En primer lugar, se simuló el escenario con composición ajustada sin factor de dilución en la alimentación de aminoácidos. Pero, con esa configuración, no fue posible obtener flujos factibles en el rango de las bombas consideradas para utilizar en laboratorio, incluso con pulsos cada 12 horas y con extensiones entre 0,5 y 20 minutos. Para solucionarlo, se siguió la misma secuencia de evaluación del proyecto: primero variar los tiempos de los pulsos (extensión y separación entre ellos), y si eso no permitía una simulación factible se comenzaba a jugar con la dilución de los medios a alimentar.

A partir de esas iteraciones, se decidió utilizar un factor de 10 en el flujo de glucosa y un factor de 2 en el flujo de aminoácidos, con pulsos cada 8 horas y extensión de 1 minuto; esta misma configuración se utilizó para el escenario con composición estándar, pero utilizando factores de 10 y 3 respectivamente. Los resultados de cantidad de producto, productividad específica y cantidad de células viables para ambos escenarios y un tiempo de simulación de 270 horas se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Resultados de productividad y concentración de células viables para la simulación del cultivo fed-batch no optimizado, en ambos escenarios (con y sin ajuste de composición).

-	<b>Cultivo con composición estandarizada</b>	<b>Cultivo con composición ajustada</b>
Producto acumulado [mg]	766,5	801,9
$q_P$ [ $mg \cdot L / cell \cdot h$ ]	$4,93 \cdot 10^{-9}$	$5,21 \cdot 10^{-9}$
$IVCC_f$ [ $cells \cdot h / L$ ]	$1,35 \cdot 10^{11}$	$1,27 \cdot 10^{11}$

Tanto la cantidad final de tPA sintetizado como la productividad específica promedio aumentan al ajustar la composición, con incrementos de 5 y 6% respectivamente. Las predicciones generadas que arrojan estos valores se muestran en las Figuras 4.1 y 4.2, donde es posible advertir que el aumento se genera por una mayor eficiencia global del cultivo y no por un funcionamiento distinto, pues los comportamientos de las curvas son idénticos entre ambos escenarios.

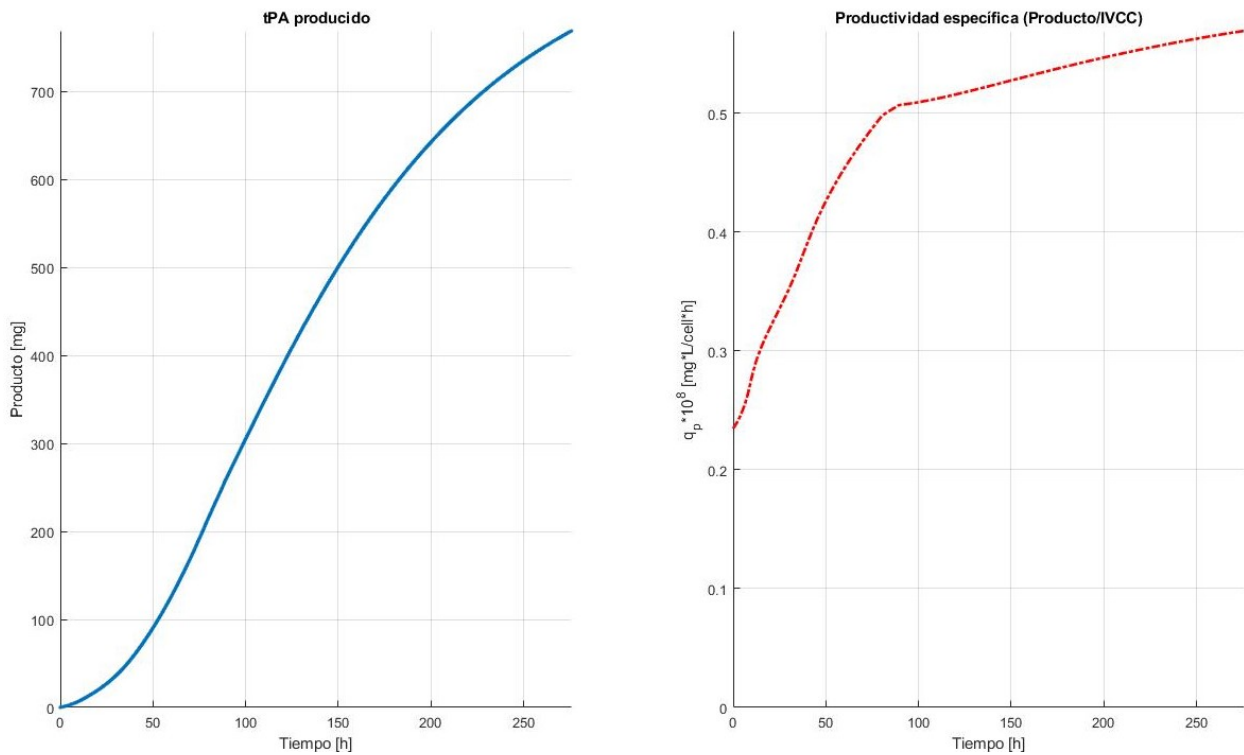


Figura 4.1: Predicción de la productividad de tPA y tasa específica de producción para el cultivo fed-batch no optimizado, en el escenario con composición estandarizada. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

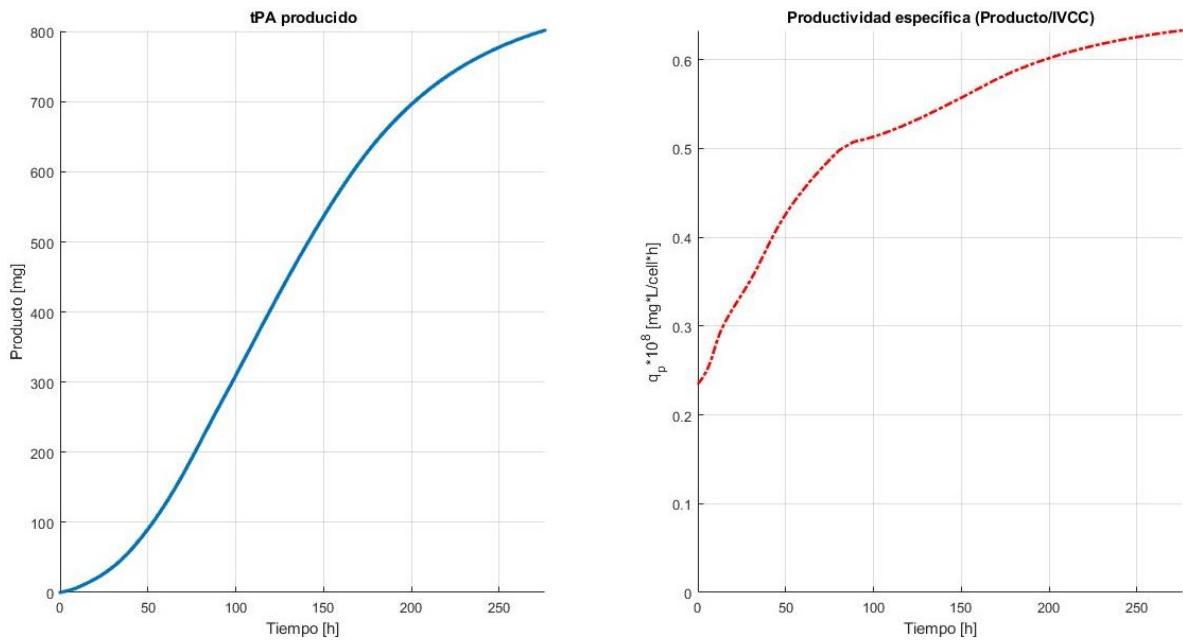


Figura 4.2: Predicción de la productividad de tPA y tasa específica de producción para el cultivo fed-batch no optimizado, en el escenario con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

Sin embargo, existe una disminución de 6% en la disponibilidad de células viables con respecto al uso de una composición estandarizada, indicando un decrecimiento más pronunciado y por tanto que el agotamiento de nutrientes afecta más con una composición ajustada en la alimentación (Figura 4.3). Pese a esta leve baja, el aumento en la productividad específica antes mencionado refleja que a pesar de contar un número ligeramente menor de células metabólicamente activas, trabajan en mejores condiciones con una composición ajustada, sintetizando más tPA por célula. Además, como fue mencionado previamente, esta disminución no necesariamente se verá en el cultivo, dado que la simulación puede reproducirse sólo parcialmente ya que el tiempo de diseño es extenso.

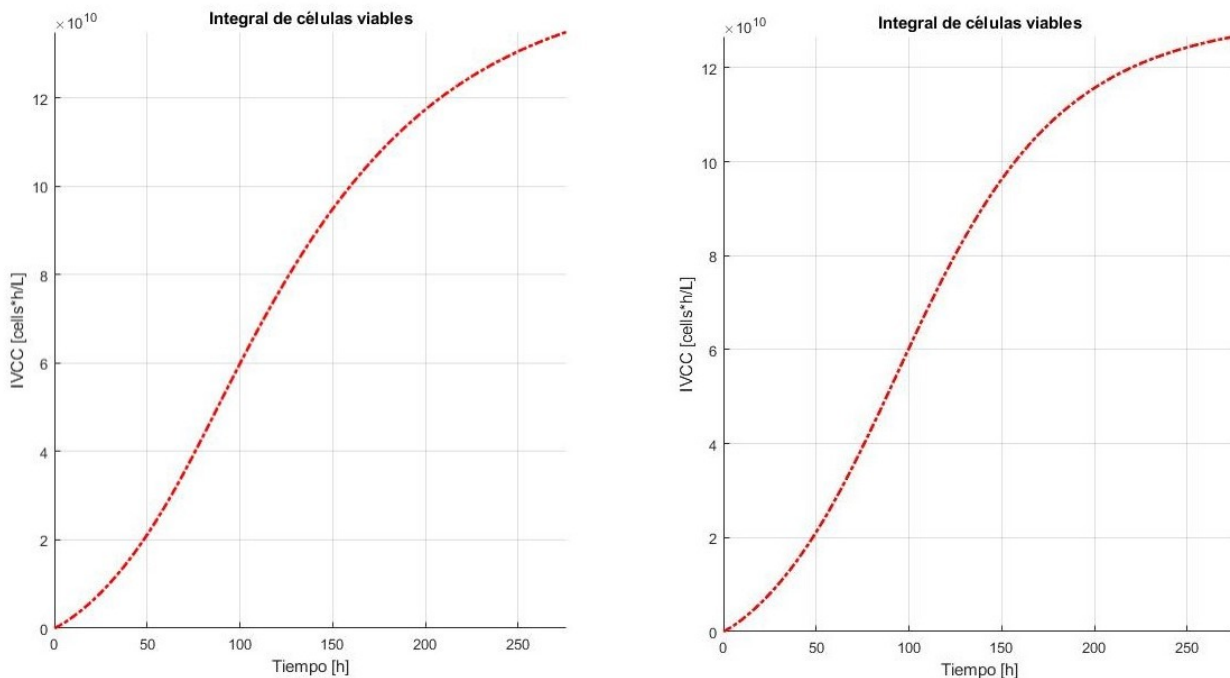


Figura 4.3: Integral de células viables (*IVCC*) predicha para el cultivo no optimizado, para ambos escenarios: composición estándar (izquierda) y composición ajustada (derecha). La simulación fue desarrollada en MATLAB.

El rendimiento de cada aminoácido, por su parte, se observa en la Figura 4.4, donde se comparan ambas configuraciones de composición. Existen seis aminoácidos que poseen un rendimiento mayor con la composición estandarizada del medio comercial (Leu, Ile, Lys, Thr, Phe y Ala), sin embargo en ningún caso la disminución de rendimiento es significativa. Otros aminoácidos, como prolina o metionina, tienen aumentos de rendimiento de hasta 100% su valor. De acuerdo con esto, ajustar la composición de medio a alimentar, y por tanto ajustar la disponibilidad de cada aminoácido acorde con las necesidades de la célula, podría mejorar el uso de cada nutriente.

Lo anterior, no obstante, sólo se basa en resultados numéricos. El método de ajuste tal como se definió calcula una composición del medio que responde a mejorar la cantidad de células y no a aumentar la síntesis de bio-producto, pues los *ratios* se estiman en el intervalo de datos donde hay crecimiento. La generación de células viables muestra que una composición ajustada permite una mayor tasa de crecimiento en la fase exponencial (gráfico derecho de la

Figura 4.3), logrando el objetivo mencionado a pesar de que luego el decrecimiento es mayor, y produciendo sólo como consecuencia una mayor cantidad de tPA.

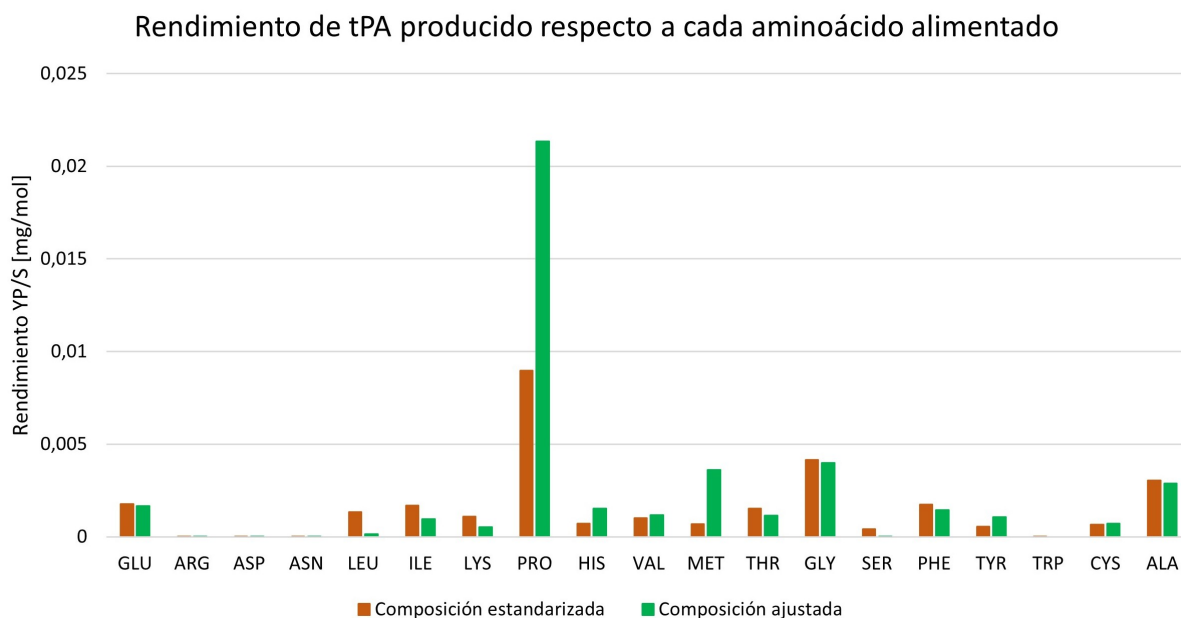


Figura 4.4: Rendimiento sustrato a producto ( $Y_{P/S}$ ) de cada aminoácido alimentado, para ambos escenarios en el diseño de cultivo fed-batch no optimizado. Para arginina, asparatato, asparragina y triptofano no se aprecian valores, lo que se traduce en la menor influencia que tienen estos aminoácidos en la generación de tPA.

En cuanto a la composición calculada, finalmente, se muestra en la Figura 4.5 la comparación de cada medio. El cálculo de composición mostró que varios aminoácidos no requieren ser alimentados (*ratios* muy cercanos a 0 o con valor 0), siendo el caso de Asp, Leu, Ile, Lys, Thr, Gly y Ala. Cinco de ellos son los mismos que poseen un mayor rendimiento de producto con la composición estándar, generando una aparente discrepancia entre el uso efectivo en la síntesis de tPA y su necesidad de alimentación. Pero esta diferencia se ve explicada por el sesgo en el cálculo de los rendimientos, puesto que la ecuación no considera si efectivamente cada aminoácido se utiliza para generar producto, sólo la relación proporcional entre el consumo y la aparición de tPA. Así, es lógico que si se encuentran en mayor concentración en el cultivo, el rendimiento será mayor de acuerdo con la definición matemática utilizada para definirlo.

El gráfico resalta además que la composición calculada podría no ser factible de llevar a cabo. Tanto prolina como metionina tienen incrementos considerables, siendo 66 y 28 veces más con respecto a la composición del medio estándar, respectivamente. Pese a este gran aumento, las concentraciones calculadas están por debajo del límite de solubilidad de ambos compuestos: se necesita 176,7 [mM] de prolina, siendo su límite de solubilidad 14,2 [M] a 25°C [36]; y de metionina se necesita 42,2 [mM], siendo su límite 322 [mM] a 20°C [37]. Por tanto, el incremento de concentración es posible implementarla al menos en teoría, pero es necesario analizar la solubilidad conjunta de todos los aminoácidos para asegurar la aplicabilidad de la composición calculada.

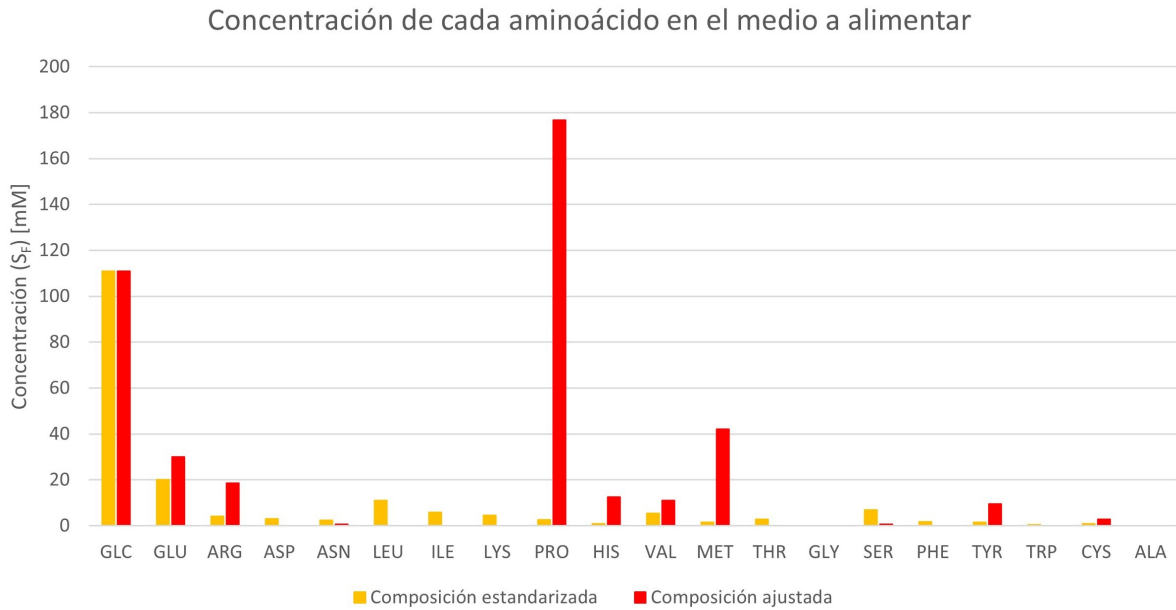


Figura 4.5: Composición del medio a alimentar para ambos escenarios (estandarizada y calculada), en el diseño de cultivo fed-batch no optimizado. La ausencia de rectángulos implican una concentración nula.

#### 4.4. Ajuste 2: optimización del diseño fed-batch

El segundo testeo del método, esta vez prediciendo un cultivo fed-batch a partir de otro fed-batch, se desarrolló simulando el modelo cinético utilizando el set de parámetros obtenido a partir de un fed-batch experimental. Al igual que el análisis del ajuste anterior, se simuló en primer lugar el escenario con composición ajustada, con pulsos cada 8 horas y extensión de 1 minuto. Pero, a diferencia del primer diseño, la composición calculada y dicha configuración de pulsos permitió obtener flujos factibles en el rango de las bombas, sin necesidad de incluir un factor de dilución; no obstante, para la alimentación de glucosa sí fue necesario diluirla 2 veces. En el caso del escenario con composición estandarizada, la glucosa debió ser diluida 5 veces para obtener flujos factibles.

Los resultados de cantidad total de producto, tasa específica de producción y cantidad de células viables para ambos escenarios y un tiempo de simulación de 460 horas se detallan en la Tabla 4.2, mientras que el comportamiento completo de la predicción se observa en las Figuras 4.6 y 4.7.

Tabla 4.2: Resultados de productividad y concentración de células viables para la simulación del cultivo fed-batch optimizado, en ambos escenarios (con y sin ajuste de composición).

-	Cultivo con composición estandarizada	Cultivo con composición ajustada
Producto acumulado [mg]	992,2	878,0
$q_P$ [ $mg \cdot L / cell \cdot h$ ]	$1,34 \cdot 10^{-9}$	$1,46 \cdot 10^{-9}$
$IVCC_f$ [ $cells \cdot h / L$ ]	$4,02 \cdot 10^{11}$	$3,28 \cdot 10^{11}$

En contraste con la etapa de preliminar de diseño, existe una disminución del 10% en la cantidad de producto generada. Sin embargo, en esta etapa también se incrementa la tasa específica de producción promedio al ajustar la composición, aumentando un 8%. Así, se reafirma que un cambio de composición, en respuesta a los consumos efectivos de cada aminoácido, tiende a aumentar (al menos en teoría) la actividad productiva de las células. Además, el comportamiento de las predicciones nuevamente sugiere que este incremento de productividad por célula se debe a un aumento en la eficiencia del cultivo.

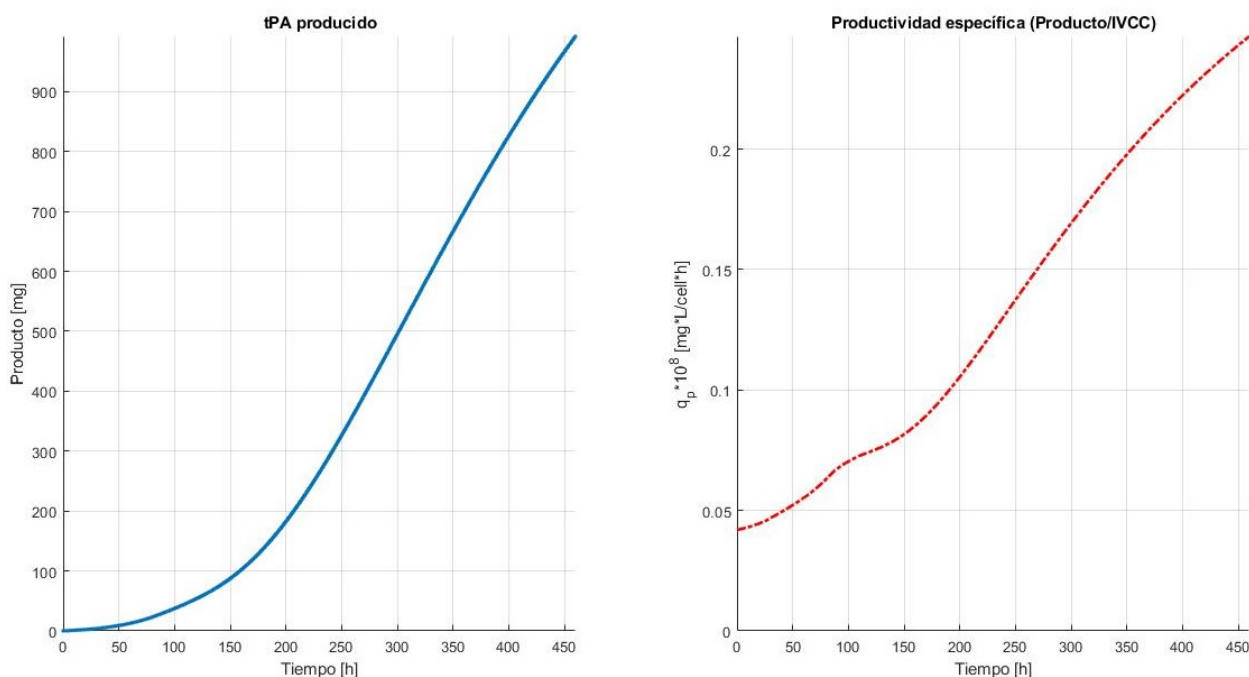


Figura 4.6: Predicción de la productividad de tPA y tasa específica de producción para el cultivo fed-batch optimizado, en el escenario con composición estandarizada. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

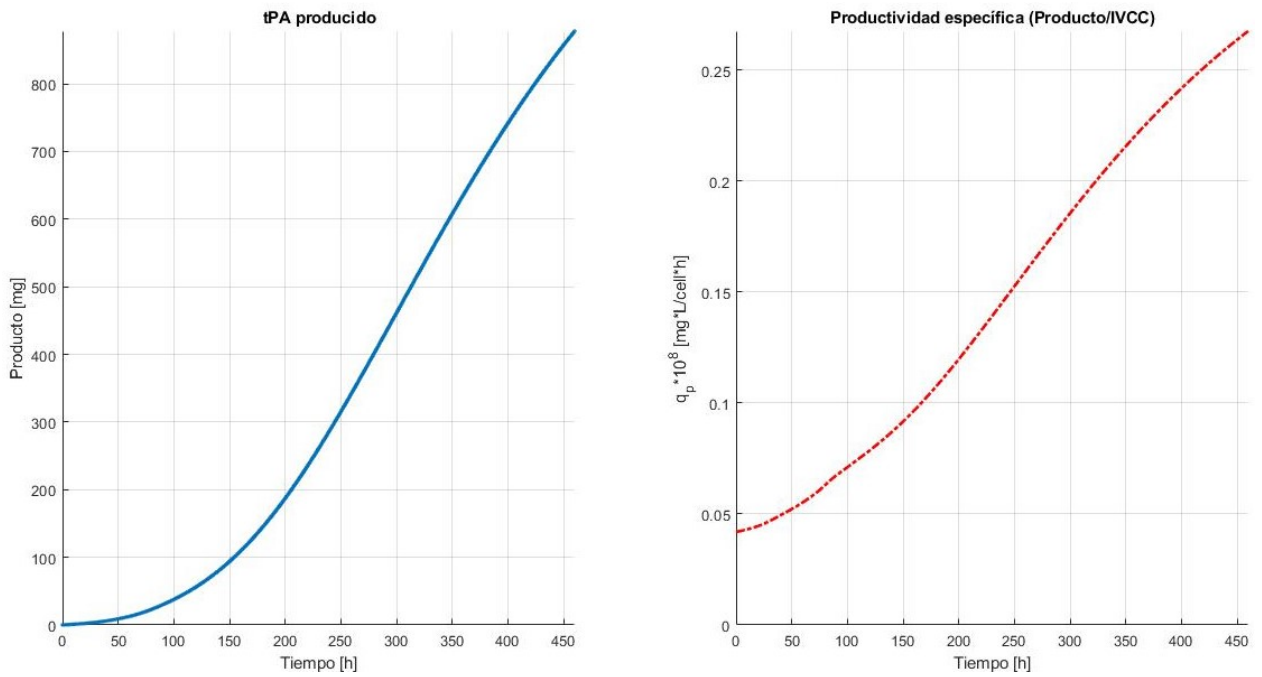


Figura 4.7: Predicción de la productividad de tPA y tasa específica de producción para el cultivo fed-batch optimizado, en el escenario con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

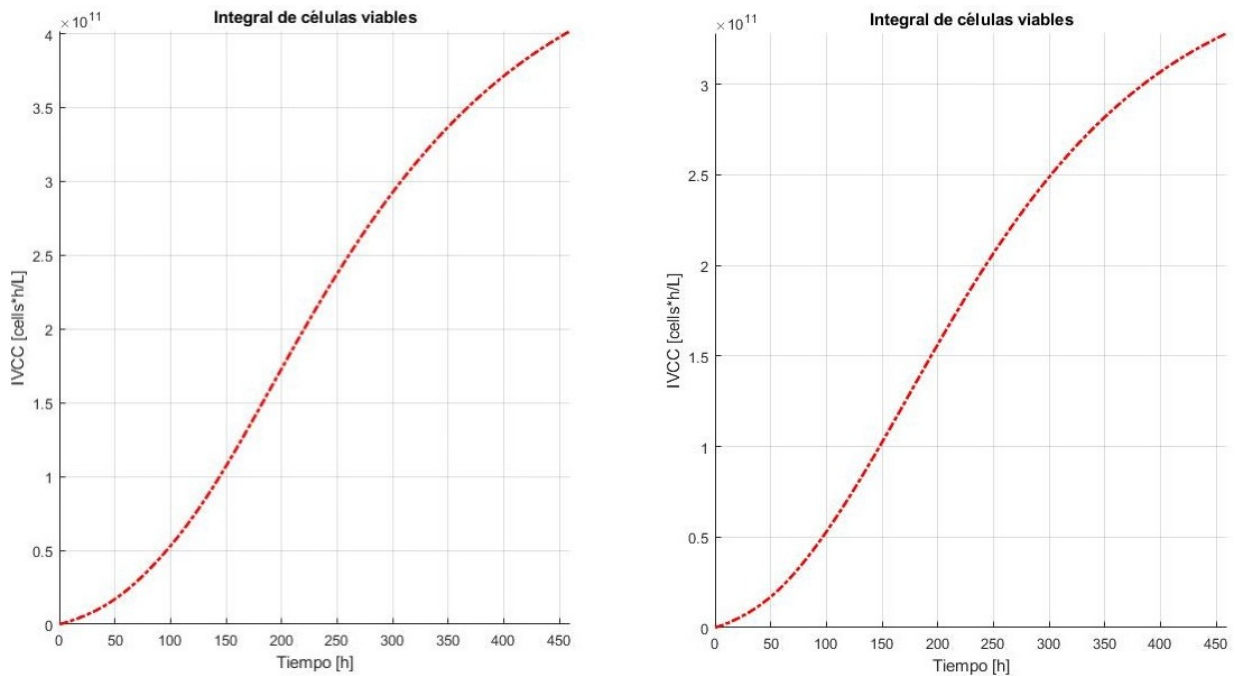


Figura 4.8: Integral de células viables (*IVCC*) predicha para el cultivo optimizado, para ambos escenarios: composición estándar (izquierda) y composición ajustada (derecha). La simulación fue desarrollada en MATLAB.



Pese a que hay una mayor síntesis de tPA por célula, el cálculo de composición en esta etapa nuevamente disminuye la cantidad de células generadas. Como muestra la Tabla 4.2, la disponibilidad de células viables decrece casi un 20 % con respecto al uso de una composición estándar en la alimentación. El comportamiento de las predicciones de IVCC en ambos escenarios es el mismo como se aprecia en la Figura 4.8, reflejando que esta diferencia de disponibilidad se debe a un crecimiento diferente entre los cultivos sólo numéricamente, es decir que la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) disminuye su valor pero no su comportamiento intrínseco. La disminución entonces puede tener su origen fenomenológico en el uso de los nutrientes a nivel celular, pues el incremento en la productividad específica apunta a que los aminoácidos pueden estar utilizándose para sintetizar metabolitos secundarios (tPA) en lugar de aportar al metabolismo energético y de reproducción.

Analizando el rendimiento de cada aminoácido en las predicciones, es posible reafirmar la conjetura anterior. Como se observa en la Figura 4.9, para el diseño final del cultivo la conversión de nutriente a producto aumenta en 13 de los 19 aminoácidos suministrados en la alimentación, con respecto al uso de una composición estándar. Seis de esos incrementos son superiores al 50 %, llegando algunos incluso a ser mayor al 1.000 % (Asp y Trp). Así, las predicciones indican que a pesar de generar una menor cantidad total de producto, para más de la mitad de los nutrientes utilizados su uso (teórico) en la síntesis de producto tiende a aumentar.

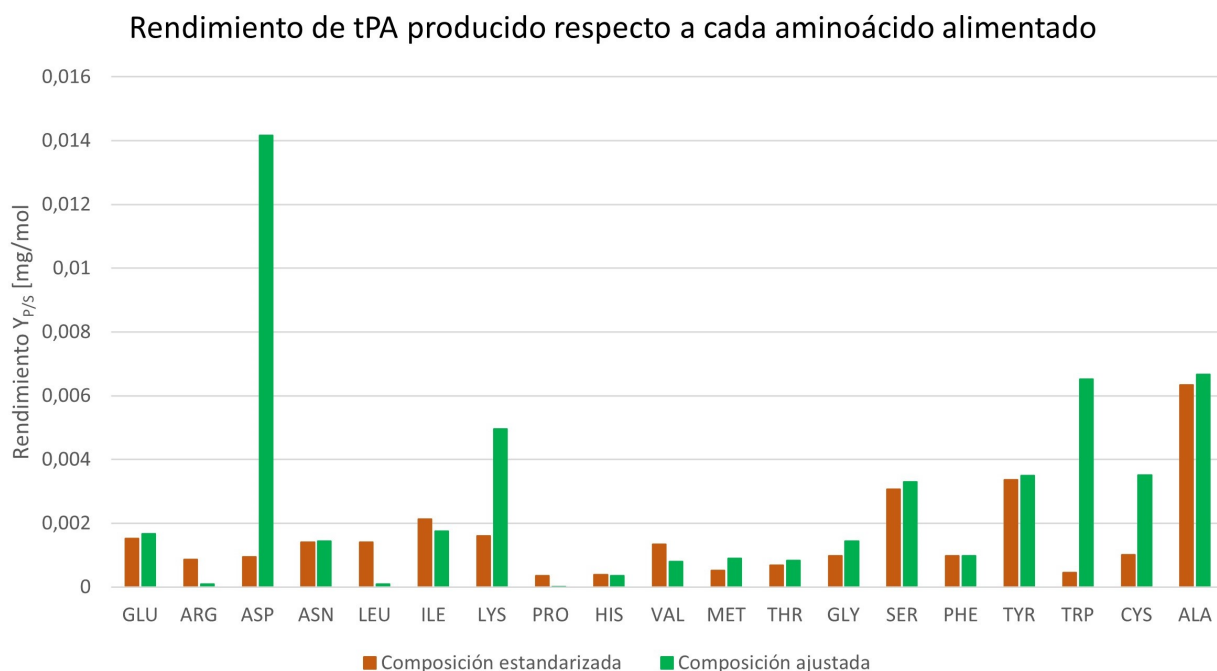


Figura 4.9: Rendimiento sustrato a producto ( $Y_{P/S}$ ) de cada aminoácido alimentado, para ambos escenarios en el diseño de cultivo fed-batch optimizado. Para arginina, asparatato, asparragina y triptofano no se aprecian valores, lo que se traduce en la menor influencia que tienen teóricamente estos aminoácidos en la generación de tPA.

No obstante, en algunos de los otros siete aminoácidos que poseen un rendimiento mayor con la composición estandarizada, el cambio es importante de analizar. No sólo porque la composición fija induce un rendimiento mayor al 50 % para Arg, Leu, Pro y Val, sino que 4 de estos aminoácidos poseían un rendimiento teórico mejor con la composición ajustada en la etapa de diseño anterior (Arg, Pro, His y Val). Esto podría indicar dos hechos: que los datos experimentales empleados para el diseño en cada etapa podrían contener errores asociados a medición, o que numéricamente existan diferencias mínimas que alteran las predicciones entre una etapa y otra. Para ello, es de suma relevancia el desarrollo de múltiples cultivos (duplicados, triplicados, etc.), lo que permitiría solucionar ambas dificultades.

La composición calculada para el diseño final del cultivo se muestra en la Figura 4.10. El ajuste de composición en base a los consumos efectivos reflejó que 9 de los 19 aminoácidos requieren una menor alimentación: Arg, Asn, Leu, Ile, Pro, His, Val, Phe y Tyr. De ellos, sólo 4 también veían bajas en su concentración en el diseño no optimizado, indicando que las necesidades nutricionales de un cultivo batch son diferentes a las de un cultivo fed-batch. Esto se ve reforzado por el hecho que tres aminoácidos con una concentración calculada mayor que la estándar (Asp, Lys y Thr) tenían el comportamiento inverso en la etapa de diseño anterior.

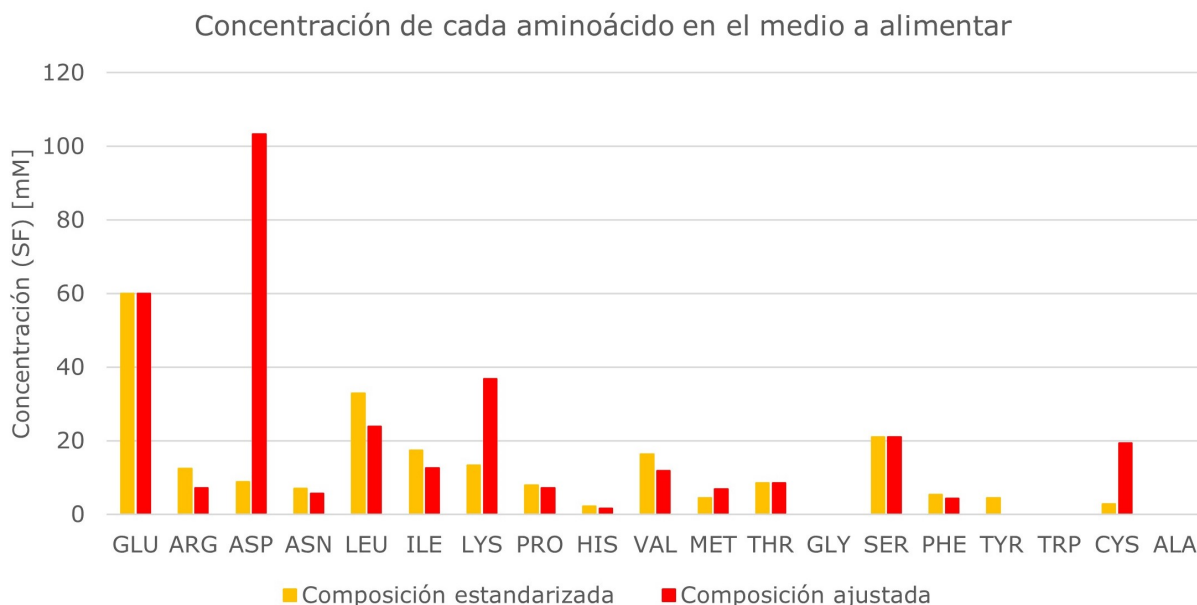


Figura 4.10: Composición del medio a alimentar para ambos escenarios (estandarizada y calculada), en el diseño de cultivo fed-batch optimizado. La ausencia de rectángulos implican una concentración nula.

A diferencia del diseño preliminar, las concentraciones calculadas no difieren en gran medida de las concentraciones en el medio estándar, permitiendo elaborar el medio sin limitaciones asociadas a solubilidad. Sólo existen dos excepciones: aspartato (Asp), que requiere una concentración 12 veces mayor que en el medio estándar; sin embargo, a pesar de necesitar 103 [mM] esta cantidad no supera su límite de disolución (220 [mM] a 25°C [38]). Y el segundo es cisteína (Cys), cuyo aumento pese a ser de 7 veces el valor del medio estándar,

no llegar a ser ni el 10 % de su solubilidad: se requiere una concentración de 19 [mM], y el límite es 228 [mM] a 25°C [39]. Así, la concentración estimada para la alimentación en el diseño optimizado es factible de desarrollar en laboratorio, sin dificultades aparentes en solubilidad.

## 4.5. Discusión

En primer lugar, se destaca la implementación efectiva del cálculo de *ratios* estequiométricos como una función de MATLAB que pueda ser llamada por el modelo de diseño, tanto para un biorreactor batch como uno fed-batch. En ambos casos fue posible estructurar el método para que, a partir de los datos de entrada (mediciones experimentales), se calcularan las tasas específicas de consumo y con ellas estimar coeficientes que relacionaran el consumo (o producción) de cada aminoácido con el de la referencia. La única diferencia en las funciones creadas para uno u otro reactor es la inclusión de alimentación como dato de entrada, lo cual no supuso mayores cambios en la estructuración del código de programación.

En la formulación del método en MATLAB existen dos puntos que pueden alejar la estimación de la realidad fenomenológica del cultivo. Uno de ellos es el cálculo del intervalo de tiempos (y de datos) en que se realizarán los otros cálculos: se define como el tramo factible el set de datos donde haya crecimiento celular, es decir que se calcula la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) entre datos consecutivos y se consideran sólo los valores positivos. Esto no necesariamente corresponderá al intervalo de crecimiento, pues puede suceder que algunas mediciones contengan errores dando un valor negativo a pesar de encontrarse en la fase de crecimiento exponencial, o en forma inversa considerar un punto de medición con aparente crecimiento pero que ya se encuentre en la fase de decaimiento. Sin embargo, como los datos que entrega el cliente para el diseño de la siguiente etapa sólo corresponden a un tramo del cultivo realizado, el tramo donde principalmente hay crecimiento celular, el supuesto tomado para definir el intervalo de cálculo se justifica.

El segundo punto guarda relación con el método de regresión empleado. La función “*nlinfit*” de MATLAB permite realizar una regresión no lineal de datos a cualquier función que se defina; en este caso, se definió un polinomio de grado 3 tal como fue realizado en la prueba del método en Excel. Si bien los gráficos realizados en las planillas preliminares mostraron que este tipo de función ajusta correctamente los datos, sería conveniente probar otras opciones que puedan representar no sólo un comportamiento suavizado sino que también aspectos fenomenológicos (aumentos, decaimientos, etc.).

Los resultados de las simulaciones con el ajuste incorporado muestran que el cálculo añadido sólo altera los valores máximos o mínimos de las variables del modelo, pero no su comportamiento a lo largo de la simulación. Analizando las Figuras 4.1, 4.3, 4.2, 4.6, 4.7, 4.8 y las simulaciones completas en los anexos F e G, se extrae que las curvas con composición ajustada presentan la misma trayectoria general que las obtenidas con composición estándar, demostrando que modificar la composición del flujo de aminoácidos para todos los que el controlador no ajusta, no altera ni el funcionamiento de éste ni el modelo dinámico a resolver.

La inclusión del método fue útil de distinta forma para cada etapa de diseño. Si bien en ambas se obtuvo una mayor productividad por célula y un rendimiento sustrato a producto mayor para 13 o más aminoácidos, indicando que el ajuste de composición efectivamente genera un mejor uso de nutrientes en la síntesis de tPA, los resultados de cantidad de bio-producto y disponibilidad de células difieren.

En el caso del diseño preliminar existe un aumento tanto de tPA total como de disponibilidad de células, pero al pasar a la etapa final de diseño este aumento no pudo ser sostenido. Como el aumento de productividad específica en el diseño optimizado no es mucho ( $\sim 8\%$ ), la cantidad de células es la que determina entonces el nivel de tPA que se obtendrá. Pero, como existe una disminución de IVCC, el total de producto disminuye.

Como fue mencionado, lo anterior fenomenológicamente puede explicarse a que las células utilicen los aminoácidos para la síntesis de tPA en lugar del metabolismo energético y de reproducción (lo que explicaría el aumento de productividad específica). Sin embargo, el hecho de que sólo se están generando predicciones y no cultivos experimentales, hace que esta suposición se descarte. Analizando en detalle las concentraciones calculadas en cada etapa, es posible advertir que el cambio es diferente para cada aminoácido con respecto a la composición estándar. Particularmente, para arginina (Arg) en el diseño preliminar se obtiene una concentración mayor que la estandarizada, mientras que en el diseño optimizado la concentración calculada disminuye respecto al estándar. Revisando el modelo dinámico que se resuelve en la plataforma (Anexo C), la tasa de crecimiento depende de varios parámetros, entre ellos la concentración de Arg, como muestra la ecuación 4.2.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_{GLC}}{C_{GLC} + k_{GLC}} \cdot \left( \frac{C_{GLU}}{C_{GLU} + k_{GLU}} + \frac{C_{ARG}}{C_{ARG} + k_{ARG}} \right) \cdot \frac{1}{1 + \left( \frac{C_{LAC}}{k_{i,LAC}} \right)^4} \quad (4.2)$$

Es decir, la concentración de arginina influirá directamente en el crecimiento celular (en la cantidad de células viables disponibles), y por consiguiente en la síntesis de tPA. Así, las concentraciones que se estimen para la alimentación, y cómo se calculen, tendrán un impacto directo en la cantidad de producto a obtener. No obstante, para comprobar si esta disminución en la concentración calculada se debe al cambio en el tipo de reactor en el experimento base o a errores de medición, y así tomar decisiones respecto a modificar el método de ajuste y el modelo dinámico, es menester contar con los triplicados que nominalmente se deben desarrollar en el proyecto. Con ellos, será posible descartar la posibilidad de que haya errores de medición que subestimen la concentración necesaria.

Pese a que los rendimientos obtenidos en ambas predicciones mejoran respecto a la composición estandarizada, considerar esto como un resultado netamente positivo implica un sesgo considerable. El ajuste de composición del medio a alimentar se realiza empleando los datos experimentales en el intervalo donde hay mayor crecimiento celular (fase exponencial), es decir calculando las concentraciones de la alimentación en base a los consumos que responden a una mayor productividad de células que de bio-producto. La búsqueda de una mayor producción de tPA se realiza entonces no mejorando su vía de síntesis, sino que generando las condiciones para que la disponibilidad de células sea mayor, y sólo como efecto

“colateral” los rendimientos mejorarán dado que se ajustan sus alimentaciones en base a lo que efectivamente se consumen (y no a lo que establezca el medio estandarizado). No obstante, los valores obtenidos manifiestan que existe una mejora en el uso de aminoácidos pero que no se está en un óptimo, pudiendo optimizar el cálculo, por ejemplo ajustar considerando otro intervalo de datos (otra fase de cultivo) o incluyendo más de una composición, hecho que se analiza en el siguiente capítulo.

## Capítulo 5

# Modificación de ajuste en el tiempo

Los cultivos celulares pasan por diferentes fases durante su realización. Típicamente, para cultivos bacterianos se identifican cuatro etapas: adaptación (*lag*), crecimiento exponencial, confluencia (o fase “estacionaria”), y muerte. Estas fases son extensibles para cultivos de células eucariontes, como lo muestra la Figura 5.1. Cada una de estas etapas representa un comportamiento metabólico diferente de las células, y por tanto sus requerimientos nutricionales y ambientales también varían, al tener cada fase un “objetivo” distinto (replicación celular, generación de metabolitos secundarios, mantención, entre otros).

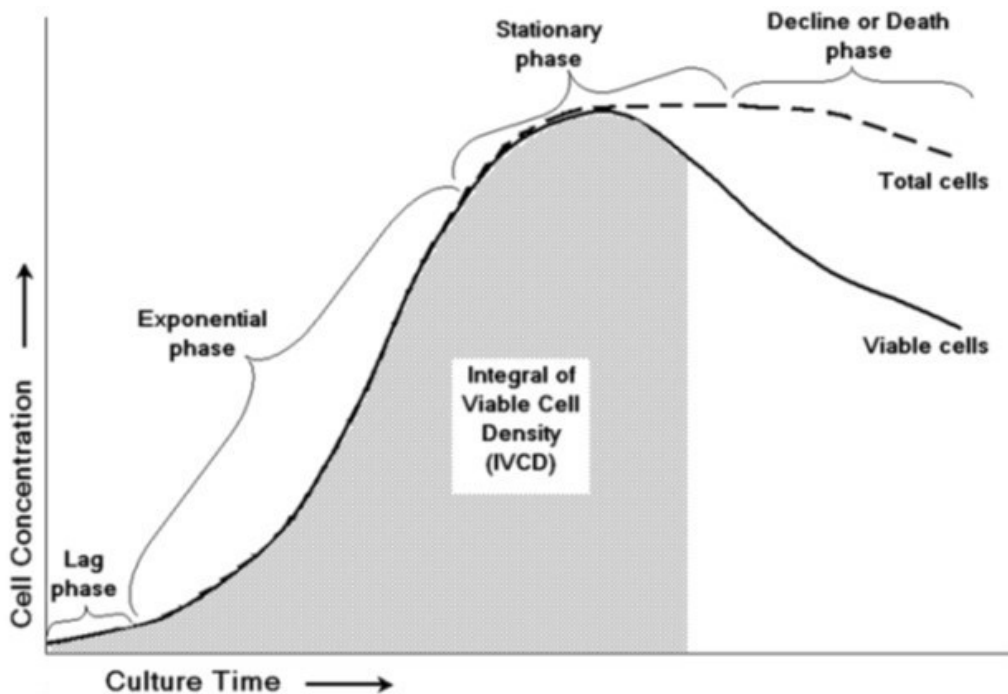


Figura 5.1: Curva típica de biomasa, o también conocida como curva de crecimiento celular. Se presentan las células viables (línea continua) y biomasa total (línea punteada) como función del tiempo. Las fases del cultivo se muestran con corchetes, además de presentar gráficamente el parámetro IVCC (IVCD en la figura). [21]

En el contexto del proyecto, estos diferentes requerimientos pueden satisfacerse modificando cuánto se alimenta de cada nutriente durante su realización. Efectuar cambios en la composición de la alimentación más de una vez durante el cultivo, y no sólo calcularla antes de desarrollarlo, puede realizarse de dos formas. La primera, es utilizar los datos del mismo cultivo que se esté realizando para ir ajustando la cantidad de nutrientes a alimentar, es decir un ajuste “en tiempo real”. La segunda, en cambio, es realizar un método puramente predictivo, determinando diferentes concentraciones para la alimentación en base a datos experimentales de cultivos anteriores, una especie de *Data-Mining*.

Como fue descrito en la sección 3.3, el primer caso se escapa de las pretensiones de un método predictivo como el del proyecto, y ajustar la composición en tiempo real pasa a ser un sistema de control más que un diseño de cultivo. Aquí, es necesario un software o sistema de diseño automatizado que permita adecuar la composición en base a los cambios de consumo de cada nutriente, es decir una plataforma que incluya *Machine Learning* y respuesta inmediata. Y no sólo eso, sino que el cultivo en sí requiere de un sistema de control y adecuación complejo: sensores para cada nutriente, y un control de bombas por nutriente (y no sólo para dos flujos) que responda a los cambios que indique el software. Así, implementar esta metodología no se acoplaría correctamente a la plataforma creada, sino que implica un nuevo sistema de diseño, totalmente diferente.

El segundo caso, por su parte, no implica el análisis de datos en tiempo real ni sistemas de diseño y control automatizados. Basta con analizar datos experimentales de un cultivo anterior (cultivo base) y a partir de él obtener los consumos efectivos en las diferentes fases de crecimiento. Como el consumo de los nutrientes no será constante a lo largo del cultivo, es posible analizar “por tramos” y estimar una composición de alimentación diferente para cada tramo, ya sea en forma continua o discreta. Además, como se verá a lo largo de este capítulo, esta metodología de ajuste a partir de datos anteriores en más de un instante del cultivo es compatible con el método de *ratios* estequiométricos.

## 5.1. Metodología específica

A continuación se presentan los pasos seguidos para analizar e implementar posibles cambios de composición en la alimentación durante el cultivo.

- Determinación de instantes de cambio de composición a lo largo del cultivo, mediante análisis de los datos experimentales en las planillas Excel generadas anteriormente.
- Estructuración del método de ajuste de *ratios* para más de un cambio de composición en el cultivo, en MATLAB <sup>®</sup>.
- Ejecución del programa para la etapa de cultivo fed-batch preliminar, testeando distintos instantes de cambio.
- Ejecución del programa para la etapa de cultivo fed-batch optimizado, testeando distintos instantes de cambio.
- Análisis de resultados obtenidos, comparando las simulaciones con los diferentes cambios de composición en cada etapa.

## 5.2. Determinación de momentos de cambio

Como fue descrito en el capítulo 3, el análisis de datos experimentales según el método de Umulis y Hu en Microsoft Excel permite no sólo obtener los *ratios* estequiométricos, sino que también es posible determinar comportamientos del cultivo y tendencias de consumo. Además, los *ratios* pueden calcularse en diferentes intervalos, pudiendo encontrar distintas relaciones de consumo de aminoácidos respecto a la referencia, en respuesta a las necesidades en cada fase. Así, incluir estos cálculos en diferentes tramos haría posible realizar el diseño con una alimentación variable no sólo en flujo sino que también en composición.

En términos de la plataforma y del modelo matemático, este ajuste de composición múltiple implica dividir el diseño de cultivo en partes, y para cada una de ellas calcular una composición diferente basándose en los datos experimentales de ese tramo. Luego, todas estas “partes” se acoplan en un único diseño con una alimentación variante en flujo y composición, buscando aumentar su productividad al agregar la cantidad de aminoácidos necesaria para cada fase.

El problema se genera al surgir la siguiente pregunta: ¿dónde se debe “cortar” la simulación y recalcularse la composición? La respuesta es que los instantes de cambio deben corresponder a una modificación en el comportamiento del cultivo. Por ejemplo, agotamiento de algún nutriente (o una serie de nutrientes), *shifts* metabólicos, inducción de producción de algún metabolito (en el caso de ser necesario), cambio en la tasa de producción de biomasa, etc. Pero, para generar el recálculo en esos instantes particulares, primero se deben detectar en el cultivo, lo cual en algunos casos no es algo intuitivo.

Identificar los instantes donde se debe modificar la composición del medio a alimentar requiere entonces un análisis segmentado, con las siguientes etapas:

1. Análisis de datos experimentales, visualmente a partir de las planillas Excel desarrolladas.
2. Identificación de instantes de quiebre en el comportamiento del cultivo, de acuerdo con cambios en diferentes parámetros.
3. Selección del parámetro que defina el instante de cambio.
4. Selección del número de ajustes a realizar en el cultivo.

### Análisis de datos experimentales (batch y fed-batch)

Utilizando las pruebas del método de *ratios* estequiométricos desarrolladas en Excel, específicamente las curvas cinéticas que representan gráficamente las concentraciones medidas y tasas específicas con datos consecutivos, es posible advertir cambios en los consumos o producciones de cada nutriente alimentado en los cultivos realizados para el proyecto. Las Tablas H.1 y H.2 presentes en el Anexo H muestran un resumen del comportamiento de cada nutriente que puede ser alimentado en ambos cultivos: batch y fed-batch preliminar, respectivamente.



## Identificación de puntos de interés y parámetros que definen cambios

A partir de estos análisis y de los gráficos de biomasa total de cada cultivo, es posible deducir los comportamientos presentados en la Tabla 5.1. De acuerdo con ello, existen tres puntos de relevancia en el cultivo (independiente el tipo de reactor): comienzo del crecimiento exponencial, estado pseudo-estacionario (PSS) de consumo de aminoácidos, y decaimiento celular.

Tabla 5.1: Análisis de comportamiento de los cultivos desarrollados en laboratorio, anteriores al ajuste de composición.

<b>Fenómenos del cultivo</b>	<b>Batch</b>	<b>Fed-batch preliminar</b>
Duración fase exponencial	45 - 110 horas	60 - 135 horas
Inicio decaimiento celular	165 horas	160 horas
Cambio de signo de $\mu$	165 horas	140 horas
Estabilización de concentración de aminoácidos	100 horas	90 horas
Cambio en $q_s$ para 10 o más aminoácidos	70 horas	80 horas

El primer hito de cambio está dado por el aumento de la tasa específica de crecimiento, así como también del consumo o producción de los aminoácidos. El segundo, por su parte, implica que estos consumos o producciones ya no se realizan a la misma tasa, sea porque se están alimentando al mismo flujo que se consumen o porque ya no ven alterada su concentración (en el caso de un reactor batch). Esto, entonces, se vería representado en un cambio de signo de las tasas específicas de consumo ( $q_s$ ), o bien la obtención de un valor constante en el tiempo. Y el tercero hace referencia a la disminución de células viables dentro del cultivo, lo cual se representa por un cambio de signo en la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ).

## Selección del número de cambios de composición en la alimentación

Como fue mencionado previamente, una modificación en tiempo real de la composición de la alimentación es infactible, pues requiere un sistema de control de excesiva complejidad. Pero esta infactibilidad de un gran número de cambios de composición también se genera en el ajuste “por tramos”.

Diferentes composiciones en distintos intervalos del cultivo implica tener diferentes medios de cultivo disponibles, cada uno con la composición calculada para el tramo. Pero, en términos prácticos, contar con un stock de 5 o más medios de cultivo requiere muchos insumos y un tiempo de preparación considerable, o en el caso de realizarlos en tiempo real un sistema de una bomba por aminoácido. Por tanto, se consideró como cota máxima 4 instantes de cambios, para obtener máximo 5 composiciones diferentes.

No obstante, los análisis anteriores muestran que sólo hay 2 instantes que trascienden entre los cultivos: el *shift* metabólico de consumo/acumulación de aminoácidos (estado pseudo-estacionario), y el *shift* de concentración de biomasa viable. El inicio del crecimiento exponencial se desestima debido a que para las primeras fases del cultivo (adaptación y

exponencial) se considera una sola composición. Así, se debe calcular la composición en tres tramos: inicio, cambio de signo de las tasas de consumo, y decaimiento celular.

### 5.3. Incorporación de reajuste al modelo

La predicción que genera la plataforma de diseño se realiza resolviendo el modelo dinámico en un tiempo de simulación determinado, definido en la sección 4.3. El cálculo de composición con el método de *ratios* para toda la simulación se realiza considerando todos los datos medidos del cultivo experimental base, y filtrando los que poseen crecimiento celular. De esta forma, para calcular la composición de un tramo particular del cultivo basta con realizar el ajuste con los datos experimentales de dicho tramo y no con la totalidad de ellos.

Pero no sólo es necesario aplicar la función de ajuste en el código principal para varios tramos de datos, sino que también la simulación debe ser segmentada en los mismos intervalos para aplicar cada composición en el tramo correspondiente. Los puntos en los que se debe detener la simulación corresponderán entonces a los instantes definidos en la sección anterior, es decir: inicio de estado pseudo-estacionario, y decaimiento celular.

Sin embargo, en el código computacional definir estos puntos de detención y que sean independientes de los datos experimentales de entrada, es decir que el código sea capaz de identificar en forma autónoma estos instantes, requiere una modificación que no logró ser desarrollada en los tiempos de este trabajo. Por lo tanto, utilizando los tiempos señalados en la Tabla 5.1 se decidió detener y reiniciar la simulación manualmente, aplicando ajuste de composición en cada reinicio. De esta forma, se obtuvo para cada etapa de diseño los intervalos mostrados en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2: Intervalos de tiempo definidos para realizar el diseño de cultivos por tramos.

Intervalos teóricos	Fed-batch no optimizado	Fed-batch optimizado
Inicio (adaptación + exponencial)	$t_i \in (0, 90)$ [h]	$t_i \in (0, 80)$ [h]
Fase pseudo-estacionaria	$t_i \in (90, 140)$ [h]	$t_i \in (80, 135)$ [h]
Decaimiento celular	$t_i \in (140, t_{end})$ [h]	$t_i \in (135, t_{end})$ [h]

La segmentación de la simulación en el programa se traduce en replicarla en el código tantas veces como tramos se generen, y en cada repetición considerar los datos experimentales sólo del tramo correspondiente. Finalmente, los datos de cada simulación deben acoplarse en vectores únicos que representen la totalidad del cultivo, de manera de generar las aproximaciones para el uso de bombas en el cultivo real y lograr visualizar completamente la predicción.

## 5.4. Ajuste 1: diseño de cultivo fed-batch

Tanto en este testeo como en el del cultivo optimizado se realizaron simulaciones y análisis según la siguiente secuencia lógica de avance:

- Iteración 0: un sólo ajuste de composición (capítulo 4 del presente trabajo).
- Iteración 1: dos ajustes de composición, uno al inicio y otro en el comienzo del estado pseudo-estacionario teórico.
- Iteración 2: dos ajustes de composición, uno al inicio y otro en el comienzo del decaimiento celular teórico.
- Iteración 3: tres ajustes de composición, uno al inicio y los otros en cada punto de interés en el cultivo.

Sin embargo, en ninguno de los casos fue posible realizar la iteración 3, situación que se ahonda más adelante en la sección 5.6.

Para el diseño de fed-batch no optimizado, tanto en la iteración 1 como en la iteración 2 no fue posible obtener flujos factibles en el rango de las bombas sin incluir un factor de dilución (en ninguno de los tramos). Por lo tanto, se utilizó la misma configuración que en la iteración 0 de esta etapa, es decir un factor de dilución de 10 para la glucosa y 3 para el flujo de aminoácidos, también con pulsos cada 8 horas y extensión de 1 minuto. Los resultados de cantidad de producto, productividad específica y cantidad de células viables para las iteraciones 0, 1 y 2 con el mismo tiempo de simulación (270 horas) se presentan en la Tabla 5.3, mientras que los gráficos de las simulaciones pueden ser consultados en el Anexo I.

Tabla 5.3: Resultados de productividad y concentración de células viables para las iteraciones con más de un cambio de composición, en la simulación de cultivo fed-batch no optimizado.

-	Composición ajustada sin cambios	Un cambio a las 90 horas	Un cambio a las 140 horas
Producto acumulado [mg]	801,9	758,8	753,7
$q_P$ [ $mg \cdot L/cell \cdot h$ ]	$5,21 \cdot 10^{-9}$	$5,15 \cdot 10^{-9}$	$5,11 \cdot 10^{-9}$
$IVCC_f$ [ $cells \cdot h/L$ ]	$1,27 \cdot 10^{11}$	$1,22 \cdot 10^{11}$	$1,22 \cdot 10^{11}$

En contraste con un único ajuste de composición, incluir un segundo cambio durante el cultivo disminuye la producción predicha tanto de tPA como de células viables, con reducciones de un 6 y un 4% respectivamente, en ambos cambios intermedios. Dado que las disminuciones son prácticamente iguales en magnitud, y sumado a que la productividad específica también decae un 2% en comparación a ajustar la composición sólo al inicio, se infiere que la menor producción de tPA se debe a que se sintetizan menos células, pues la productividad por célula no cambia significativamente.

Esta reducción en la productividad que predice la plataforma también se ve reflejada en el rendimiento de cada aminoácido en cada escenario, como muestra la Figura 5.2. Sólo para 4 aminoácidos (Glu, Gly, Phe y Tyr) el rendimiento respecto a la síntesis de tPA es mayor al tener más de un cambio de composición, sin embargo en ninguno de estos nutrientes

el aumento es significativo. En contraste, 5 aminoácidos (Pro, His, Val, Met y Cys) ven una reducción considerable en su rendimiento (entre 25 y 65 %) si se incluye un cambio de composición durante el cultivo. Así, ajustar la composición del medio a alimentar más de una vez durante el cultivo no optimizado, y no sólo modificarla en comparación a un medio estándar, disminuiría tanto la síntesis de producto como también el uso de cada aminoácido en esta producción.

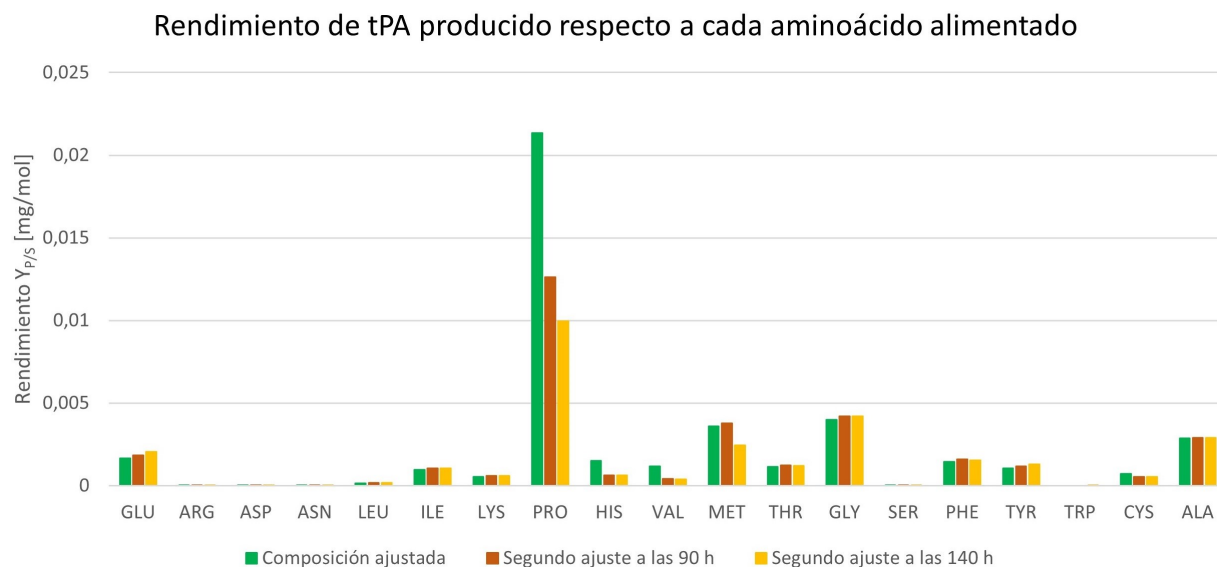


Figura 5.2: Rendimiento sustrato a producto ( $Y_{P/S}$ ) de cada aminoácido alimentado, para más de un ajuste de composición en el diseño de cultivo fed-batch no optimizado. Para arginina, asparatato, asparragina y triptofano no se aprecian valores, lo que se traduce en la menor influencia que tienen estos aminoácidos en la generación de tPA.

Las Figuras 5.3 y 5.4 presentan las composiciones calculadas para las iteraciones 1 y 2 del diseño con más de un cambio durante el cultivo. Independiente de dónde se genere el cambio de composición (estado pseudo-estacionario o inicio del decaimiento celular del cultivo previo), algunos comportamientos persisten: prolina mantiene su decrecimiento considerable para el segundo tramo, tirosina permanece con la misma concentración, y la concentración nula se mantiene en ambos tramos y ambas configuraciones para Ile, Lys, Gly, Trp y Ala.

Sin embargo, modificar la composición de la alimentación en un instante u otro genera, como era de esperar, la necesidad de diferentes aminoácidos. Para el cambio a las 90 horas, se requiere una alta cantidad de Thr (99 [mM]) en el primer tramo, así como también cantidades de Phe en ambos tramos (10,7 y 0,4 [mM]), Asp en el primer tramo (5,9 [mM]) y Met sólo en el segundo (29,4 [mM]). En contraste, cuando el cambio se realiza a las 140 horas, no se incluye Thr ni Phe en la alimentación, la cantidad de Asp es menor y sólo existe en el segundo tramo (0,4 [mM]), y Met se incluye en ambos tramos (28,1 y 15,5 [mM]). Además, reajustar la alimentación en el instante donde la la cantidad de células comienza a decaer añade la necesidad de otros aminoácidos en el primer tramo (donde hay crecimiento): Arg, His y Val, con concentraciones de 12,4, 8,3 y 7,3 [mM] respectivamente.

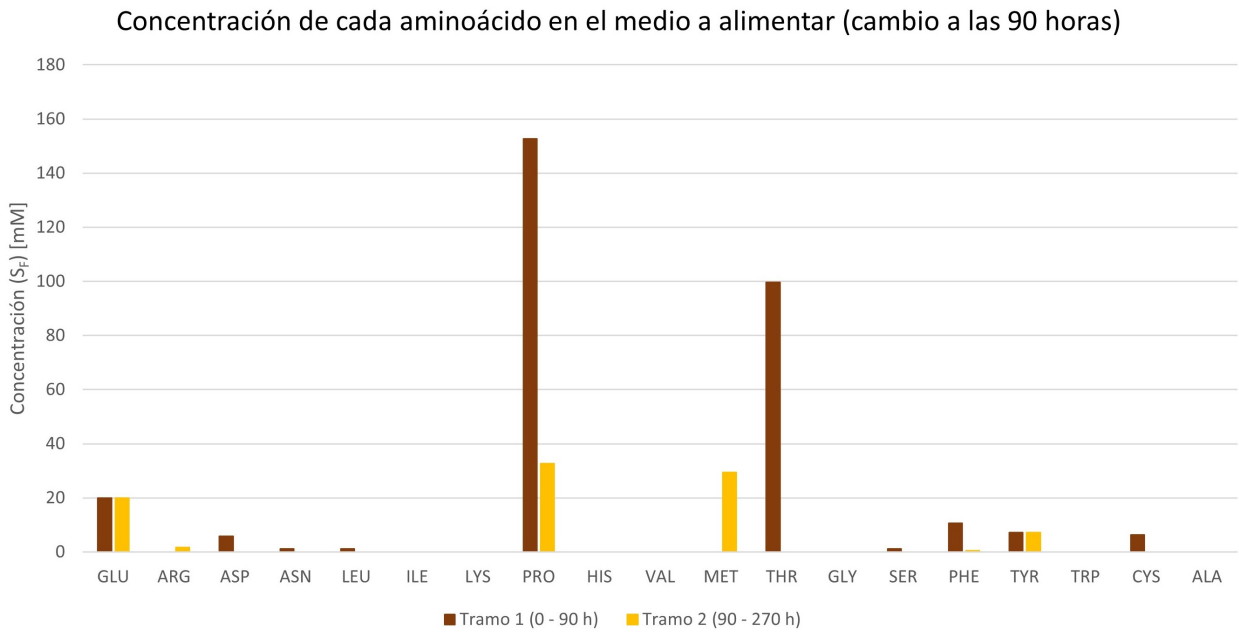


Figura 5.3: Composición del medio a alimentar por tramos, considerando un segundo cambio a las 90 [h] en el diseño de cultivo fed-batch no optimizado. La ausencia de rectángulos implican una concentración nula.

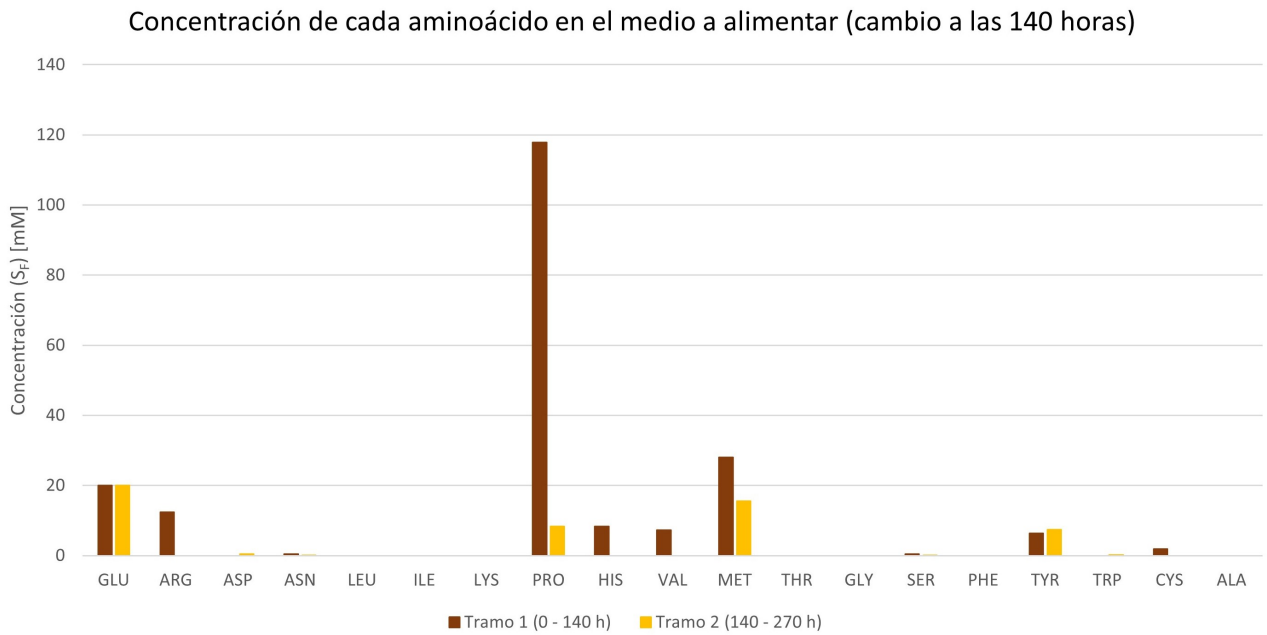


Figura 5.4: Composición del medio a alimentar por tramos, considerando un segundo cambio a las 140 [h] en el diseño de cultivo fed-batch no optimizado. La ausencia de rectángulos implican una concentración nula.

Pese a que a priori incluir estas modificaciones en el diseño del cultivo no optimizado no genera un aumento de productividad, cabe señalar que las concentraciones calculadas para ambas iteraciones son factibles de obtener en un medio líquido. Como se mencionó en el capítulo 4, Pro posee un límite de solubilidad de 14,2 [M], y entre ambos escenarios la máxima concentración necesaria es 0,15 [mM]. Asimismo, a pesar de que el cambio a las 90 horas requiere una concentración de 99 [mM] de Thr en el primer tramo, su límite de solubilidad es 719 [mM] a 20°C [40].

## 5.5. Ajuste 2: optimización del diseño fed-batch

Para el diseño final a implementar por parte del cliente, o diseño optimizado, también se realizaron dos iteraciones con ajustes durante el cultivo: una con cambio a las 85 horas (estado pseudo-estacionario), y otra con cambio a las 135 horas (inicio de decaimiento celular en el cultivo base).

Al igual que en la iteración 0 (sección 4.4), la composición calculada en esta etapa considerando ajustes durante el cultivo, permitió obtener flujos factibles en el rango de las bombas sin dilución en la alimentación de aminoácidos, mientras que en el flujo de glucosa sí se necesita diluirla 2 veces. Sin embargo, a diferencia de la iteración 0 la factibilidad se logró sólo con pulsos cada 12 horas y 1 minutos de duración. Las predicciones para cantidad de producto, productividad específica y disponibilidad de células viables para las iteraciones 0,1 y 2 de esta etapa de diseño se muestran en la Tabla 5.4, mientras que los gráficos de las simulaciones se presentan en el Anexo J. El tiempo de simulación fue de 460 horas para las tres configuraciones.

Tabla 5.4: Resultados de productividad y concentración de células viables para las iteraciones con más de un cambio de composición, en la simulación de cultivo fed-batch optimizado.

-	Composición ajustada sin cambios	Un cambio a las 85 horas	Un cambio a las 135 horas
Producto acumulado [mg]	878	1.059	1.134
$q_P$ [ $mg \cdot L/cell \cdot h$ ]	$1,46 \cdot 10^{-9}$	$1,45 \cdot 10^{-9}$	$1,41 \cdot 10^{-9}$
$IVCC_f$ [ $cells \cdot h/L$ ]	$3,28 \cdot 10^{11}$	$3,95 \cdot 10^{11}$	$4,27 \cdot 10^{11}$

Un cambio de composición adicional, en un punto intermedio del cultivo, aumenta las cantidades de tPA y de células viables predichas para el diseño optimizado. En el reajuste a las 85 horas, la síntesis de bio-producto se ve incrementada un 21 % y la disponibilidad de células un 20 %; cuando la composición se modifica a las 135 horas, los aumentos son de 29 y 30 % respectivamente. Si bien la productividad por célula no presenta el mismo comportamiento, incluso hay una disminución con respecto al uso de una única composición durante todo el cultivo, las reducciones son sólo de 1 y 3 %.

Estas mejoras no sólo se obtienen en la cantidad de tPA sintetizada, sino que también se reflejan en el rendimiento de cada aminoácido. En 12 de los 19 aminoácidos incluidos en la alimentación el rendimiento mejora con uno, otro o ambos reajustes, y en los 12 el

recálculo a las 135 horas (inicio del decaimiento celular) presenta el mejor rendimiento. Estos incrementos son incluso de 230 veces (Leu) con respecto al rendimiento con una única composición ajustada, mejorando considerablemente el uso de aminoácidos en la producción de tPA. En comparación, para los otros 7 aminoácidos (Glu, Met, Thr, Gly, Ser, Trp y Ala) donde el rendimiento es mayor con una única composición en la alimentación, los aumentos no superan las 10 veces y son los aminoácidos que menor rendimiento poseen.

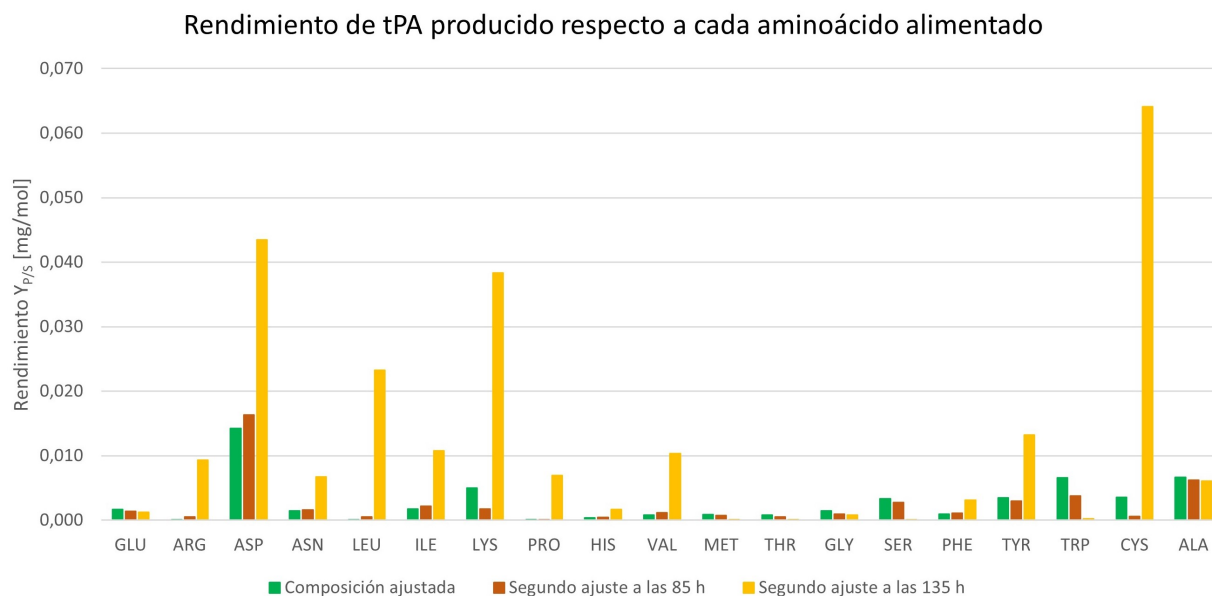


Figura 5.5: Rendimiento sustrato a producto ( $Y_{P/S}$ ) de cada aminoácido alimentado, para más de un ajuste de composición en el diseño de cultivo fed-batch optimizado. Para arginina, asparatato, asparragina y triptofano no se aprecian valores, lo que se traduce en la menor influencia que tienen estos aminoácidos en la generación de tPA.

En las Figuras 5.6 y 5.7 se presentan las concentraciones calculadas para las iteraciones 1 y 2 del diseño con más de un cambio de composición, para el cultivo optimizado. Para 9 aminoácidos el comportamiento es similar en ambas configuraciones: Gln presenta la misma concentración en los dos tramos, lo cual responde al hecho de que es el aminoácido que el modelo ajusta (nutriente crítico); mientras que para Arg, Asp, Asn, Leu, Ile, Pro, Val y Phe es necesaria una mayor concentración en el segundo tramo.

No obstante, el comportamiento para Lys, His, Met, Thr, Ser, Glu y Cys difiere entre un reajuste y otro. Para Met y Cys la concentración nula cambia de un tramo a otro al recalcular la composición en instante diferentes, mientras que Thr y Ser sólo se alimentan cuando el reajuste es al comienzo del estado pseudo-estacionario (85 horas). Lys pasa de necesitarse en ambos tramos a sólo requerirlo en el segundo tramo en la configuración de cambio a las 135 horas, e His ve traspuesta su mayor concentración en la alimentación entre las diferentes iteraciones. La variación de mayor relevancia ocurre al calcular la concentración de Glu en la alimentación, pues al ajustar una segunda vez a las 85 horas genera una necesidad de Glu altísima en contraste con lo requerido si el cálculo es a las 135 horas, donde sólo se requiere Glu en el primer tramo y con una concentración mucho menor (10,1 vs 139,7 [mM]). Así, de igual forma que el diseño preliminar, generar una predicción del cultivo fed-batch con

cambios no sólo en el flujo de aminoácidos alimentado sino que también en la composición de éste, muestra que para diferentes intervalos del cultivo los requerimientos nutricionales serían distintos, pues la concentración necesaria de cada aminoácido cambia entre tramos y entre diseños mismos.

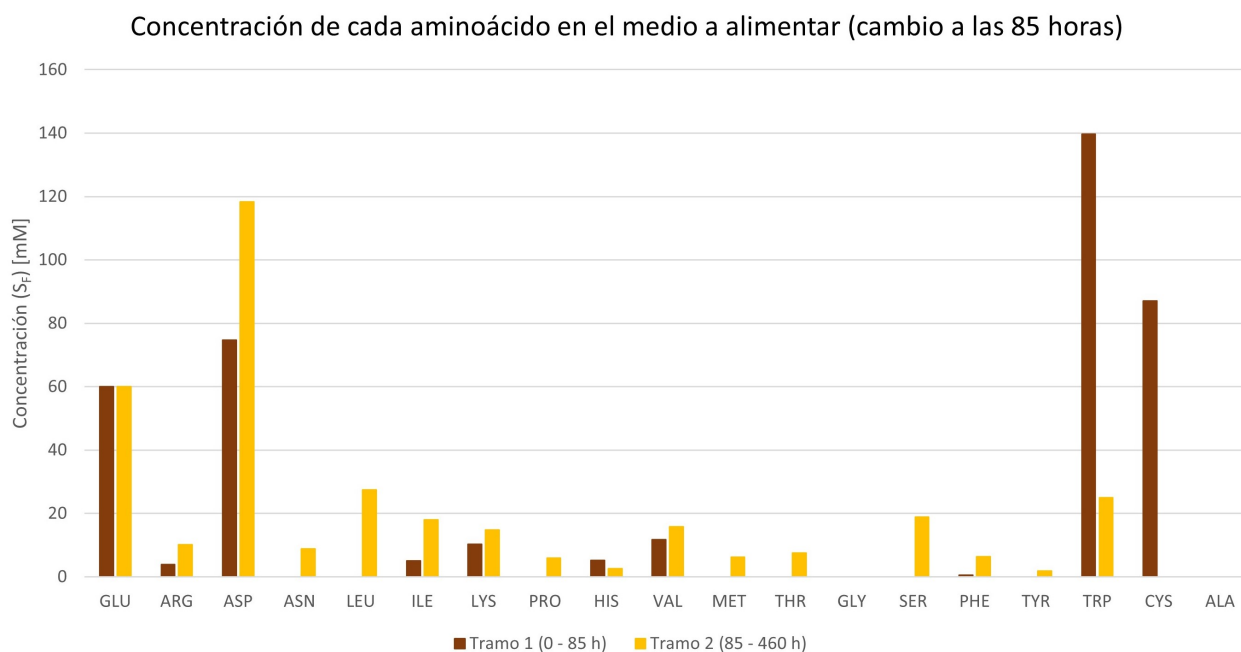


Figura 5.6: Composición del medio a alimentar por tramos, considerando un segundo cambio a las 85 [h] en el diseño de cultivo fed-batch optimizado. La ausencia de rectángulos implican una concentración nula.

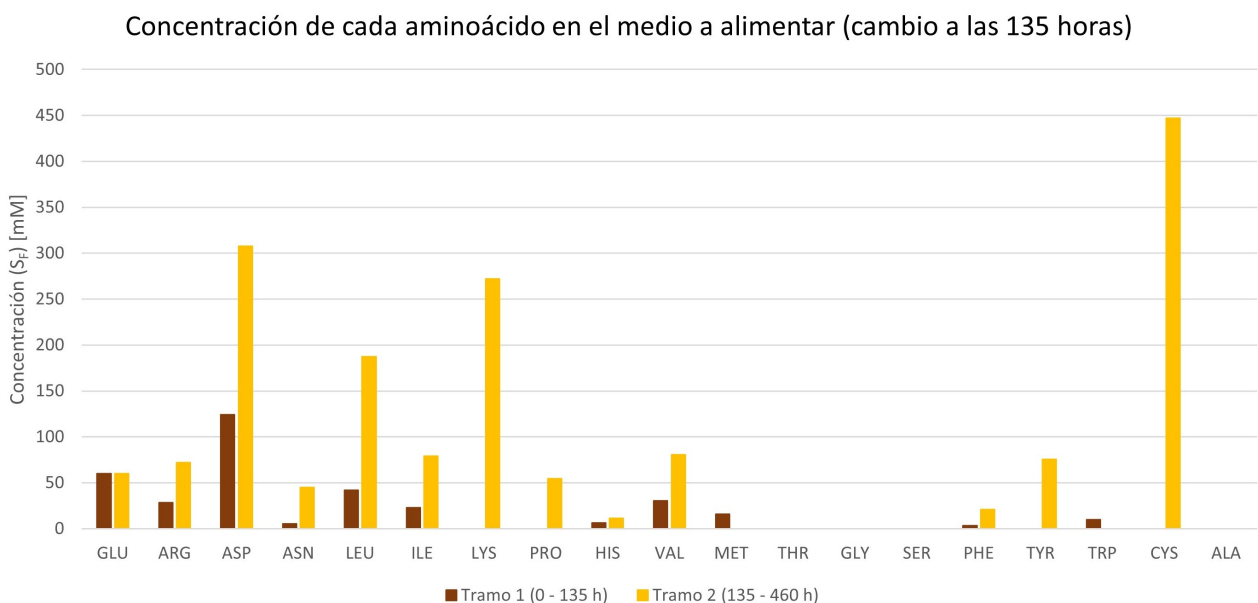


Figura 5.7: Composición del medio a alimentar por tramos, considerando un segundo cambio a las 135 [h] en el diseño de cultivo fed-batch optimizado. La ausencia de rectángulos implican una concentración nula.



Los resultados de alterar la composición de la alimentación en un punto intermedio del cultivo son positivos en el diseño final, al menos en lo referido a producción de tPA y disponibilidad de células viables. Sin embargo, las predicciones generadas por la plataforma en esta etapa presentan dos dificultades. En primer lugar, algunas concentraciones calculadas no son factibles de realizar en laboratorio: Para la iteración 1 se requiere una concentración de Glu de 139,7 [mM] en el primer tramo, pero su límite de solubilidad en solitario es de 75,4 [mM] a 25°C [41]. De forma similar, en la iteración 2 se requiere una concentración de Asp en el segundo tramo 1,4 veces mayor a su límite de solubilidad (307,8 vs 220 [mM]); para Leu, la concentración necesaria en el segundo tramo es 1,15 veces su límite (187,3 vs 164 [mM] a 25°C [42]); y Cys debe incorporarse en una concentración 2 veces mayor a su límite de solubilidad en el segundo tramo (447 vs 228 [mM]).

En segundo lugar, la sensibilidad del modelo matemático desarrollado se ve comprometida si se incluye un ajuste de composición intermedio. Esto guarda relación principalmente con el hecho de fraccionar la simulación, y por tanto resolver el modelo cinético-dinámico con “diferentes” datos experimentales como base. Como se observa en las Figuras 5.8 e 5.9, cortar la resolución del sistema para obtener la predicción genera que los nutrientes críticos no puedan ser ajustados adecuadamente.

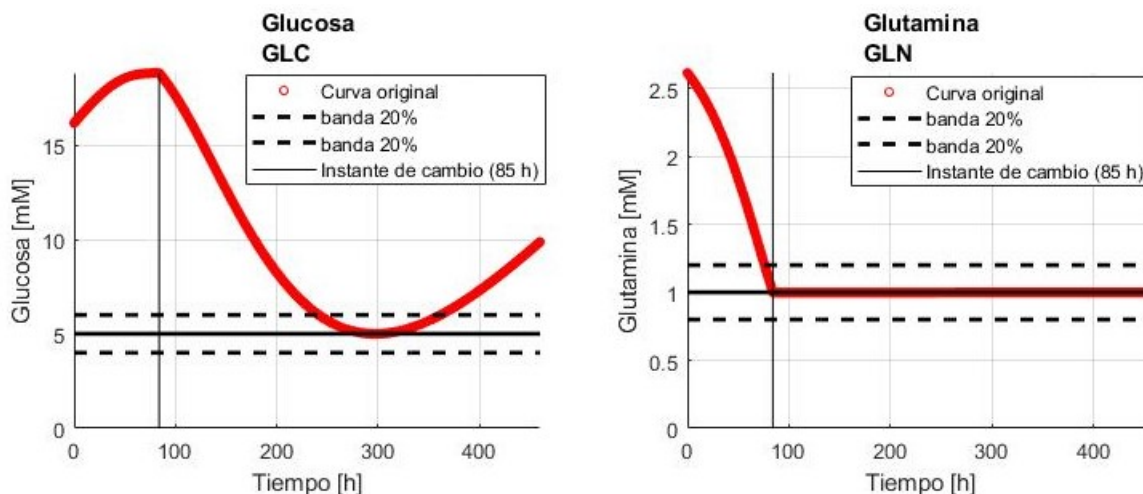


Figura 5.8: Predicción de la trayectoria de los nutrientes críticos (glucosa y glutamina), en el diseño de cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas (iteración 1).

El cambio de composición al inicio del decaimiento celular del cultivo base (135 horas), pese a generar una variación en la trayectoria de los nutrientes, permite mantener las concentraciones de ambos dentro del rango de tolerancia de 20% respecto al *setpoint*. No obstante, el cambio a las 85 horas provoca un desajuste total en el control de glucosa, pues la trayectoria que se aprecia en la Figura 5.8 difiere completamente de la trayectoria esperada (por ejemplo, la de glutamina en la misma figura). No sólo no se llega al *setpoint* hasta un instante muy posterior en comparación a la predicción obtenida en la iteración 2, sino que luego la concentración vuelve a diverger. Además, al inicio del cultivo se añade glucosa, aumentando su concentración y alejándose del valor seteado. Es decir, el controlador

incorporado no logra cumplir su objetivo, pues no hay mantención de una concentración fija y hay desplazamiento de la curva, esto último debido principalmente a que la resolución obtenida considera la incorporación de glucosa desde el tiempo 0.

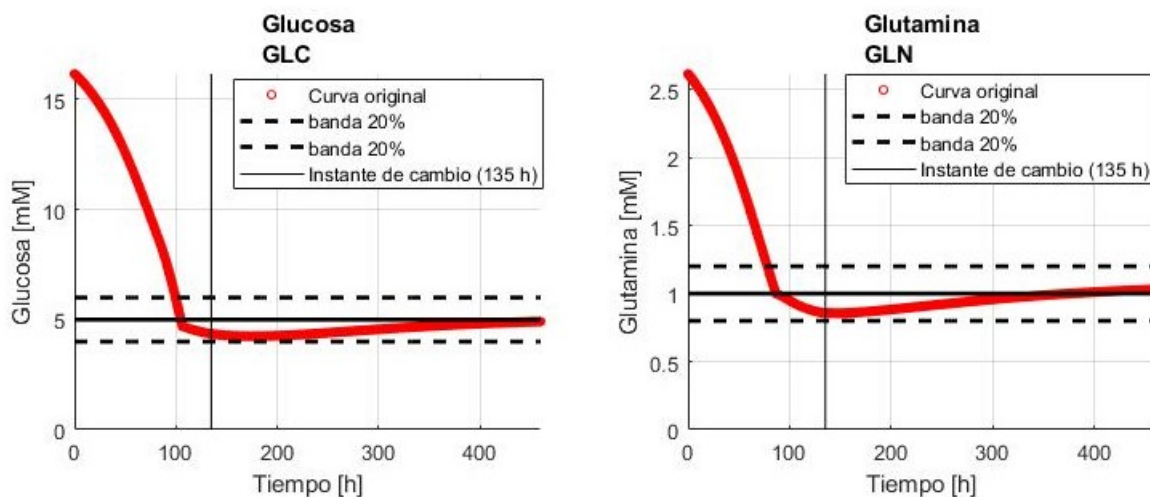


Figura 5.9: Predicción de la trayectoria de los nutrientes críticos (glucosa y glutamina), en el diseño de cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas (iteración 2).

Para corroborar estas anomalías, se realizó otra simulación con ajuste intermedio, esta vez con el siguiente punto de medición con respecto al decaimiento celular como instante de cambio (160 horas). La Figura 5.10 presenta las trayectorias obtenidas, donde se aprecia nuevamente que no fue posible mantener la concentración deseada en ninguno de los nutrientes. Este comportamiento, sumado a los obtenidos en el diseño de cultivo preliminar (Anexo I), confirman que el modelo definido con una resolución “por tramos” es sensible al punto experimental que se defina como instante de reajuste de composición.

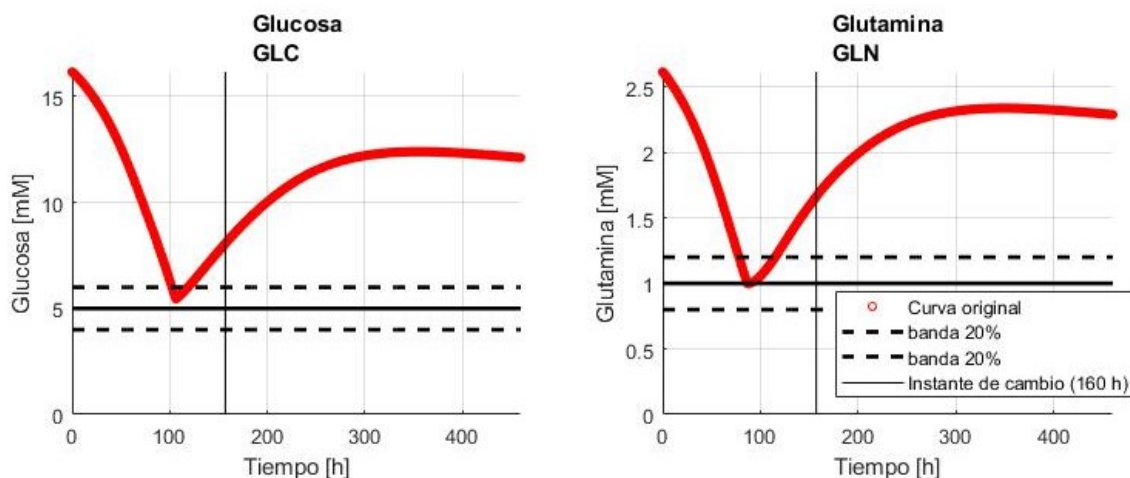


Figura 5.10: Predicción de la trayectoria de los nutrientes críticos (glucosa y glutamina), en el diseño de cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 160 horas.

## 5.6. Discusión

En este capítulo fue posible desarrollar una estrategia para cambiar la composición del medio a alimentar en un punto intermedio de la simulación, obteniendo una predicción que intenta responder a las diferentes necesidades nutricionales del cultivo. La metodología se basó únicamente en detener la resolución del modelo dinámico y continuarla con una nueva composición en la alimentación de aminoácidos, utilizando para el sistema los parámetros finales obtenidos en el tramo anterior.

Esto, como demostraron las Figuras 5.8, 5.9 y 5.10, genera dificultades en el sistema de control. Pausar la resolución del modelo y reiniciarla implica obtener parámetros “óptimos” más de una vez, o dicho de otro modo se resuelve más de un sistema dinámico, cada uno con parámetros de entrada diferentes y óptimos distintos. Este hecho, sumado a la relativa simpleza del controlador escogido para la plataforma (control PI para sólo mantener constantes dos concentraciones), generan una predicción donde no es posible llegar al *setpoint* [43]. Si bien para algunos casos las concentraciones críticas se mantienen dentro del rango de tolerancia, que el controlador sea sensible al punto de detención de la simulación hace poco factible la aplicación del método tal como fue definido.

Esta problemática, junto con la escasez de tiempo, fueron los motivos de que no se realizase la iteración 3 en ninguna de las etapas. Si sólo con un cambio de composición intermedio hace que el sistema diverja, incluir un segundo y generando de esta forma 3 tramos de simulación haría que el sistema entregue una predicción infactible.

Los resultados obtenidos, no obstante, indican que es posible incorporar un segundo ajuste de composición a la simulación, dependiendo del punto en que ésta se detenga. En la etapa de diseño optimizado es donde más se refleja esto, pues si se considera un punto particular es posible mantener relativamente constantes ambos *setpoints* y obtener una productividad mucho más alta (30%). A partir de ello, se deduce que el método de ajuste podría ser aplicado, pero que son necesarias otras modificaciones en la simulación para un correcto funcionamiento.

Dentro de estos cambios, la aplicación del método de ajuste es fundamental. Calcular la composición de la alimentación más de una vez durante la resolución del modelo dinámico implicó sólo detener la simulación, aplicando el método de ajuste en cada reinicio sin ninguna modificación a éste. Al no alterar la función de ajuste desarrollada, se mantiene la selección de un intervalo particular para el cálculo: los datos donde hay crecimiento (es decir, donde  $\mu \geq 0$ ). Pero que esto persista genera que en tramos donde no haya aumento de células viables o sólo en una parte del intervalo, se estén considerando menos datos. Dado que se busca calcular la composición necesaria para ese tramo, independiente si hay o no crecimiento, se está generando un sesgo que no evita cumplir con el objetivo planteado. Para que la composición calculada realmente represente las necesidades del cultivo en dicha fase, se hace necesario modificar el ajuste y eliminar la búsqueda del intervalo de cálculo, o de lo contrario se subestimarán los resultados para esta línea celular o cualquier otra.

Otro punto a resaltar es que, al igual que en la implementación inicial del método de ajuste (capítulo 4), los resultados difieren entre el diseño preliminar y el optimizado. Pero

en este caso el cambio es inverso, pues en el diseño no optimizado las iteraciones 1 y 2 obtienen productividades menores, mientras que en el optimizado incorporar un segundo cambio incrementa la producción de células y de tPA. Aquí nuevamente resalta el cálculo para los aminoácidos involucrados en el crecimiento celular, puesto que se obtiene un rendimiento mayor de Arg al incorporar un segundo ajuste en el diseño optimizado (no así en el diseño preliminar), reforzando el hecho de que las concentraciones que más afectan el desempeño de la predicción (y por lo tanto, del cultivo), son las consideradas en el cálculo de la tasa de crecimiento.

Los resultados tanto de la implementación del método de cálculo en varios puntos como de las simulaciones obtenidas muestran, entonces, que utilizar más de una concentración de aminoácidos en la alimentación de los cultivos podría mejorar la productividad. Sin embargo, el desarrollo actual no permite obtener una mejora adecuada en miras de cumplir este objetivo. La escasez de tiempo para elaborar otra estrategia, más automatizada y computacional (y menos manual y analítica), mermó en gran medida los resultados. En particular, si fuese posible corregir no sólo las funciones de ajuste como fue mencionado sino que también la estrategia de selección de instantes de cambio, permitiría desarrollar la simulación sin cortes que puedan inducir errores. La automatización no necesariamente hace referencia a *Machine Learning*, sino que por ejemplo algunas de las siguientes opciones:

- Identificar decrecimiento celular: instantes donde en los siguientes dos (o más) puntos experimentales haya una tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) negativa.
- PSS para consumos aminoacídicos: instantes donde la tasa específica de consumo/producción de 10 o más aminoácidos cambie, o que en los siguientes dos (o más) puntos el valor no cambie significativamente. Sería conveniente incluir un rango de tolerancia.

Si bien el desarrollo computacional de ello puede ser un poco más extenso, dado que requiere calcular las tasas en puntos consecutivos e ir analizando punto por punto en el mismo modelo, sería un primer apronte a identificar los instantes de cambios en la misma plataforma.

## Capítulo 6

# Discusión y consideraciones finales

La implementación del ajuste de composición mediante *ratios* estequiométricos en la plataforma de diseño de cultivo presentó resultados dispares, tanto entre las etapas de diseño como en el paso a calcular más de una composición para un mismo cultivo. El primer punto a destacar es que calcular una única composición en base a los consumos efectivos en la fase de crecimiento del cultivo base mejora la productividad específica en todas las etapas de diseño, independiente de la producción total predicha para el cultivo. En contraste, la producción por célula disminuye en ambas etapas si se incluye un segundo ajuste de composición, en todos los instantes de cambio evaluados. De acuerdo con esto, a pesar de que ajustar la composición durante el cultivo busca mejorar la productividad de otra fase, esto sólo se logra parcialmente dado que las predicciones indican que cada célula produce menos tPA en promedio.

Esta capacidad productiva se relaciona directamente con la síntesis de bio-producto y de células viables. Un sólo ajuste de composición genera predicciones con resultados diferentes, pues en la etapa de diseño preliminar incrementa la cantidad de tPA obtenida pero disminuye la disponibilidad de células (respecto a una composición estándar); mientras que en el diseño optimizado tanto las células como el tPA disminuyen. En comparación, los ajustes durante el cultivo se comportan en forma inversa, dado que en la etapa de diseño preliminar disminuye tanto la cantidad células como de tPA, pero en el optimizado hay un aumento de ambos. El análisis conjunto de estas métricas de evaluación indica entonces que la plataforma modela los cultivos de tal forma que el incremento en la producción está estrechamente ligado con la disponibilidad de células presentes, y no tanto al funcionamiento metabólico de cada célula.

Esto se ve reflejado en que el caso donde hay un aumento de productividad específica de 8% pero una disminución mayor en la disponibilidad de células viables (20%), la síntesis de tPA decrece; asimismo, cuando la productividad específica disminuye pero la cantidad de células se incrementa (diseño optimizado con más de un ajuste de composición), existe un aumento en la cantidad de tPA producido. Si a ello se le suma que las mayores producciones celulares se obtienen cuando los aminoácidos asociados (matemáticamente) al crecimiento poseen una concentración mayor en la alimentación, hace sentido que para mejorar la productividad del cultivo diseñado, sin alterar el modelo dinámico de la plataforma, el objetivo debería ser maximizar la producción de células.

Pese a estas discrepancias en los resultados, la modificación realizada al modelo matemático de la plataforma permite, como ya se ha mostrado, calcular la composición de la alimentación a diseñar en detrimento de emplear una composición fijada por un medio predefinido. Con ello, se busca cumplir con los requerimientos nutricionales de la línea celular para los sustratos que no son críticos según el modelo dinámico utilizado. Esta metodología, no obstante, presenta una serie de limitaciones y consideraciones.

En primer lugar, como fue mencionado, existe una inconsistencia entre el objetivo de incorporar un método de ajuste de composición y el desarrollo del mismo. La finalidad es aumentar la productividad del cultivo, particularmente se busca una mayor longevidad y obtener más biop-roducto (tPA, en este caso); sin embargo, el ajuste implementado estima una composición en base a los consumos para mejorar exclusivamente el crecimiento celular, dado que los *ratios* se calculan en el intervalo de mayor producción de células (y no de producto). Pese a que posteriormente se intentó solucionar este hecho calculando más de una composición, de modo que existiera una segunda alimentación que respondiera de mejor forma a las necesidades productivas del cultivo (y no a las de crecimiento), como fue descrito en capítulos anteriores es la misma implementación la que arrastra el problema.

En segundo lugar, el ajuste propuesto e implementado estima los consumos efectivos y los coeficientes que los relacionan sólo en base a las mediciones realizadas, correspondientes a las concentraciones de cada metabolito en una muestra del cultivo (es decir, del medio extracelular). Si bien se relaciona la desaparición o aparición de cada nutriente con la disponibilidad de células metabólicamente activas mediante el cálculo de tasas específicas, es decir que se obtiene una medida aparente de cuánto metabolito utiliza cada célula, en el método de ajuste no se realiza una distinción entre el uso de sustratos para mantención/replicación celular y para la síntesis de bio-producto. Por ejemplo, el mismo modelo dinámico que se resuelve en la plataforma considera esta diferenciación, utilizando composiciones de células y producto obtenidas empíricamente; la ecuación 6.1 muestra la composición de aminoácidos estimada para generar tPA. Si dentro del ajuste de composición se incluyera esta diferenciación, mediante por ejemplo porcentajes de consumo de cada aminoácido, podrían obtenerse concentraciones que apuntaran a potenciar la síntesis de producto en lugar del crecimiento celular. O, de forma inversa, podrían incorporarse en el ajuste los porcentajes asociados a aumentar el crecimiento celular, pues tal como fue mencionado el sistema responde de mejor forma (en producción de tPA) cuanto mayor sea la cantidad de células viables durante el cultivo.

$$\begin{aligned}
& 1,3 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Glc} + 4,1 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Glu} + 3,1 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Gln} + 1,8 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Arg} + 2,9 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Asp} + 3,6 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Asn} \\
& + 5,0 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Leu} + 2,6 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Ile} + 4,8 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Lys} + 5,6 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Pro} + 1,8 \cdot 10^{-4} \cdot C_{His} + 6,7 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Val} \\
& + 1,0 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Met} + 8,3 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Thr} + 5,2 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Gly} + 8,4 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Ser} + 3,3 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Phe} + 2,3 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Tyr} \\
& + 1,8 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Trp} + 2,0 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Cys} + 4,6 \cdot 10^{-4} \cdot C_{Ala} \rightarrow tPA \quad (6.1)
\end{aligned}$$

Esto va relacionado directamente con calcular la composición en más de un instante del cultivo. Una alimentación variable que suplemente las concentraciones necesarias para cada fase del cultivo permitiría que cada una de ellas tenga un mejor desempeño, disminuyendo la posibilidad de estrés metabólico por falta o exceso de nutrientes. Si además cada composición calculada está enfocada a maximizar el objetivo de cada fase, el cultivo tendría mejor

rendimiento tanto en viabilidad como en productividad (de células y de bio-producto). La metodología propuesta para obtener más de una composición está limitada a utilizar el mismo método de ajuste, pero si se desarrollara un ajuste adaptable a cada fase de cultivo (considerando la diferenciación de uso de nutrientes, desestimando en otras fases la selección del intervalo de crecimiento, etc.) podría obtenerse una estrategia de alimentación “multi-objetivo”, guardando las proporciones de este concepto. No obstante, aún con ese enfoque múltiple es necesario un objetivo común, sea una mayor síntesis de bio-producto exclusivamente o maximizar la cantidad de células viables, como ya se ha expuesto.

Otro eje fundamental del ajuste realizado es el comportamiento de cada aminoácido en las predicciones de cultivo realizadas. Emplear una métrica de evaluación que relacione la concentración del aminoácido en el biorreactor con la cantidad de producto sintetizado (rendimiento sustrato a producto), como ya fue mencionado, genera un sesgo al no considerar realmente el uso que se le da a cada aminoácido. En el modelo dinámico sí se diferencia en qué se emplea cada nutriente (mantención celular, replicación o biosíntesis). Para evaluar cómo afecta la alimentación entregada es necesario analizar el rendimiento tanto a producto como a biomasa, y a partir de allí sacar conclusiones sobre si el ajuste realizado realmente favoreció el desarrollo del cultivo y cumplió el objetivo. Si se analiza una sola conversión, se está sobrestimando la respuesta del ajuste, pues se asume que los aminoácidos sólo se emplean para un objetivo.

Junto con el método para estimar cómo la plataforma modela las concentraciones de aminoácidos y su uso en el cultivo, tanto los valores obtenidos para la composición de alimentación como la relevancia que cada uno tengan en el desempeño productivo del cultivo son aspectos a tener en consideración. Para la mayoría de las simulaciones realizadas se obtuvo concentraciones factibles de realizar en la práctica, salvo en el diseño fed-batch optimizado con un segundo cambio de composición pues hay tres aminoácidos cuyas concentraciones en la alimentación superan su límite de solubilidad. Si bien actualmente es posible incluir factores de dilución en el modelo matemático, la restricción de volumen máximo del reactor limita su uso. Para subsanar esto, una opción sería incluir los límites de solubilidad de cada aminoácido, de manera que si alguna concentración calculada lo sobrepase, la concentración entregada corresponda al límite.

Pero, tal vez igual o más importante que la solubilidad, es imperativo estimar el real aporte de cada aminoácido en la productividad del cultivo (principalmente de células, según lo expuesto) sin cambios en el modelo dinámico de la plataforma. Como fue abordado en capítulos anteriores, una mayor producción de células y tPA se da cuando la concentración de ciertos aminoácidos es mayor, particularmente los asociados al crecimiento según las ecuaciones del modelo (glutamato/glutamina, arginina). No obstante, los ajustes realizados indican que son otros los aminoácidos cuya concentración debe aumentar en la alimentación según su consumo empírico. Por tanto, un primer paso a identificar si realmente un incremento de esos aminoácidos en el cultivo potencia la productividad, es analizar cómo varía la producción al variar la concentración de cada aminoácido. En forma manual, podría modificarse la composición de la alimentación en el modelo aumentando o disminuyendo la concentración de un aminoácido a la vez, y ver la respuesta en la simulación.

# Capítulo 7

## Conclusiones

El trabajo realizado permitió caracterizar una metodología de análisis de datos biológicos, particularmente de cultivos celulares, y adecuarla para calcular relaciones proporcionales de consumo entre aminoácidos y con ellos estimar la composición de la alimentación a utilizar en la plataforma de diseño de cultivos. El método de Umulis y Hu fue modificado para estimar *ratios* estequiométricos que relacionaran el consumo acumulado de un aminoácido con el de una referencia, en reactores batch y fed-batch. Se testeó el funcionamiento del método discretizando las ecuaciones implicadas y utilizando datos de la línea CHO-tPA obtenidos en cultivos desarrollados en el proyecto.

Con la discretización, la posibilidad de realizar la regresión para el ajuste de varias maneras (matricial o no lineal) y los resultados de la prueba como respaldo, se pudo implementar el método de cálculo en el mismo software de programación de la plataforma. Éste fue desarrollado como una función anexa al modelo de diseño que entregara los coeficientes de correlación, y con ellos poder calcular en el modelo la concentración de cada aminoácido en el flujo a alimentar, conociendo la concentración del aminoácido de referencia (glutamato o glutamina). Dentro de la función se incluyó una estrategia para seleccionar el intervalo de relación lineal y sólo considerar datos de este tramo, correspondiente al rango donde hay crecimiento celular.

Adicional a la inclusión del método de ajuste a la plataforma para calcular una composición y no sólo predefinirla, se modificó el modelo de diseño para considerar más de un ajuste de composición en la predicción del cultivo, buscando cumplir las necesidades de las diferentes fases de éste. Se logró obtener una simulación segmentada donde cada tramo utiliza una composición calculada específicamente para él, mediante el uso de la función de ajuste desarrollada (sin modificaciones) en los datos de ese tramo. Los puntos de detención o “corte” responden a instantes obtenidos al analizar los cultivos experimentales con el testeó inicial.

Las predicciones obtenidas con las diferentes implementaciones del ajuste, para las etapas de diseño fed-batch preliminar y fed-batch optimizado, presentan resultados heterogéneos. La primera incorporación del método de ajuste aumenta la productividad específica teórica en ambas etapas de diseño, comparado con una composición estandarizada de un medio de



cultivo comercial, con aumentos de 6 y 8 %. Pero la producción tanto de células como de tPA no es consistente entre etapas, pues aumentan sólo si un aminoácido particular tiene una concentración mayor a la estándar (arginina, en el diseño preliminar), debido a que éste se considera dentro de la ecuación de tasa de crecimiento.

La inclusión de un segundo ajuste en un punto intermedio disminuye la productividad específica en ambas etapas, pero con disminuciones en el rango de 1-5 %. Las simulaciones en este paso del trabajo reforzaron la conjetura de que la síntesis de bio-producto está ligada al crecimiento celular en el modelo, pues se predijo aumento de tPA sólo cuando incrementa el número de células viables, en la etapa de diseño optimizado (para cualquiera de los dos instantes de cambio). Sin embargo, la forma en que se incluyó un ajuste intermedio desestabiliza el modelo, pues el controlador diseñado no logra mantener constantes los *setpoints* definidos en todos los casos, siendo sensible al punto en que se detenga la simulación.

A partir del análisis conjunto de las predicciones, las concentraciones obtenidas para las alimentaciones y las ecuaciones que estructuran el modelo, es posible concluir que para incrementar la producción (al menos teórica) del cultivo es necesario maximizar la cantidad de células viables. El ajuste de composición pretendió nivelar simultáneamente las concentraciones de todos los aminoácidos alimentados y así aumentar la predicción de tPA, pero antes de ello se debe replantear el objetivo del mismo, analizar cuantitativamente cuáles aminoácidos realmente aportan en el crecimiento, definir cotas de concentración y reestructurar el método de ajuste para cada tramo, en el caso de un ajuste múltiple.

El método implementado, por lo tanto, corresponde a un primer apronte para que la plataforma de diseño de cultivos emplee una alimentación cuya composición responda a las necesidades de la línea celular e incremente la producción de la misma. Además, si bien se trabajó con una única línea celular, el método de ajuste y sus futuras modificaciones no distinguen entre datos experimentales, pudiendo ser aplicable a cualquier línea celular y por tanto a la plataforma en su totalidad.

# Bibliografía

- [1] MORDOR-INTELLIGENCE. Biopharmaceuticals Market - Growth, Trends, and Forecast (2020 - 2025). [En línea]. <<https://bit.ly/3nSRzpT>>, 2020. [Fecha de consulta: 16 de diciembre de 2020].
- [2] OGBRU, O., DAVIS, C.P. Biologics (Biologic Drug Class). [En línea]. <<https://bit.ly/3aOycdS>>, 2020. [Fecha de consulta: 10 de diciembre de 2020].
- [3] LIFE-TECHNOLOGIES, INVITROGEN. Cell Culture Basics Handbook. Gibco Education, Lancaster, PA, 2016.
- [4] ZHANG, Y.H.P., SUN, J., MA, Y. Biomanufacturing: history and perspective. Journal of industrial microbiology biotechnology, 44, 11 2016.
- [5] THIELE, I., PALSSON, B. [U+FFFD] A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. Nature protocols, 5 (1): 93–121, 1 2010.
- [6] WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. Nature Biotechnology, 36: 1136–1145, 12 2018.
- [7] BCC-PUBLISHING. Biorefinery Products: Global Markets. [En línea]. <<https://bit.ly/38ODq6K>>, 2020. [Fecha de consulta: 29 de diciembre de 2020].
- [8] KANTARDJIEFF, A., ZHOU, W. Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing, págs. 1–9. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014.
- [9] O’FLAHERTY, R., BERGIN, A., FLAMPOURI, E., MOTA, L.M., OBAIDI, I., QUIGLEY, A., XIE, Y., BUTLER, M. Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. Biotechnology Advances, 43: 107552, 2020.
- [10] WANG, S.J., ZHONG, J.J. Chapter 6 - Bioreactor Engineering. En: S.T. YANG (Ed.) Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, págs. 131 – 161. Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [11] DORCEUS, M., WILLARD, S.S., SUTTLE, A., HAN, K., CHEN, P.J., SHA, M. Com-

- paring Culture Methods in Monoclonal Antibody Production: Batch, Fed-Batch, and Perfusion. [En línea]. <<https://bit.ly/2Jq1X9P>>, 2017. [Fecha de consulta: 16 de diciembre de 2020].
- [12] WOODSIDE, S., BOWEN, B., PIRET, J. Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors. Cytotechnology, 28: 163–175, 2004.
- [13] KYRIAKOPOULOS, S., ANG, K.S., LAKSHMANAN, M., ZHUANGRONG, H., YOON, S., GUNAWAN, R., LEE, D.Y. Kinetic Modeling of Mammalian Cell Culture Bioprocessing: The Quest to Advance Biomanufacturing. Biotechnology Journal, 13: 1700229, 10 2017.
- [14] HU, W.S. An Advanced Course on Cellular Bioprocess Technology. University of Minnesota, Minnesota, 2011.
- [15] XIE, L., WANG, D.I.C. Stoichiometric analysis of animal cell growth and its application in medium design. Biotechnology and Bioengineering, 43(11): 1164–1174, 1994.
- [16] GERDTZEN, Z., SALGADO, J.C., GUERRA, M.I., DACCARETT, C. Concurso IDeA I+D 2018 . Inf. téc., Gobierno de Chile, Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico, 2018.
- [17] QUIROGA-CAMPANO, A.L., PANOSKALTSIS, N., MANTALARIS, A. Energy-based culture medium design for biomanufacturing optimization: A case study in monoclonal antibody production by GS-NS0 cells. Metabolic Engineering, 47: 21 – 30, 2018.
- [18] DORKA, P. Modelling Batch and Fed-batch Mammalian Cell Cultures for Optimizing MAb Productivity. Tesis de Doctorado, University of Waterloo, Canada, 2007.
- [19] GERDTZEN, Z., SALGADO, J.C., JAUREGUIBERRY, B., MERINO, M.P., CARO, P. Informe de Avance Parcial Científico–Tecnológico N° 2 . Inf. téc., Gobierno de Chile, Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo, 2020.
- [20] CARRILLO, L., GENEL-REY, T., ARAIZ, D., LÓPEZ-PACHECO, F., LÓPEZ-MEZA, J., ROCHA, M., RAMIREZ-MEDRANO, A., ALVAREZ, M. Amino acid consumption in naïve and recombinant CHO cell cultures: Producers of a monoclonal antibody. Cytotechnology, 67, 05 2014.
- [21] ADAMS, D., KORKE, R., HU, W.S. Application of Stoichiometric and Kinetic Analyses to Characterize Cell Growth and Product Formation, págs. 269–284. Humana Press, Totowa, NJ, 2007.
- [22] KYRIAKOPOULOS, S., KONTORAVDI, C. A Framework for the Systematic Design of Fed-Batch Strategies in Mammalian Cell Culture. Biotechnology and Bioengineering, 111, 12 2014.
- [23] VILLAVERDE, A.F., BONGARD, S., MAUCH, K., BALSACANTO, E., BANGA, J.R. Metabolic engineering with multi-objective optimization of kinetic models.

- [24] ZAMPIERI, G., COGGINS, M., VALLE, G., ANGIONE, C. A poly-omics machine-learning method to predict metabolite production in CHO cells. 11 2017.
- [25] SCHINN, S.M., MORRISON, C., WEI, W., ZHANG, L., LEWIS, N.E. A genome-scale metabolic network model and machine learning predict amino acid concentrations in Chinese Hamster Ovary cell cultures. bioRxiv, 2020.
- [26] BIOMEDICALS, M. LB medium, powder. [En línea]. <<https://bit.ly/2SQT7qo>>, 2021. [Fecha de consulta: 30 de junio de 2021].
- [27] MERCK KGAA, S.S.A. Blood Agar (Base) suitable for microbiology, NutriSelect Plus. [En línea]. <<https://bit.ly/3jKqm9J>>, 2021. [Fecha de consulta: 30 de junio de 2021].
- [28] RITACCO, F.V., WU, Y., KHETAN, A. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. Biotechnology Progress, 34 (6): 1407–1426, 10 2018.
- [29] UMULIS, D., LEE, J., KORKE, R., HU, W.S. Cellular Bioprocess Technology. University of Minnesota, Minnesota, 2006.
- [30] RITACCO, F.V., WU, Y., KHETAN, A. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. Biotechnology Progress, 34(6): 1407—1426, November 2018.
- [31] TULSYAN, A., SCHORNER, G., KHODABANDEHLOU, H., WANG, T., COUFAL, M., ÜNDEY, C. A machine learning approach to calibrate generic Raman models for real-time monitoring of cell culture processes. Biotechnology and Bioengineering, 116: 2575–2586, 06 2019.
- [32] HUANG, Z., XU, J., YONGKY, A., MORRIS, C.S., POLANCO, A.L., REILY, M., BORYS, M.C., LI, Z.J., YOON, S. CHO cell productivity improvement by genome-scale modeling and pathway analysis: Application to feed supplements. Biochemical Engineering Journal, 160: 107638, 2020.
- [33] ZAMPIERI, G., VIJAYAKUMAR, S., YANESKE, E., ANGIONE, C. Machine and deep learning meet genome-scale metabolic modeling. PLOS Computational Biology, 15: 1–24, 07 2019.
- [34] SCHINN, S.M., MORRISON, C., WEI, W., ZHANG, L., LEWIS, N.E. Systematic evaluation of parameters for genome-scale metabolic models of cultured mammalian cells. Metabolic Engineering, 66: 21–30, 2021.
- [35] HAAG, J.E., WOUWER, A.V., BOGAERTS, P. Dynamic modeling of complex biological systems: a link between metabolic and macroscopic description. Mathematical Biosciences, 193(1): 25–49, 2005.

- [36] MERCK-MILLIPORE. L-Prolina 107434 SDS. <<https://bit.ly/3iyFB19>>, 2021. [Fecha de consulta: 08 de agosto de 2021].
- [37] ORGANIZATION, I.L. DL-METHIONINE ICSC: 0919. <<https://bit.ly/3s5ANqL>>, 1997. [Fecha de consulta: 08 de agosto de 2021].
- [38] (NCBI), P. Asparagine - Compound Summary. <<https://bit.ly/3t1wqgw>>, 2004. [Fecha de consulta: 08 de agosto de 2021].
- [39] (NCBI), P. L-Cysteine - Compound Summary. <<https://bit.ly/3jpOQVb>>, 2004. [Fecha de consulta: 08 de agosto de 2021].
- [40] MERCK-MILLIPORE. L-Treonina 108411 SDS. <<https://bit.ly/3hfIK8r>>, 2021. [Fecha de consulta: 08 de agosto de 2021].
- [41] MERCK-MILLIPORE. Ácido L-glutámico 100291 SDS. <<https://bit.ly/3nqQiZR>>, 2021. [Fecha de consulta: 08 de agosto de 2021].
- [42] (NCBI), P. Leucine - Compound Summary. <<https://bit.ly/3z1r3zq>>, 2004. [Fecha de consulta: 08 de agosto de 2021].
- [43] BASTIN, G., DOCHAIN, D. On-line estimation and adaptive control of bioreactors. Process measurement and control, Elsevier, 1990.

# Anexos

# Anexo A

## Testeo del método de análisis de Umulis y Hu y cálculo de *ratios*

Para ambos tipos de reactor utilizados para cultivos experimentales en el proyecto, batch y fed-batch, se probó la metodología de análisis *In Process* y *Post Process*, incluyendo el cálculo de los coeficientes de relación estequiométrica en base a los consumos efectivos de aminoácidos. Estas pruebas, como se mencionó en el cuerpo del documento, fueron realizadas en Microsoft Excel. El cálculo completo fue dividido en diferentes hojas, distribuidas de la siguiente forma:

- **Input:** ingreso de los datos experimentales. En el caso de un reactor fed-batch, se incluye también el flujo añadido y la concentración del medio alimentado.
- **Mediciones:** conversión de unidades de algunas mediciones. Se incluye también el cálculo de viabilidad.
- **Cálculos En-Proceso:** estimación de IVCC, consumos/producciones acumuladas, y tasas específicas de consumo/producción en puntos consecutivos.
- **Consumo específico:** estimación del consumo/producción por célula en puntos consecutivos.
- **Curvas Cinéticas:** gráficos de los datos experimentales, y de tasas específicas en puntos consecutivos. Se incluye también los gráficos de IVCC, producto acumulado, viabilidad y células viables en escala logarítmica.
- **Regresión No-Lineal:** regresión polinomial para obtener una función de los consumos/producciones acumuladas de cada metabolito, como función del tiempo.
- **Cálculos Post-Proceso:** estimación de las tasas específicas de consumo/producción con el consumo acumulado ajustado.
- **Ratios:** cálculo de los coeficientes de relación estequiométrica entre el aminoácido de referencia y cada aminoácido, de tres formas: con los consumos acumulados, con las tasas específicas de datos consecutivos y con las tasas específicas ajustadas. Se incluye también la comparación entre las tres formas para indicar la que mejor ajusta una relación lineal (la que posea un  $R^2$  más alto).

- **Curvas acumulativas y regresión:** gráficos que representan los consumos acumulados calculados “en proceso” y su correspondiente ajuste mediante la regresión.
- **Gráficos de tasas específicas:** comparación gráfica entre las tasas específicas calculadas mediante datos consecutivos y las calculadas a partir de la regresión.



## Anexo B

# Plantilla de ingreso de datos medidos en el proyecto

A continuación, se describe la estructura de la planilla utilizada para registrar los datos experimentales de concentraciones medidas.

- Hoja **DATOS**: aquí se incluyen las concentraciones obtenidas en cada medición, donde cada fila corresponde a un instante de medición. Las variables registradas son:
  - Tiempo de medición, en horas.
  - Volumen de cultivo, en litros.
  - Concentración de células (viables, apoptóticas y muertas), en células por litro.
  - Concentración de metabolitos (glucosa, aminoácidos y lactato), en milimolar.
  - Producto acumulado (en miligramos por mililitro) y producto total (en miligramos).
  - Volumen de muestra para medición, en mililitros.
  - Flujo de aminoácidos y de glucosa (en el caso que haya), en litros. También se incluye el flujo acumulado.
- Hoja **COMP**: corresponde a la concentración del flujo de aminoácidos y de glucosa. Las celdas anaranjadas corresponde a la concentración original del medio y a los factores de dilución, y las celdas rojas corresponden a la concentración final obtenida en el medio a alimentar (una vez diluido).

# Anexo C

## Modelo cinético-dinámico de la plataforma de diseño

En la plataforma de diseño de cultivos se emplea, como fue mencionado, un modelo dinámico para representar el biorreactor. Este modelo se basa en el realizado en la investigación *Energy-based culture medium design for biomanufacturing optimization: A case study in monoclonal antibody production by GS-NS0 cells* [17], donde para diseñar el medio de cultivo se genera un modelo macroscópico del cultivo basado en balances de masa del sistema completo (del reactor). Éste describe el crecimiento celular, apoptosis, muerte, consumo de nutrientes (medibles), acumulación del metabolito de interés y el nivel de energía intracelular disponible (ATP).

En la plataforma se desestimó la energía celular como variable de estado, enfocándose sólo en el consumo de nutrientes, las cantidades de células y y la síntesis de bio-producto. El modelo resultante se describe a continuación:

### 1. Variables de estado:

Son un total de 27 variables, correspondientes a:

- $V$ : volumen del reactor
- $X_V$ : concentración de células viables
- $X_a$ : concentración de células apoptóticas
- $X_d$ : concentración de células muertas
- $C_{PROD}$ : concentración de bio-producto
- $C_{GLC}$ : concentración de glucosa (fuente de energía)
- $C_{LAC}$ : concentración de lactato (subproducto)
- $C_i$ : concentración del aminoácido  $i$ . Son 19 aminoácidos (Glu, Arg, Asp, Asn, Leu, Ile, Lys, Pro, His, Val, Met, Thr, Gly, Ser, Phe, Tyr, Trp, Cys, Ala). Glutamato y glutamina se consideran como equivalentes dado que son la segunda principal fuente de energía.
- $C_{PROD}^-$ : bio-producto acumulado.

## 2. Parámetros y ecuaciones auxiliares:

Para definir los balances de masa (ecuaciones diferenciales), es necesario definir algunos parámetros y cómo se modela el crecimiento celular:

- Crecimiento:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_{GLC}}{C_{GLC} + k_{GLC}} \cdot \left( \frac{C_{GLU}}{C_{GLU} + k_{GLU}} + \frac{C_{ARG}}{C_{ARG} + k_{ARG}} \right) \cdot \frac{1}{1 + \left( \frac{C_{LAC}}{k_{i,LAC}} \right)^4} \quad (C.1)$$

- Efecto de hambre (*Starvation effect*, STV)
- Apoptosis:

$$\mu_a = \mu_{a,max} \cdot STV + \mu_{a,LAC,max} \cdot \frac{1}{1 + \left( \frac{k_{a,LAC}}{C_{LAC}} \right)^4} \quad (C.2)$$

- Muerte por necrosis:

$$\mu_d = \mu_{d,max} \cdot STV + \mu_{d,LAC,max} \cdot \frac{1}{1 + \left( \frac{k_{d,LAC}}{C_{LAC}} \right)^4} \quad (C.3)$$

- Muerte programada (por apoptosis)
- $Y_{X,i}$ : rendimiento específico del aminoácido  $i$  a biomasa. En el modelo se define como “composición celular”.
- $M_{Prod,i}$ : rendimiento específico del aminoácido  $i$  a bio-producto. En el modelo se define como “composición de producto”.
- $C_{i,in}$ : concentración del aminoácido  $i$  en la alimentación. También se incluye la alimentación de glucosa.
- $Q_{j,k}$ : tasa específica de consumo del compuesto  $k$  para producir el compuesto  $j$ .
  - $j$  puede corresponde a biomasa, bio-producto o energía (medida como síntesis de otros aminoácidos).
  - Las tasas específicas se calculan como relaciones entre la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y los rendimientos específicos.

## 3. Sistema de ecuaciones (balances de masa):

Los balances realizados se listan a continuación, donde se presentan algunas de las ecuaciones a modo de ejemplo:

- Balance de masa total
- Balance de biomasa viable ( $X_V$ )
- Balance de biomasa apoptótica ( $X_a$ )
- Balance de biomasa muerta ( $X_d$ )
- Balance de glucosa:

$$\frac{\partial(V \cdot C_{GLC})}{\partial t} = -v \cdot X_V \cdot (Q_{X,GLC} + Q_{PROD,GLC} + Q_{ALA,GLC} + Q_{GLC} + Q_{LAC,GLC}) + F_{in,GLC} \cdot C_{GLC,in} - F_{out} \cdot C_{GLC} \quad (C.4)$$

- Balance de lactato (*Lac*)
- Balance de glutamato/glutamina (*Glu, Gln*)
- Balance de arginina (*Arg*)
- Balance de aspartato (*Asp*)
- Balance de asparragina (*Asn*)
- Balance de leucina (*Leu*)
- Balance de isoleucina (*Ile*)
- Balance de lisina (*Lys*)
- Balance de prolina (*Pro*)
- Balance de histidina (*His*)
- Balance de valina (*Val*)
- Balance de metionina (*Met*)
- Balance de treonina (*Thr*)
- Balance de serina (*Ser*)
- Balance de glicina (*Gly*)
- Balance de fenilalanina (*Phe*)
- Balance de tirosina (*Tyr*)
- Balance de triptofano (*Trp*)
- Balance de cisteína (*Cys*)
- Balance de alanina (*Ala*)
- Balance de bio-producto acumulado ( $Pr\bar{od}$ )
- Balance de bio-producto (*Prod*)

# Anexo D

## Códigos de programación para cálculo de *ratios*

A continuación se presenta la descripción de cada código desarrollado para estimar los coeficientes de relación estequiométrica. Se incluyen en cada caso sus variables de entrada y salida.

### D.1. Ajuste a partir de cultivo batch

El siguiente código es la función desarrollada para calcular los coeficientes de relación estequiométrica cuando el cultivo base experimental es batch, escrito en MATLAB. Al ser batch, sólo se consideran las mediciones, desestimando en todos los cálculos la existencia de flujos de entrada (o salida).

```
1 function Q = ajustefeed(t,D)
2 %Funcion que ajusta la alimentacion que se define en el modelo a partir de
3 %los datos experimentales del cultivo anterior, definiendo coeficientes de
4 %correlacion estequiometrica entre el nutriente critico (el aminoacido que
5 %se ajusta) y los otros nutrientes.
6 %Los coeficientes de correlacion se estiman como el cociente entre las tasas
7 %especificas de consumo de cada aminoacido. Con estos parametros es posible
8 %estimar la composicion de la alimentacion respecto a cada aminoacido.
9
10 %INPUT
11     % t = vector de tiempo del cultivo
12     % D = matriz de datos experimentales de consumo de cada aminoacido
13
14
15 %OUTPUT
16     % Q = vector de coeficientes de relacion estequiometrica
17
18
19 %% 1. CARGAR LOS DATOS DE EXPERIMENTOS
20 % Se crean vectores de datos experimentales para cada uno
21 % aminoacidos, ademas del volument de cultivo y la cantidad de celulas viables
```

```

23 %% 2. DETERMINACION DEL INTERVALO DE AJUSTE
25 % Para determinar el intervalo de ajuste , se calcula la tasa especifica de
27 % crecimiento entre dos puntos y se considera como limite
29 % superior la medicion donde la tasa cambia de signo
31 %% 3. CALCULO DE CONSUMOS Y PRODUCCIONES ACUMULADAS
33 % Se utilizan las ecuaciones discretas para los consumos acumulados , generando
35 % un vector para cada aminoacido , calculando solo donde hay crecimiento (mu>0)
37 % Ademas , se crea un vector con las celulas viables dentro del intervalo
39 % de crecimiento
41 %% 4. REGRESION NO LINEAL CON CONSUMOS ACUMULADOS PARA CADA COMPUESTO
43 % Primero se define el tipo de funcion para efectuar la regresion (polinomio
45 % de grado 3)
47 % Luego , se efectua la regresion para cada compuesto , incluidas las celulas
49 %% 5. CALCULO DE TASAS ESPECIFICAS DE CONSUMO CON COEFICIENTES DE REGRESION
51 % La tasa especifica se calcula como la primera derivada de la
53 % regresion realizada , normalizada por la cantidad de celulas viables
55 %% 6. CALCULO DE COEFICIENTES DE RELACION ESTEQUIOMETRICA
57 % Cada coeficiente se calcula como la pendiente entre las tasas de consumo ,
59 % donde el denominador en este caso siempre es la tasa del aminoacido de
61 % mayor consumo y que se modela como nutriente critico . En este caso ,
63 % Glutamato (o Glutamina)
65 % Finalmente , se genera un vector con todos los coeficientes

```

## D.2. Ajuste a partir de cultivo fed-batch

El siguiente código es para calcular los coeficientes de relación estequiométrica cuando el cultivo base experimental es fed-batch, escrito en MATLAB. En este caso los cálculos incluyen el efecto de alimentaciones.

```

function Q = ajustefeed_fedbatch(t,D,Comp,F_AA,F_GLC)
2 %Funcion que ajusta la alimentacion que se define en el modelo a partir de
3 %los datos experimentales del cultivo anterior , definiendo coeficientes de
4 %correlacion estequiometrica entre el nutriente critico (el aminoacido que
5 %se ajusta) y los otros nutrientes .
6 %Los coeficientes de correlacion se estiman como el cociente entre las tasas
7 %especificas de consumo de cada aminoacido . Con estos parametros es posible
8 %estimar la composicion de la alimentacion respecto a cada aminoacido .
9
10 %INPUT
11     % t = vector de tiempo del cultivo
12     % D = matriz de datos experimentales de consumo de cada aminoacido
13     % Comp = composicion de la alimentacion utilizada
14     % F_AA = vector de flujos de alimentacion de aminoacidos

```

```

16      % F_GLC = vector de flujos de alimentacion de glucosa
18
18  %OUTPUT
19      % Q = vector de coeficientes de relacion estequiometrica
20
22  %% 1. CARGAR LOS DATOS DE EXPERIMENTOS
23  % Se crean vectores de datos experimentales para cada uno de los aminoacidos,
24  % ademas del volumen de cultivo y la cantidad de celulas viables
25
26  %% 2. DETERMINACION DEL INTERVALO DE AJUSTE
27  % Para determinar el intervalo de ajuste, se calcula la tasa especifica de
28  % crecimiento entre dos puntos y se considera como limite
29  % superior la medicion donde la tasa cambia de signo
30
32  %% 3. CALCULO DE CONSUMOS Y PRODUCCIONES ACUMULADAS
33  % Se utilizan las ecuaciones discretas para los consumos acumulados, generando
34  % un vector para cada aminoacido, calculando solo donde hay crecimiento (mu>0)
35  % Ademas, se crea un vector con las celulas viables dentro del intervalo
36  % de crecimiento
37
38  %% 4. REGRESION NO LINEAL CON CONSUMOS ACUMULADOS PARA CADA COMPUESTO
39  % Primero se define el tipo de funcion para efectuar la regresion (polinomio
40  % de grado 3)
41  % Luego, se efectua la regresion para cada compuesto, incluidas las celulas
42
44  %% 5. CALCULO DE TASAS ESPECIFICAS DE CONSUMO CON COEFICIENTES DE REGRESION
45  % La tasa especifica se calcula como la primera derivada de la
46  % regresion realizada, normalizada por la cantidad de celulas viables
47
50  %% 6. CALCULO DE COEFICIENTES DE RELACION ESTEQUIOMETRICA
51  % Cada coeficiente se calcula como la pendiente entre las tasas de consumo,
52  % donde el denominador en este caso siempre es la tasa del aminoacido de
53  % mayor consumo y que se modela como nutriente critico. En este caso,
54  % Glutamato (o Glutamina)
55  % Finalmente, se genera un vector con todos los coeficientes
56

```

# Anexo E

## Incorporación del ajuste de composición al código de programación de diseño

A continuación se describe la forma de incorporación del ajuste al código de diseño, sin presentar el código completo.

### E.1. Inclusión en el ajuste 1 (diseño de cultivo fed-batch)

El siguiente código corresponde al extracto del código de predicción del cultivo fed-batch no optimizado, específicamente la inclusión del método de ajuste. Como fue mencionado, se utiliza la función creada para calcular los *ratios* estequiométricos y luego se emplean para estimar la composición del medio a alimentar, considerando que se conoce la concentración del aminoácido crítico (Glu o Gln). Las concentraciones calculadas son consideradas luego como parámetros fijos en el modelo.

```
close all
2 clear all
clc
4
6 % Se cargan las variables de control , opciones , informacion del medio ,
% producto y adivinanza inicial de los parametros del modelo
8 %Ademas, tambien se carga la estructura del modelo (ecuaciones , variables y
% parametros), y los datos experimentales del cultivo celular base
10
12 % En el vector P (vector de parametros del codigo) se agregan los datos por
% defecto para composiciones de celula , producto y alimentacion
14 % Se crea ademas una matriz D con los datos de cliente (datos experimentales)
16
18 %AJUSTE DE COMPOSICION EN LA ALIMENTACION EN BASE A DATOS EXPERIMENTALES
% Se utiliza la funcion ajustefeed para obtener coeficientes de relacion
% estequiometrica entre los diferentes compuestos a alimentar , en base al
```



```

20 % aminoacido a ajustar (GLU). Con esos coeficientes se redefinen las
    % composiciones de la alimentacion
22
24 AJUSTE_FEED = ajustefeed(t,D);
26 % Ya calculados los coeficientes , se redefinen las composiciones mediante el
    % producto del coeficiente con la concentracion del aminoacido de referencia.
    % Las composiciones se definen en el vector P.

```

## E.2. Inclusión en el ajuste 2 (optimización de cultivo fed-batch)

El siguiente código corresponde al extracto del código de predicción del cultivo fed-batch optimizado, específicamente la inclusión del método de ajuste de composición.

```

1  close all
   clear all
3  clc
5
   % Se cargan las variables de control , opciones , informacion del medio ,
7  % producto y adivinanza inicial de los parametros del modelo
   % Ademas, tambien se carga la estructura del modelo (ecuaciones , variables y
9  % parametros), y los datos experimentales del cultivo celular base
11 % En el vector P (vector de parametros del codigo) se agregan los datos por
    % defecto para composiciones de celula , producto y alimentacion
13
   % Se crea ademas una matriz D con los datos de cliente (datos experimentales)
15
17 %AJUSTE DE COMPOSICION EN LA ALIMENTACION EN BASE A DATOS EXPERIMENTALES
   % Se utiliza la funcion ajustefeed_fedbatch para obtener coeficientes de
19 % relacion estequiometrica entre los diferentes compuestos a alimentar , en
   % base al aminoacido a ajustar (GLU). Con esos coeficientes se redefinen las
21 % composiciones de la alimentacion
23 AJUSTE_FEED = ajustefeed_fedbatch(t,D,COMP_FEED_Exp,FinAA,FinGLC);
25 % Ya calculados los coeficientes , se redefinen las composiciones mediante el
    % producto del coeficiente con la concentracion del aminoacido de referencia.
    % Las composiciones estan definidas en el vector P.

```

## Anexo F

# Simulaciones obtenidas para el ajuste 1 (cultivo fed-batch)

Las siguientes figuras corresponden a las predicciones obtenidas mediante la resolución del modelo matemático de la plataforma, para la etapa de diseño fed-batch no optimizado. Se presentan gráficos sobre:

- Resolución del sistema dinámico (simulación original), mostrando las concentraciones ajustables, el volumen del cultivo y las alimentaciones predichas.
- Aproximación de la resolución del sistema en pulsos y escalones, mostrando las concentraciones ajustables (con el rango de tolerancia), el volumen de cultivo y las integrales de las alimentaciones.
- Aproximación de los flujos a alimentar, a pulsos y escalones. Se diferencia el flujo de glucosa del de aminoácidos.
- Flujos a alimentar de acuerdo con el rango factible de las bombas.

Como se observa en la continuación, al utilizar una composición ajustada no hay variación de comportamientos de las curvas de concentraciones y volumen con respecto al uso de una composición estándar. Sólo hay cambio en los valores obtenidos.

## F.1. Simulación con composición estandarizada

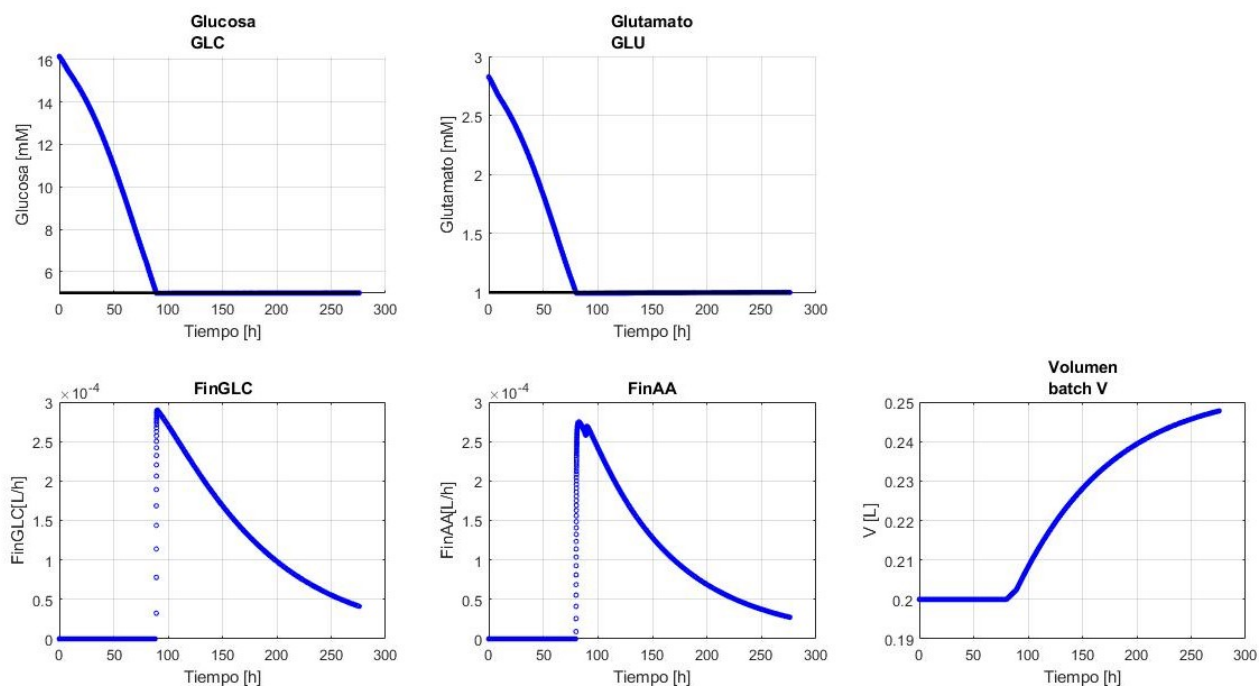


Figura F.1: Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch no optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

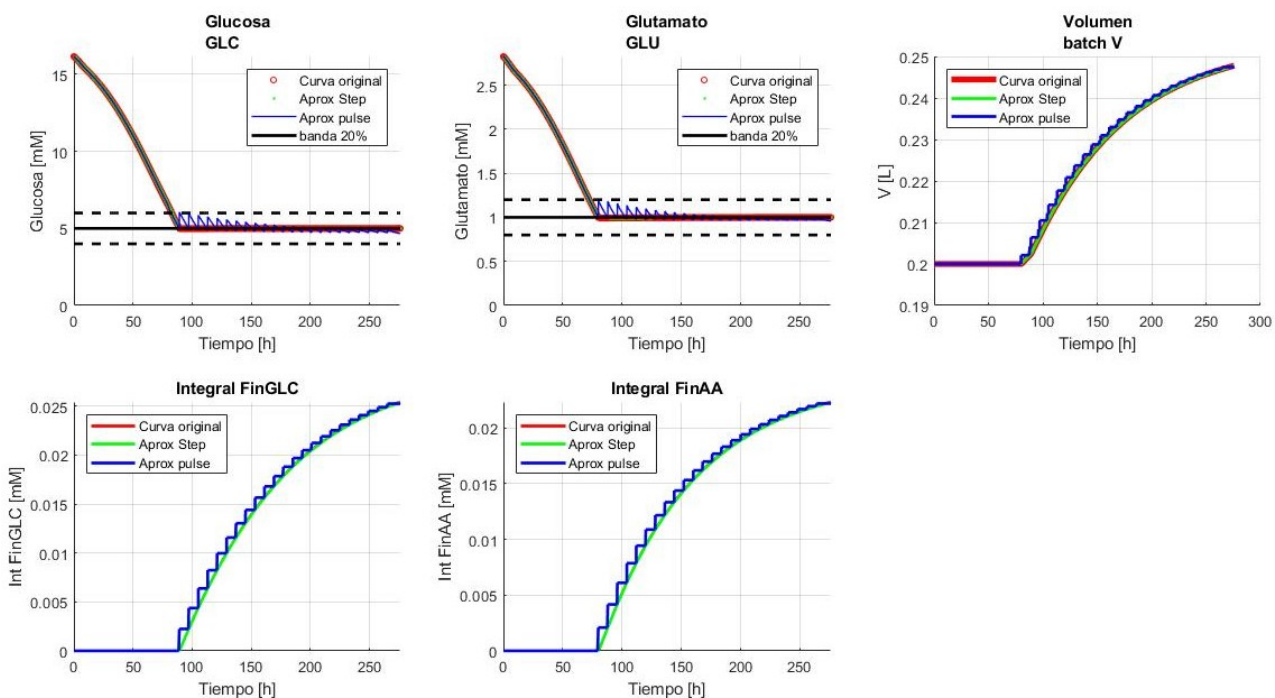


Figura F.2: Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

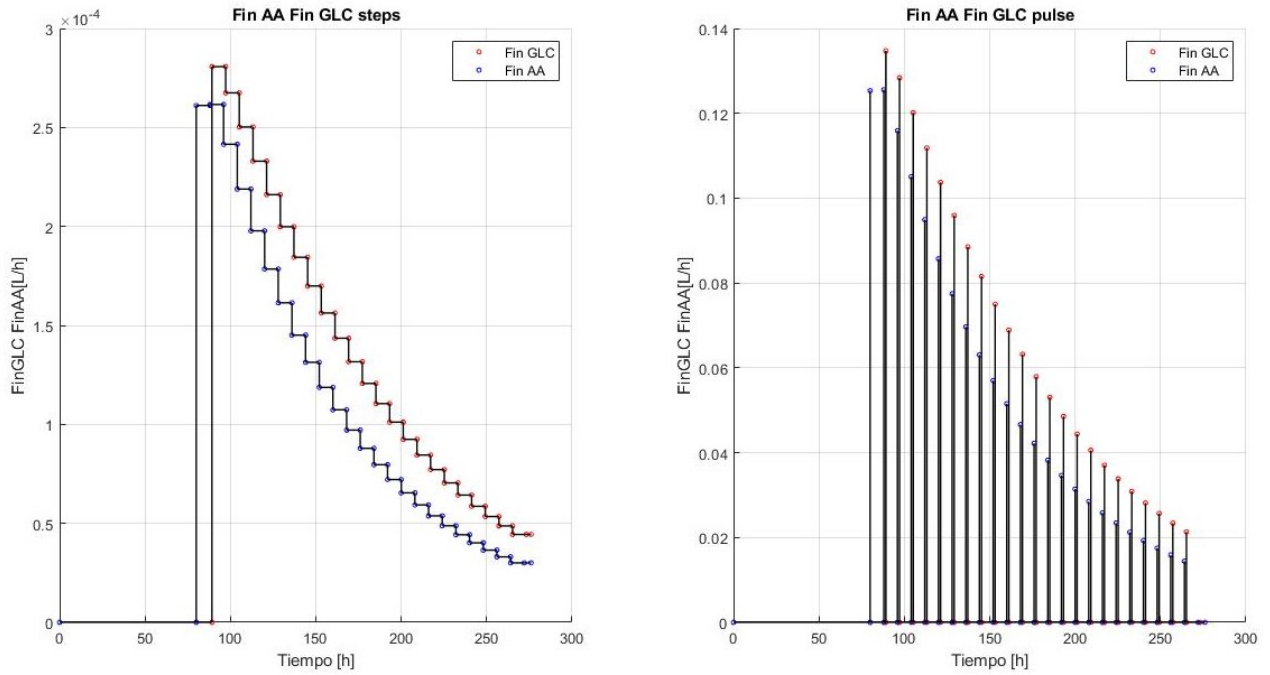


Figura F.3: Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

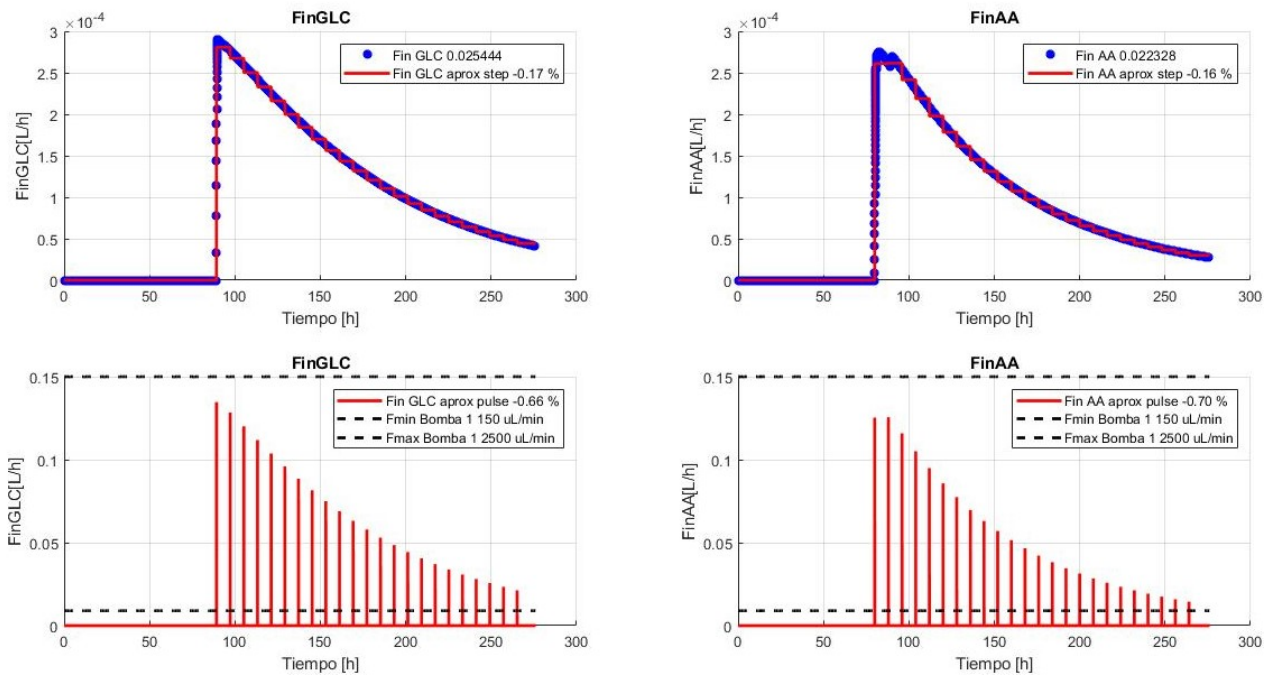


Figura F.4: Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch no optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

## F.2. Simulación con composición ajustada

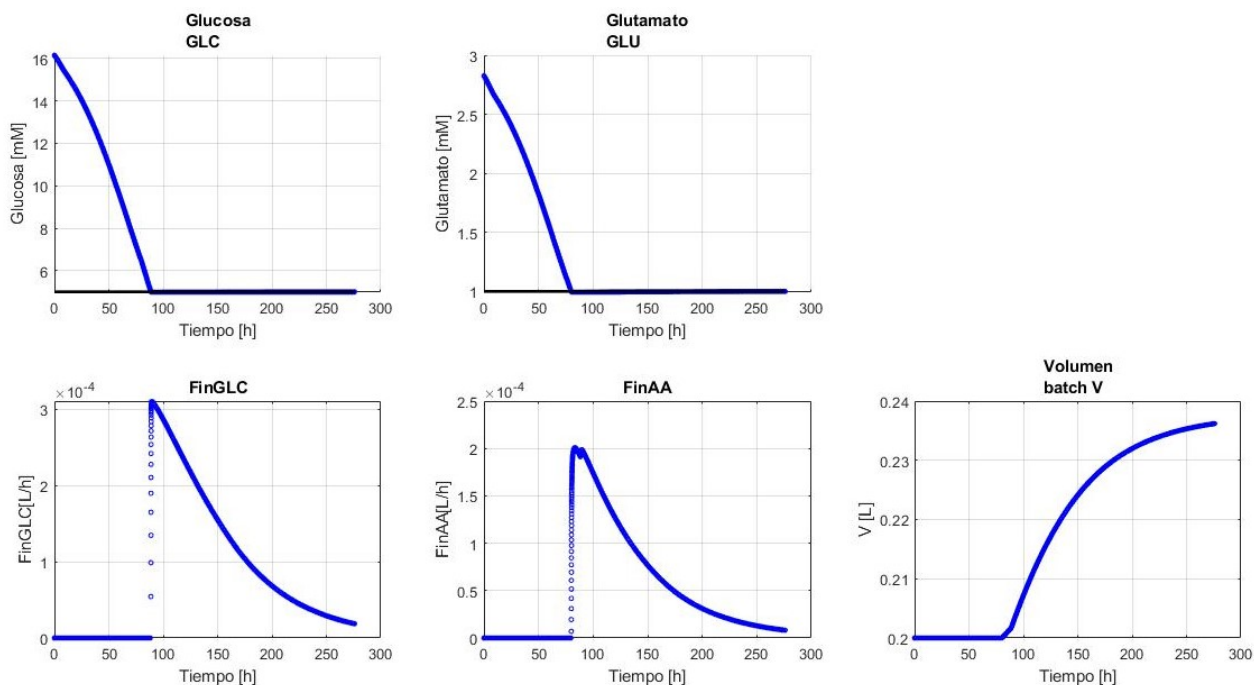


Figura F.5: Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch no optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

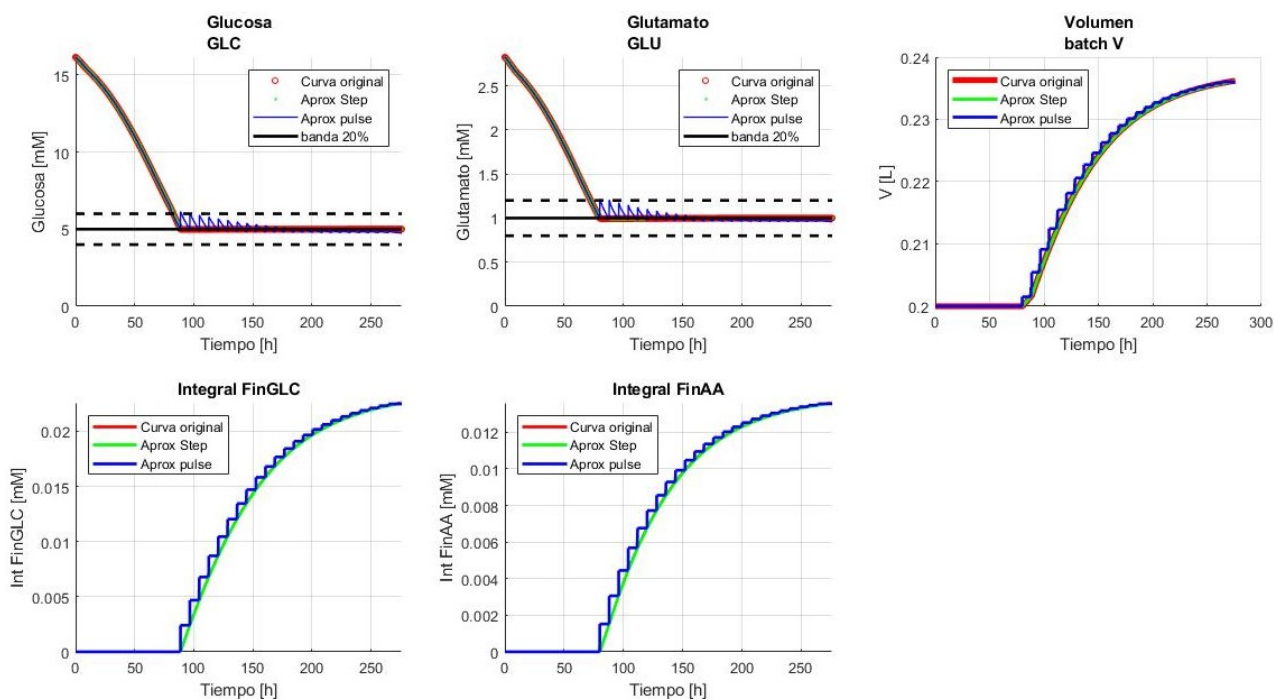


Figura F.6: Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

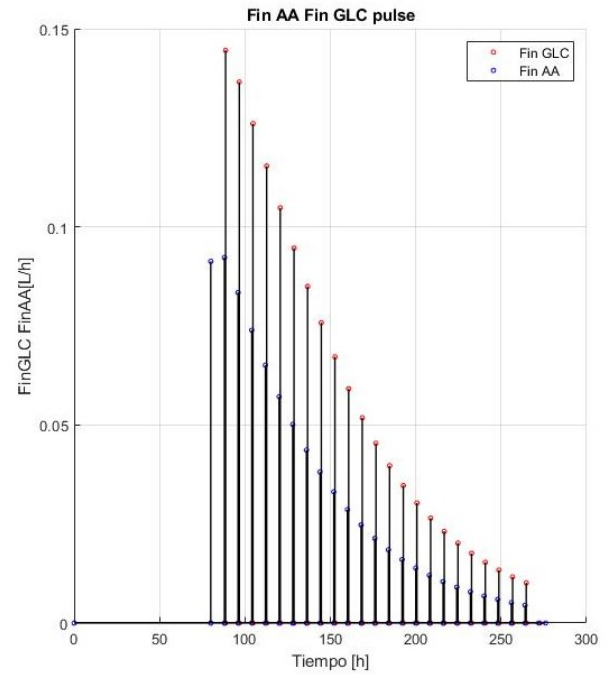
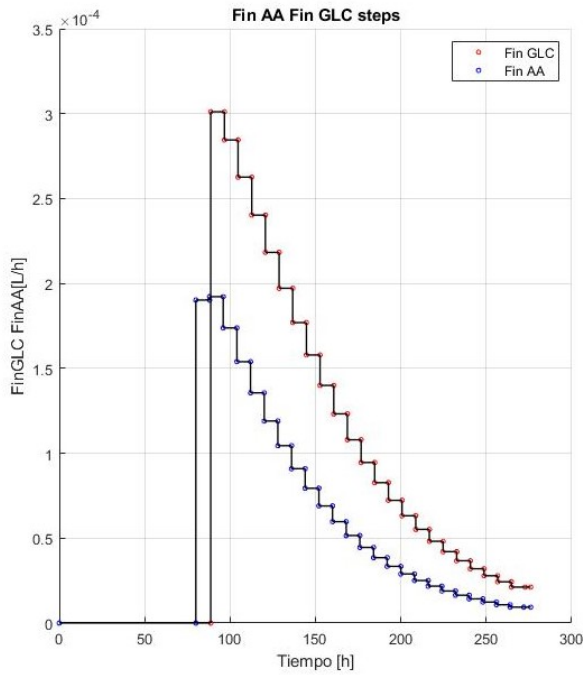


Figura F.7: Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

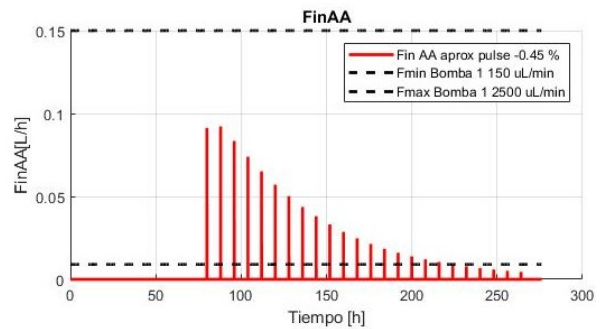
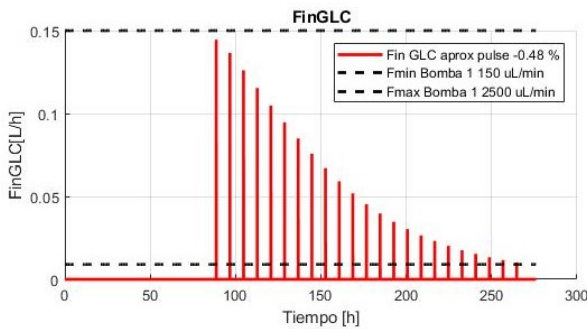
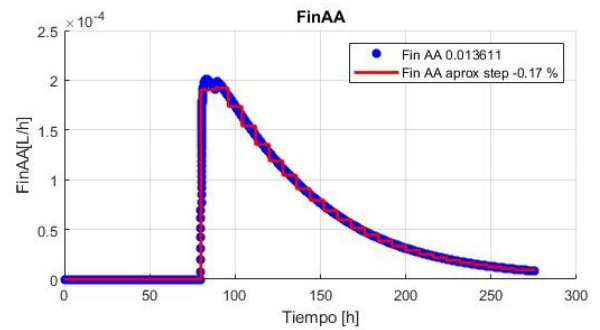
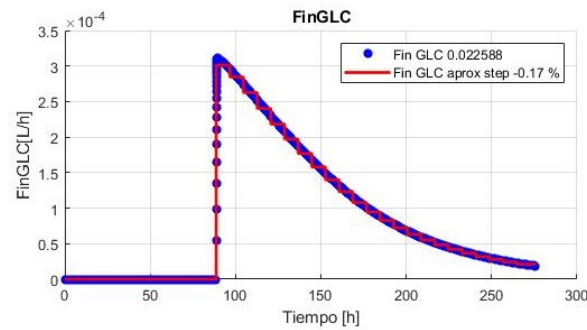


Figura F.8: Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch no optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

## Anexo G

# Simulaciones obtenidas para el ajuste 2 (cultivo fed-batch optimizado)

Las siguientes figuras corresponden a las predicciones obtenidas mediante la resolución del modelo matemático de la plataforma, para la etapa de diseño fed-batch optimizado. Se presentan gráficos sobre:

- Resolución del sistema dinámico (simulación original), mostrando las concentraciones ajustables, el volumen del cultivo y las alimentaciones predichas.
- Aproximación de la resolución del sistema en pulsos y escalones, mostrando las concentraciones ajustables (con el rango de tolerancia), el volumen de cultivo y las integrales de las alimentaciones.
- Aproximación de los flujos a alimentar, a pulsos y escalones. Se diferencia el flujo de glucosa del de aminoácidos.
- Flujos a alimentar de acuerdo con el rango factible de las bombas.

Como se observa en la continuación, al utilizar una composición ajustada no hay variación de comportamientos de las curvas de concentraciones y volumen con respecto al uso de una composición estándar. Sólo hay cambio en los valores obtenidos.

## G.1. Simulación con composición estandarizada

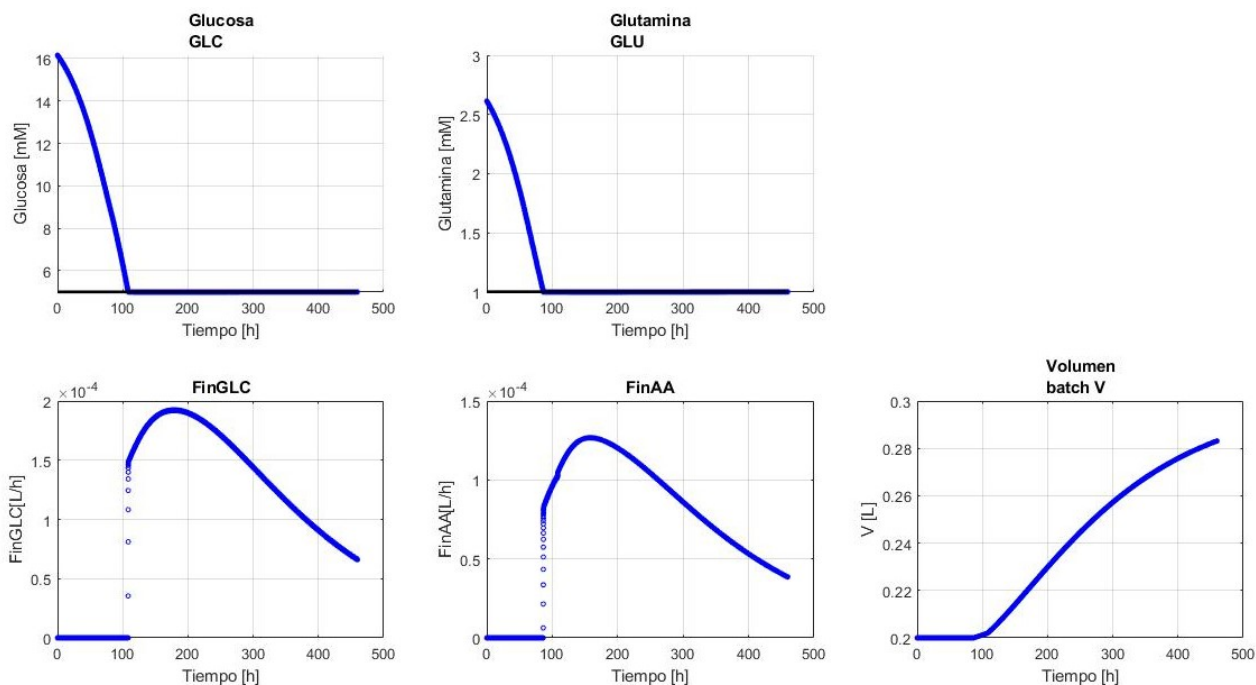


Figura G.1: Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

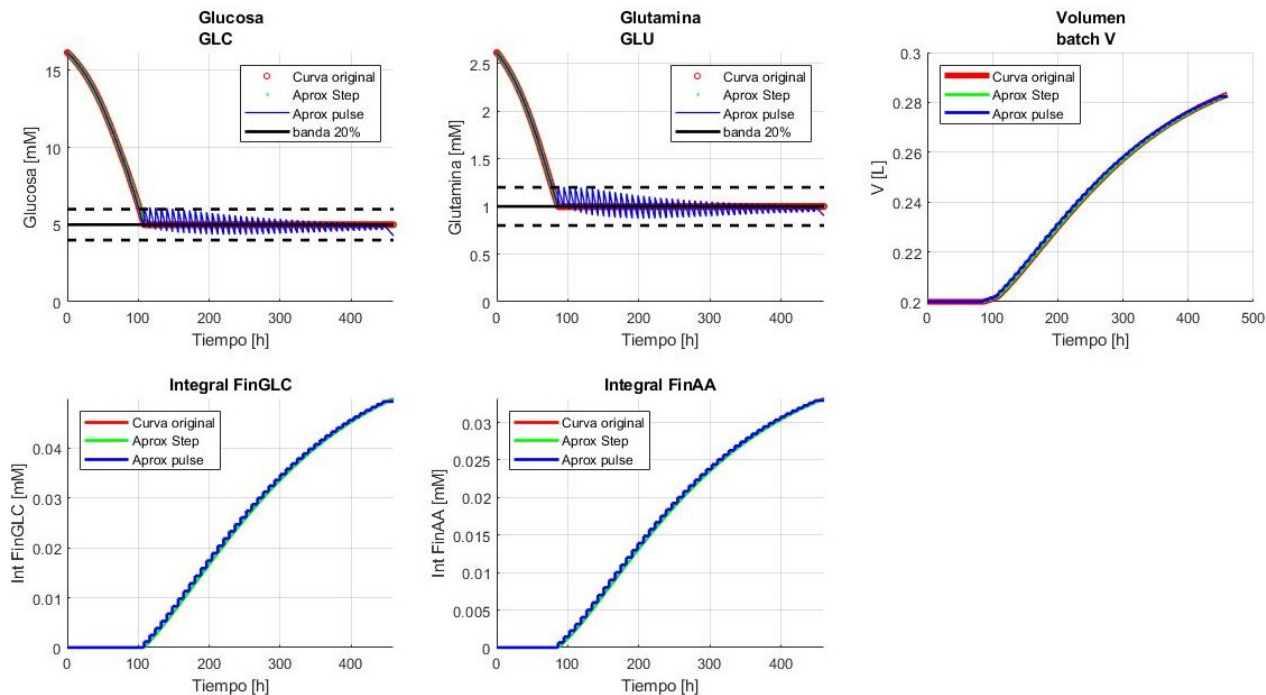


Figura G.2: Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB.



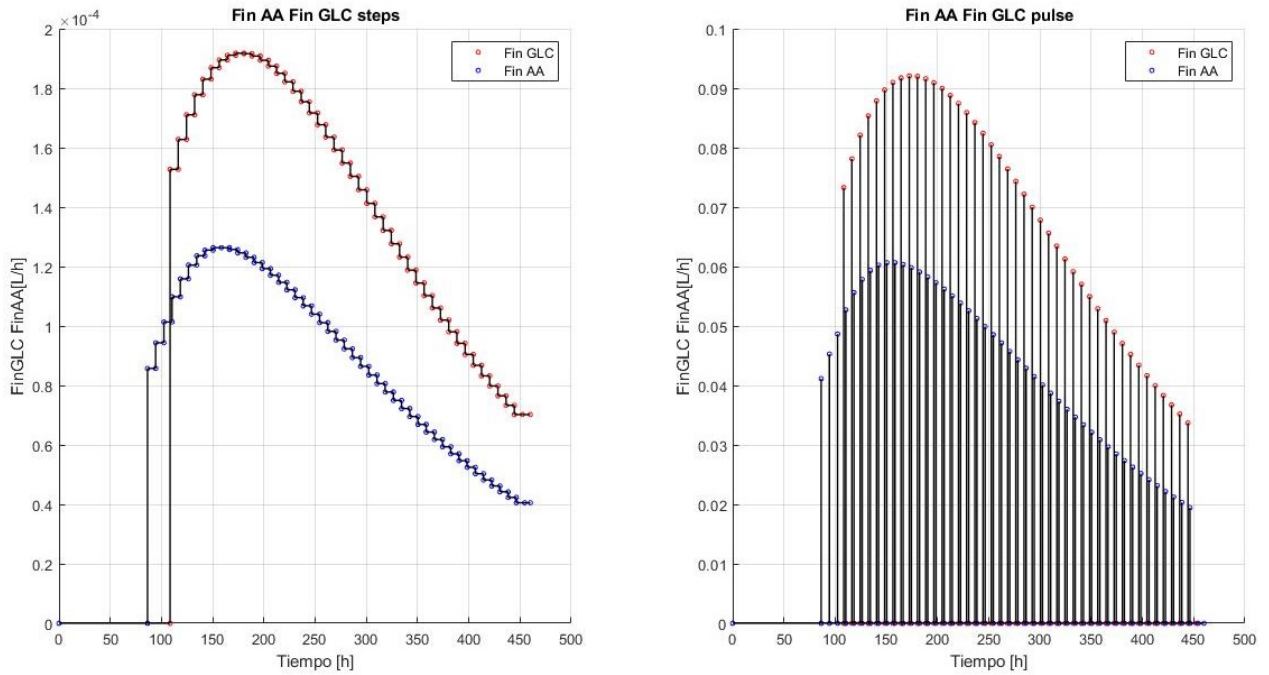


Figura G.3: Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

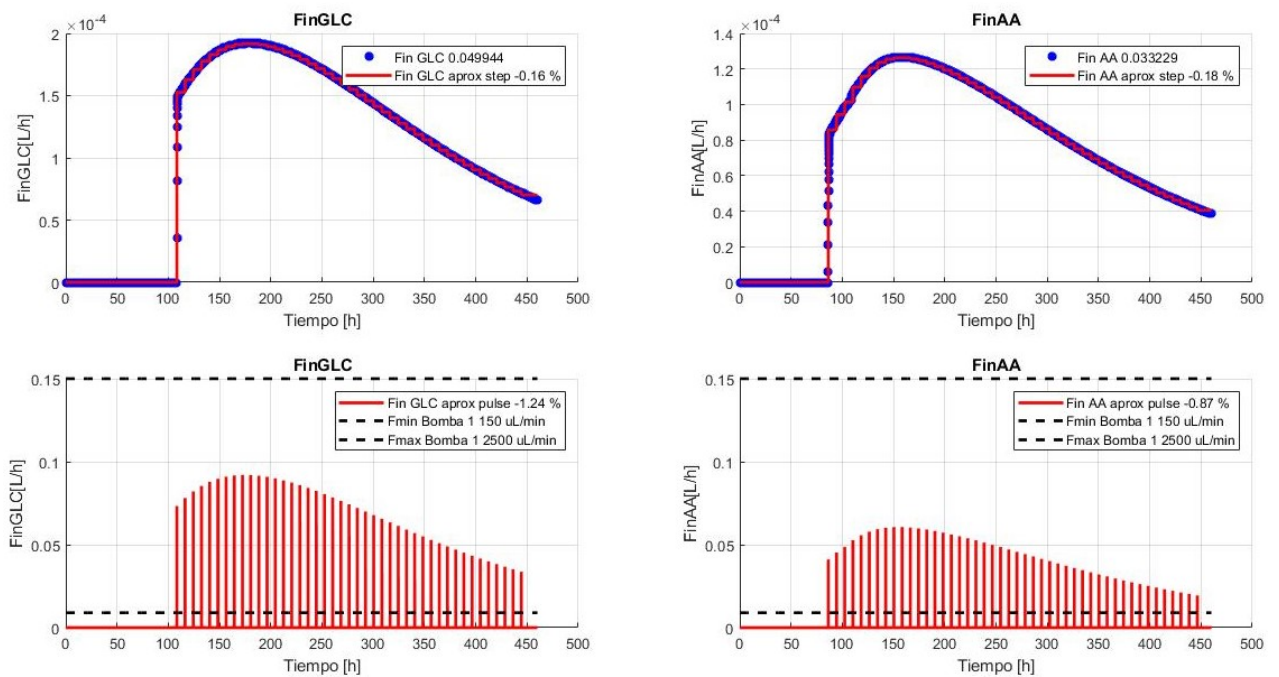


Figura G.4: Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch optimizado con composición estándar. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

## G.2. Simulación con composición ajustada

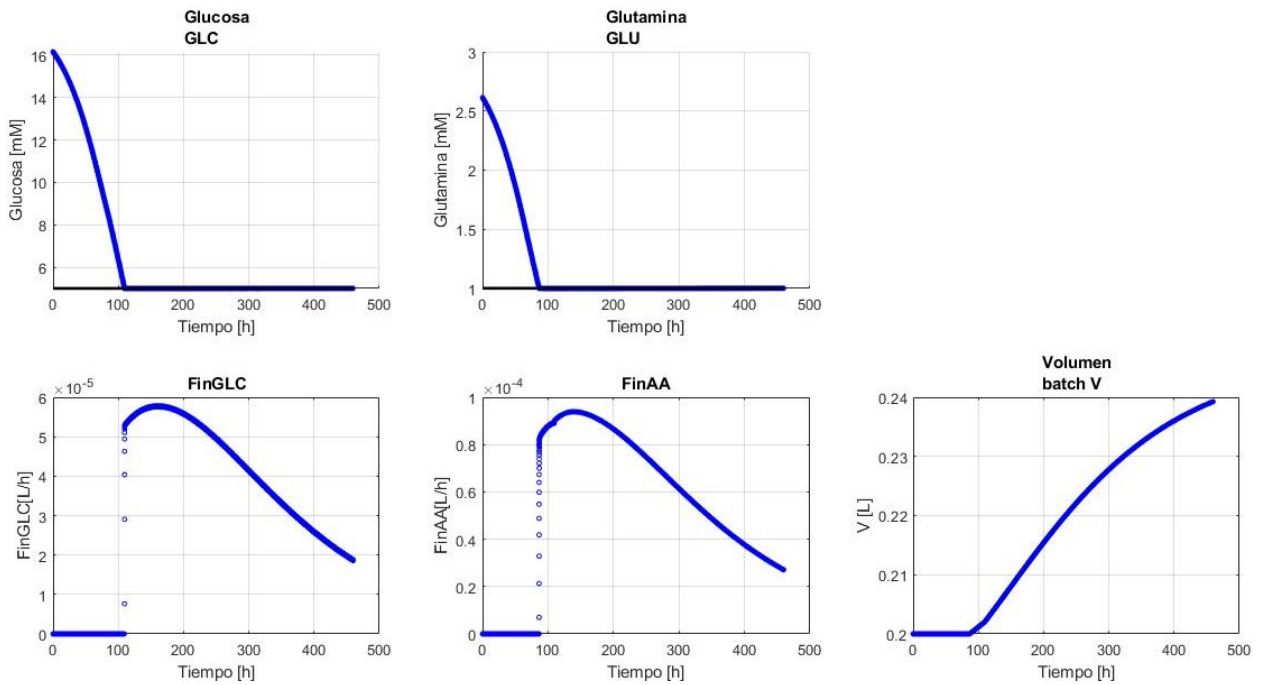


Figura G.5: Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

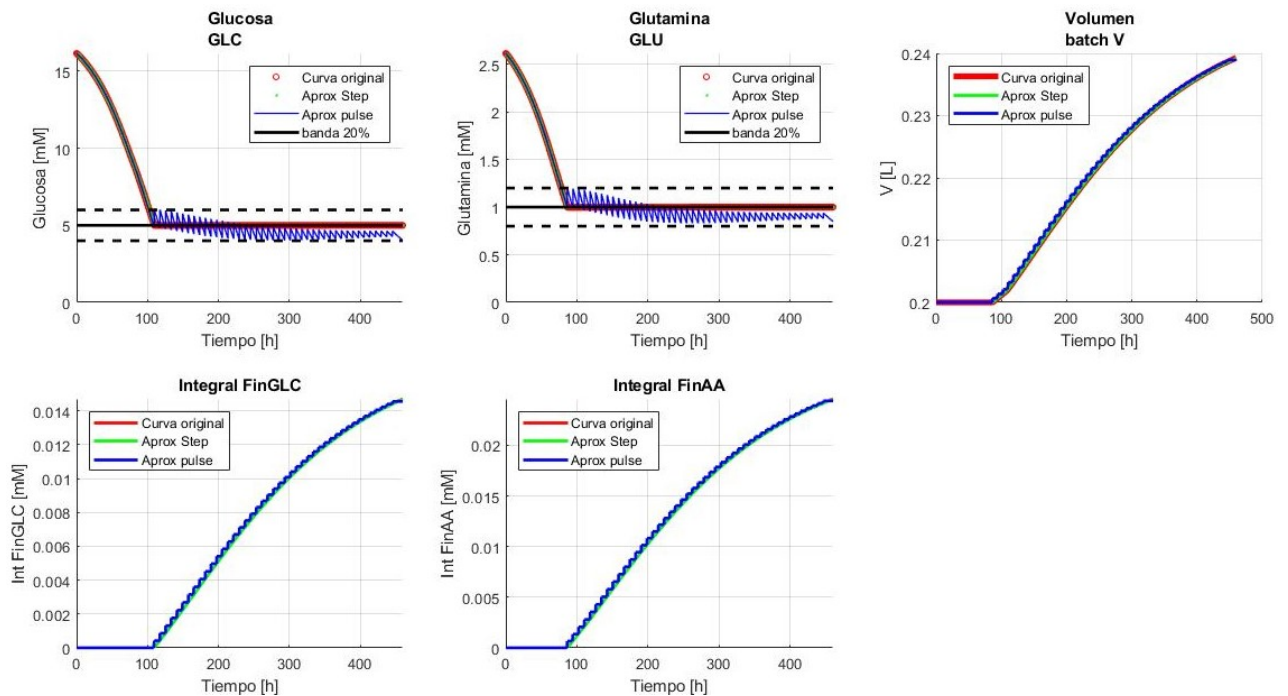


Figura G.6: Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

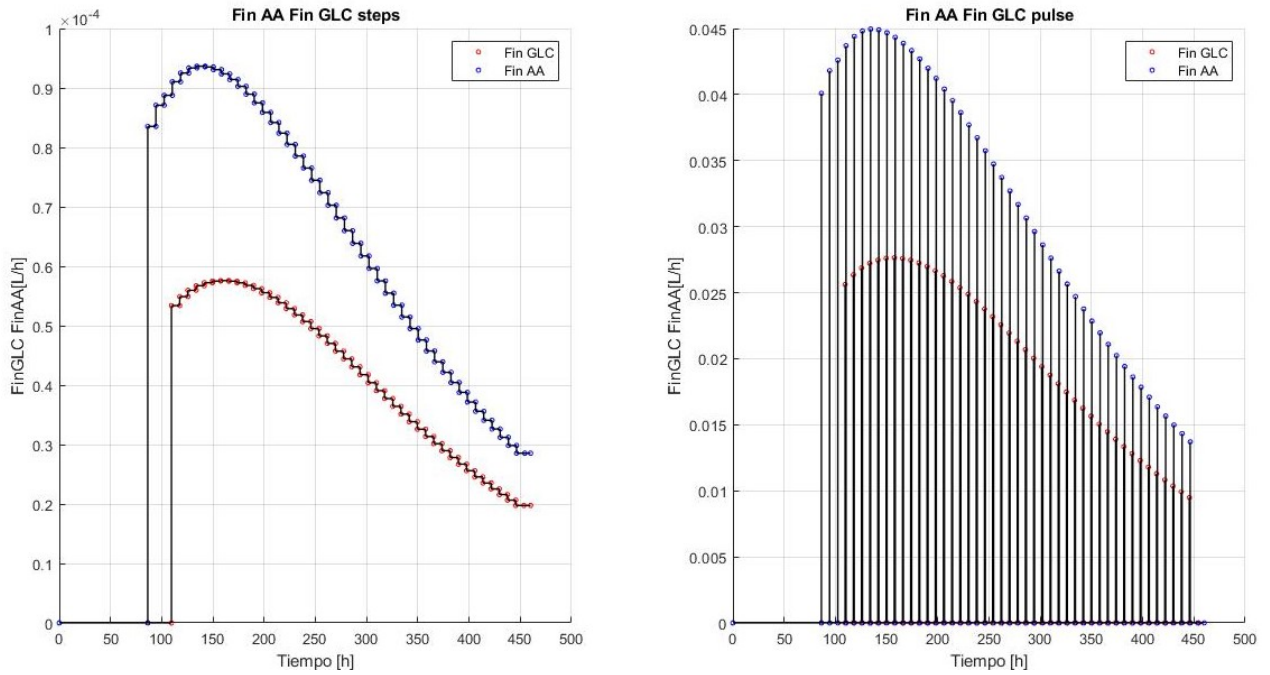


Figura G.7: Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

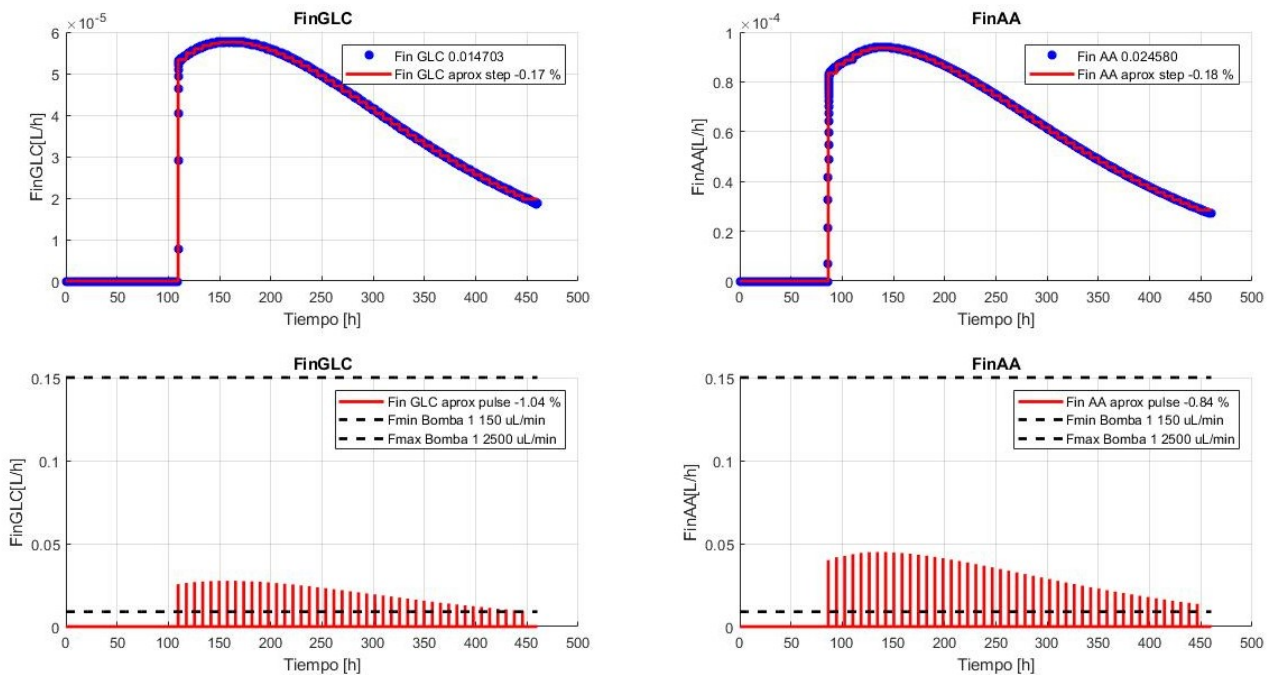


Figura G.8: Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch optimizado con composición ajustada. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

# Anexo H

## Análisis de consumos y tasas específicas en cultivos a escala de laboratorio

Tabla H.1: Comportamientos globales de las concentraciones y tasas de consumo de cada aminoácido medido en el cultivo batch.

Aminoácido	Cultivo batch	
	$S_i$	$q_{s,i}$
Glu / Gln	Consumo con depleción	$\geq 0$ , decreciente
Arg	Consumo hasta valor cte. (90 horas)	$\geq 0$ , decreciente
Asp	<i>Shift</i> (acumulación y luego consumo)	Cambio de signo a las 40 horas
Asn	<i>Shift</i> (acumulación y luego consumo)	Cambio de signo a las 40 horas
Leu	Consumo con depleción	$\geq 0$ , decreciente
Ile	Consumo	$\geq 0$ , decreciente
Lys	Consumo con depleción	$\geq 0$ , decreciente
Pro	<i>Shift</i> (acumulación y luego consumo)	Cambio de signo a las 40 horas
His	Consumo con depleción	$\geq 0$ , decreciente
Val	Consumo con depleción	$\geq 0$ , decreciente
Met	Consumo con depleción	$\geq 0$ , decreciente
Thr	Consumo hasta valor cte.	$\geq 0$ , decreciente
Gly	<i>Shift</i> (acumulación y luego consumo)	Cambio de signo a las 40 horas
Ser	<i>Shift</i> (acumulación y luego consumo)	Cambio de signo a las 40 horas
Phe	Consumo con depleción	$\geq 0$ , decreciente
Tyr	Consumo hasta valor cte.	$\geq 0$ , decreciente
Trp	-	-
Cys	Consumo hasta valor cte.	$\geq 0$ , decreciente
Ala	<i>Shift</i> (acumulación y luego consumo)	Cambio de signo a las 70 horas
Gln / Glu	<i>Shift</i> (acumulación y luego consumo)	Cambio de signo a las 40 horas

Tabla H.2: Comportamientos globales de las concentraciones y tasas de consumo de cada aminoácido medido en el cultivo fed-batch.

Aminoácido	Cultivo fed-batch preliminar	
	$S_i$	$q_{S,i}$
Glu / Gln	Acumulación hasta valor cte. (80 horas)	$\leq 0$ , creciente
Arg	Consumo hasta valor cte. (30 horas)	$\geq 0$ , decreciente
Asp	Acumulación hasta valor cte. (50 horas)	$\leq 0$ , creciente
Asn	<i>Shift</i> (acumulación y luego consumo hasta valor cte.)	Cambio de signo a las 50 horas
Leu	Concentración pseudo-cte.	$\geq 0$ , pseudo-cte.
Ile	Concentración pseudo-cte.	$\geq 0$ , pseudo-cte.
Lys	Consumo hasta valor cte. (80 horas)	$\geq 0$ , decreciente
Pro	Acumulación hasta valor cte. (50 horas)	$\leq 0$ , creciente
His	Consumo hasta valor cte. (50 horas)	$\geq 0$ , decreciente
Val	Concentración pseudo-cte.	$\geq 0$ , pseudo-cte.
Met	Consumo hasta valor cte. (80 horas)	$\geq 0$ , decreciente
Thr	Concentración pseudo-cte.	$\geq 0$ , pseudo-cte.
Gly	Acumulación hasta valor cte. (80 horas)	$\leq 0$ , creciente
Ser	<i>Shift</i> (acumulación y luego consumo hasta valor cte.)	Cambio de signo a las 80 horas
Phe	Consumo hasta valor cte. (80 horas)	$\geq 0$ , decreciente
Tyr	Acumulación hasta valor cte. (80 horas)	$\leq 0$ , creciente
Trp	Consumo hasta valor cte. (80 horas)	$\geq 0$ , decreciente
Cys	Acumulación hasta valor cte. (100 horas)	$\leq 0$ , creciente
Ala	<i>Shift</i> (acumulación y luego consumo hasta valor cte.)	Cambio de signo a las 50 horas
Gln / Glu	Consumo hasta valor cte. (80 horas)	$\geq 0$ , decreciente

# Anexo I

## Simulaciones obtenidas para cultivo fed-batch preliminar con más de un ajuste de composición

Las siguientes figuras corresponden a las predicciones obtenidas mediante la resolución del modelo matemático de la plataforma, para la etapa de diseño fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición durante el cultivo. Se presentan gráficos sobre:

- Resolución del sistema dinámico (simulación original), mostrando las concentraciones ajustables, el volumen del cultivo y las alimentaciones predichas.
- Aproximación de la resolución del sistema en pulsos y escalones, mostrando las concentraciones ajustables (con el rango de tolerancia), el volumen de cultivo y las integrales de las alimentaciones.
- Aproximación de los flujos a alimentar, a pulsos y escalones. Se diferencia el flujo de glucosa del de aminoácidos.
- Flujos a alimentar de acuerdo con el rango factible de las bombas.
- Acumulación de tPA y productividad específica.
- Integral de concentración de células viables.

## I.1. Segundo ajuste de composición a las 90 horas

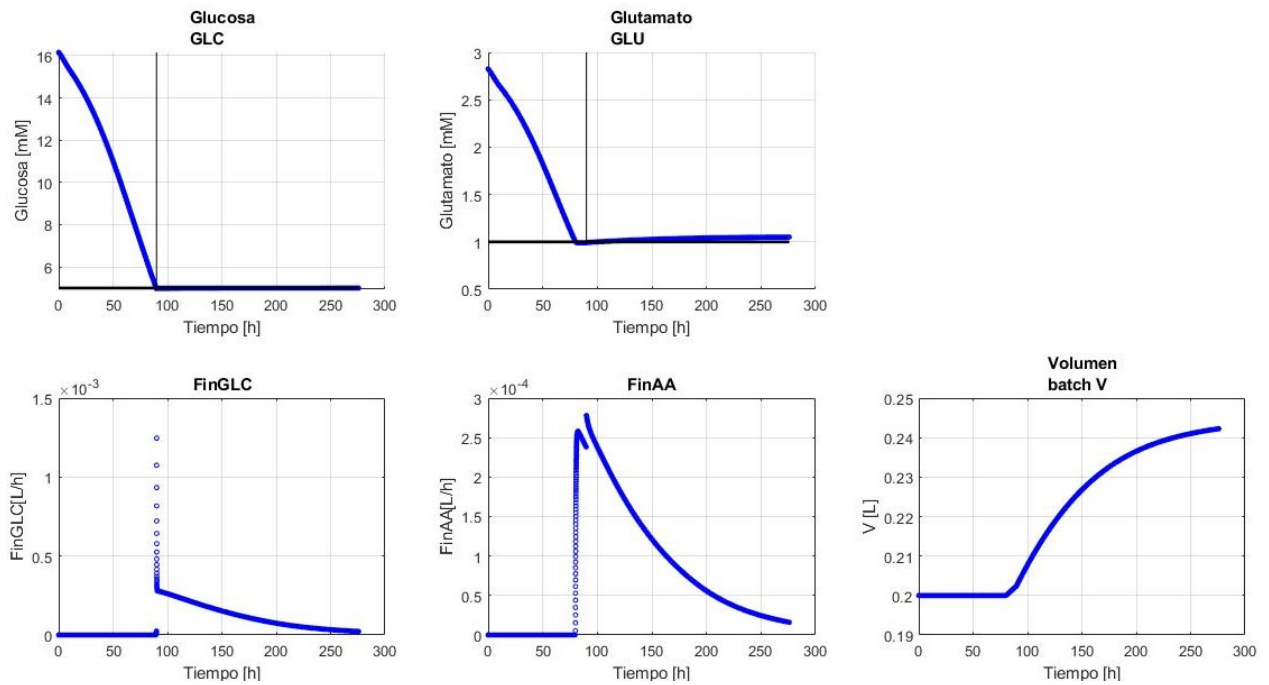


Figura I.1: Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 90 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

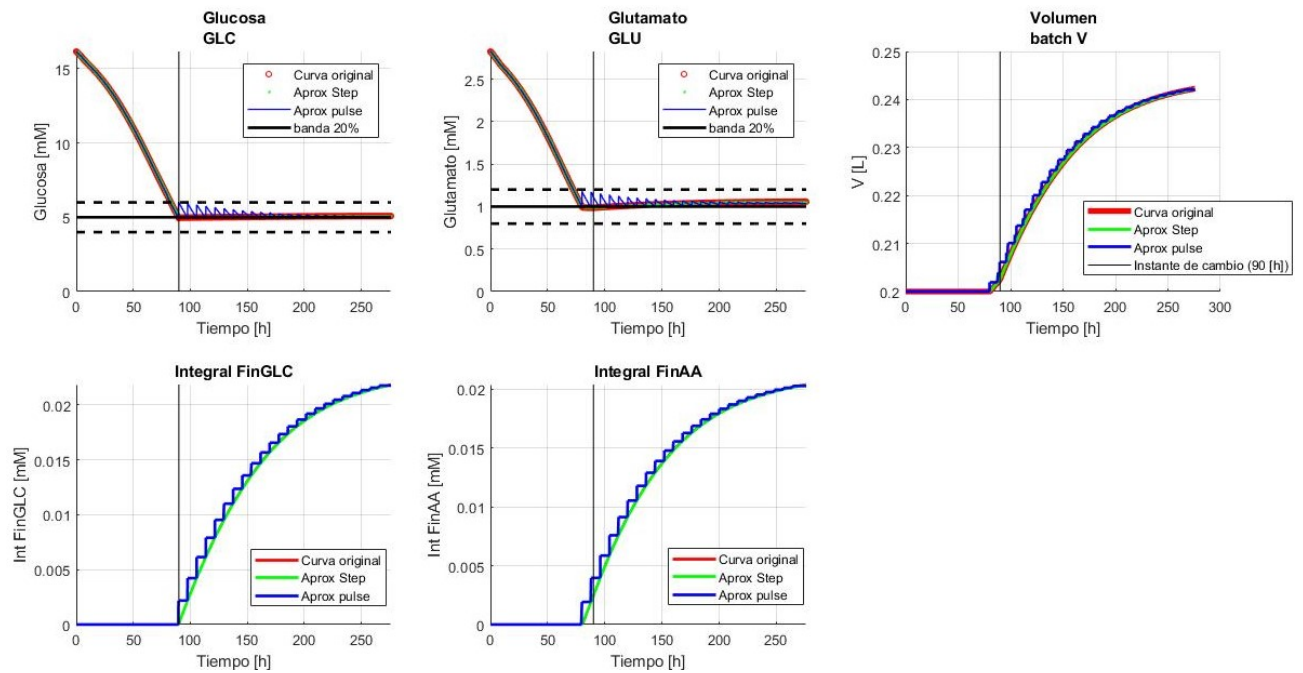


Figura I.2: Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 90 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

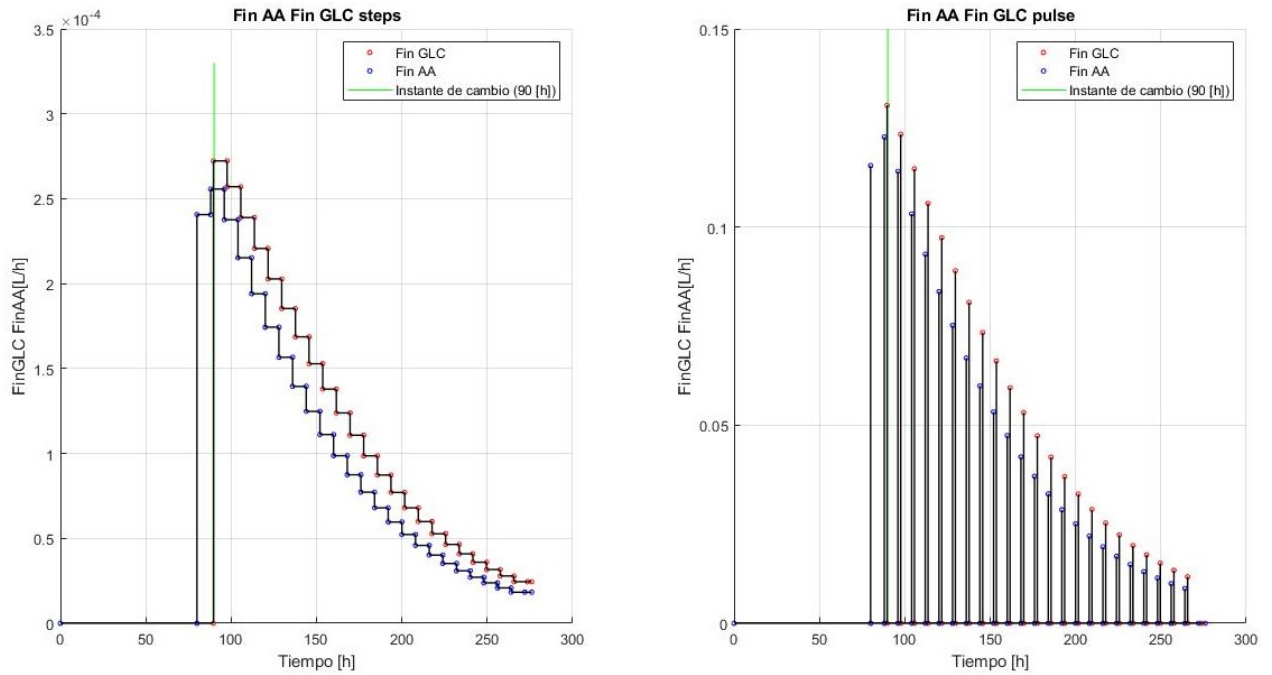


Figura I.3: Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo Fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 90 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

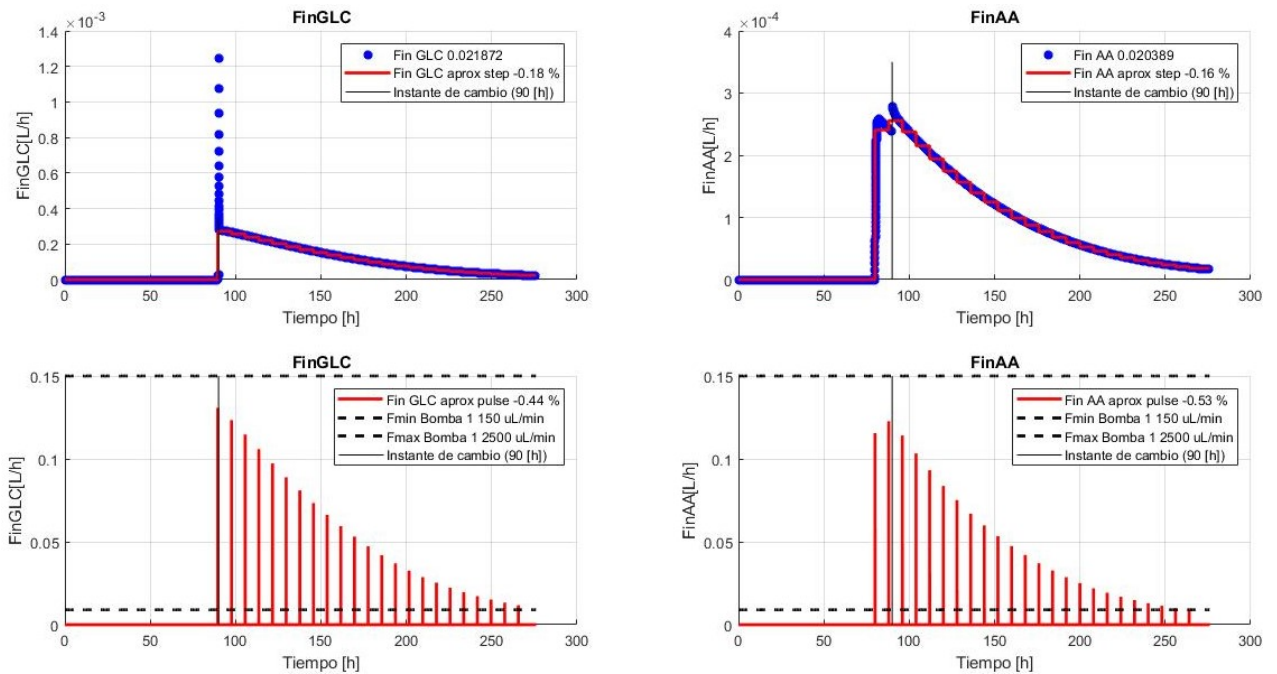


Figura I.4: Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 90 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.



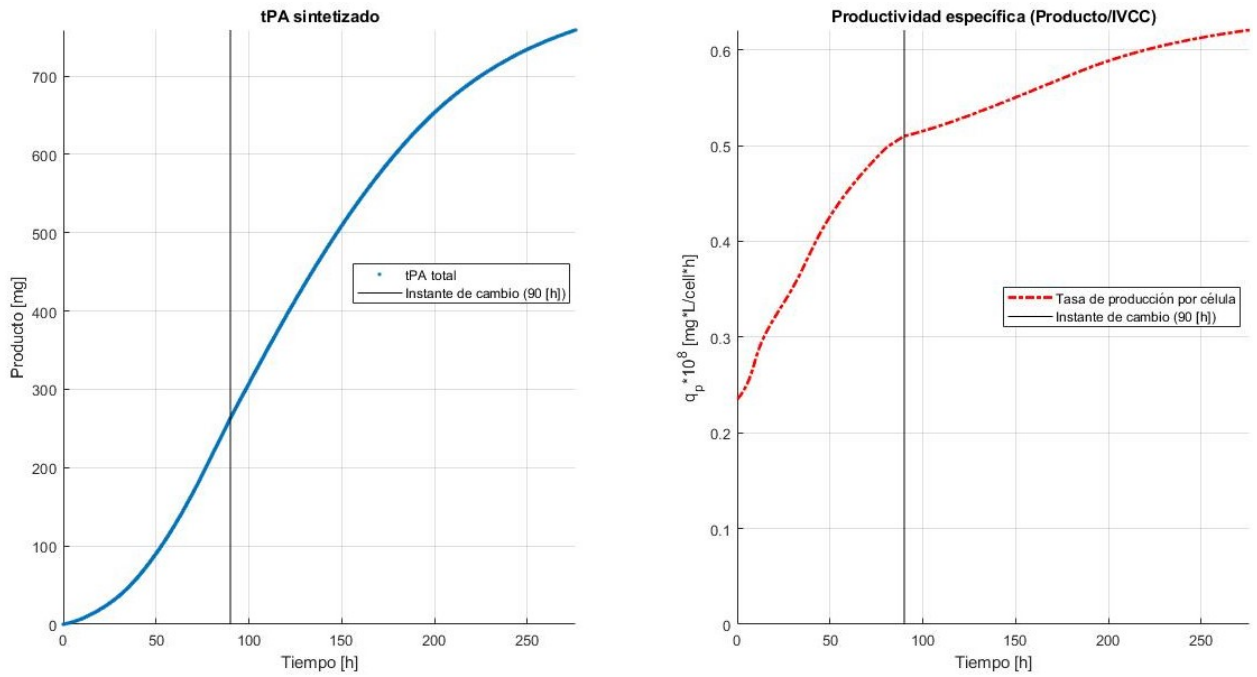


Figura I.5: Producción de tPA y productividad específica, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 90 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

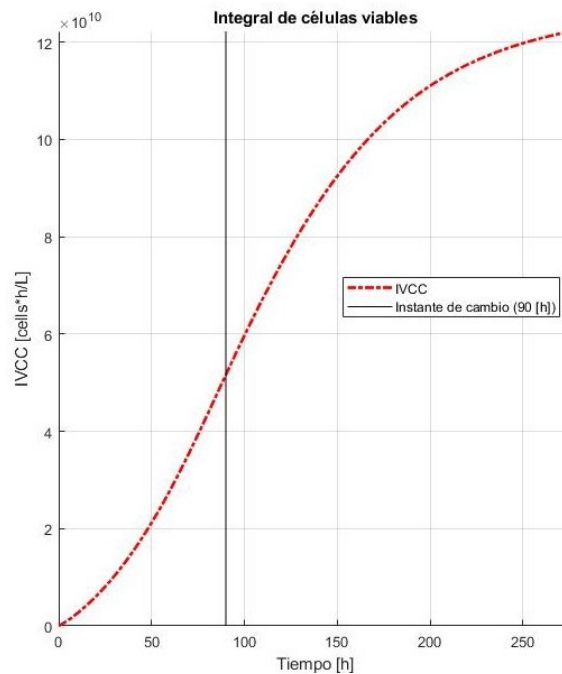


Figura I.6: Integral de células viables, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 90 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

## I.2. Segundo ajuste de composición a las 140 horas

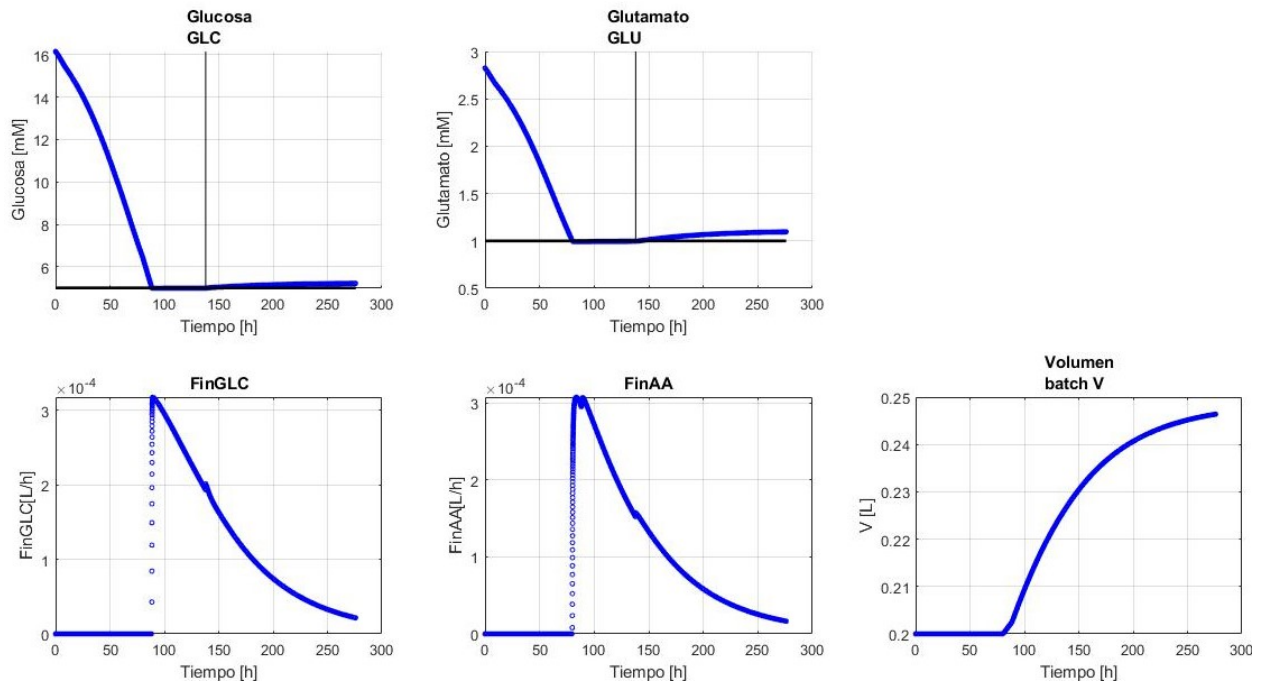


Figura I.7: Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 140 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

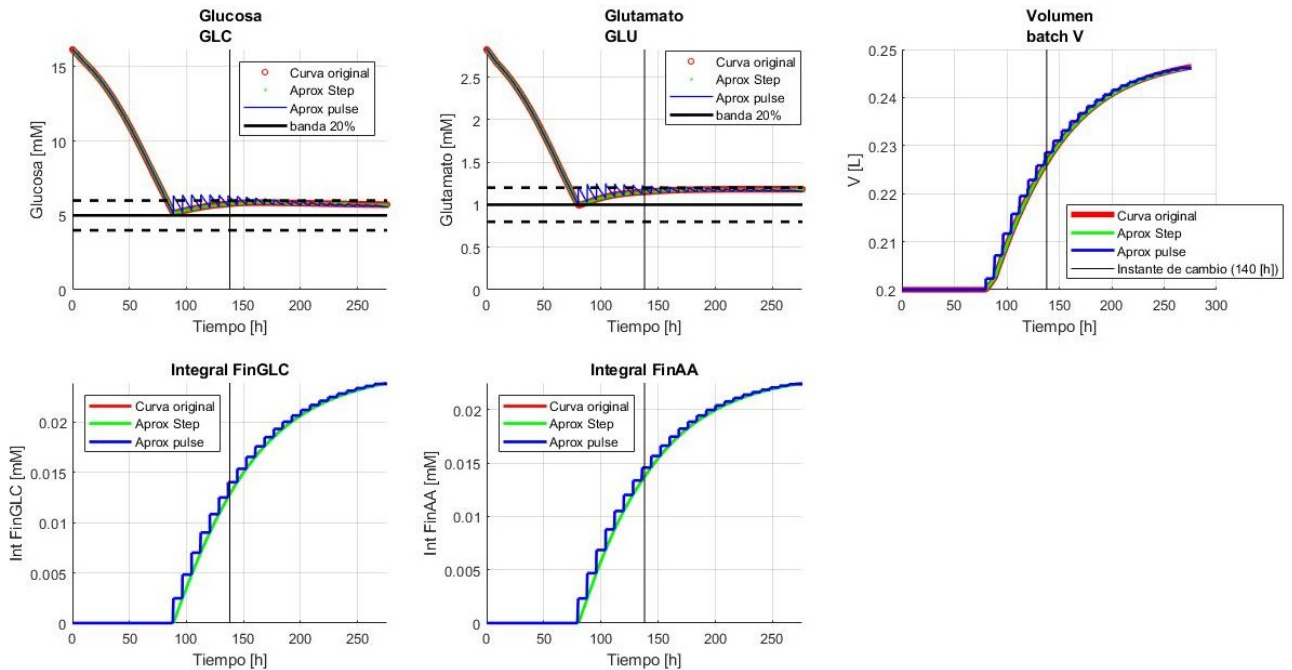


Figura I.8: Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 140 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

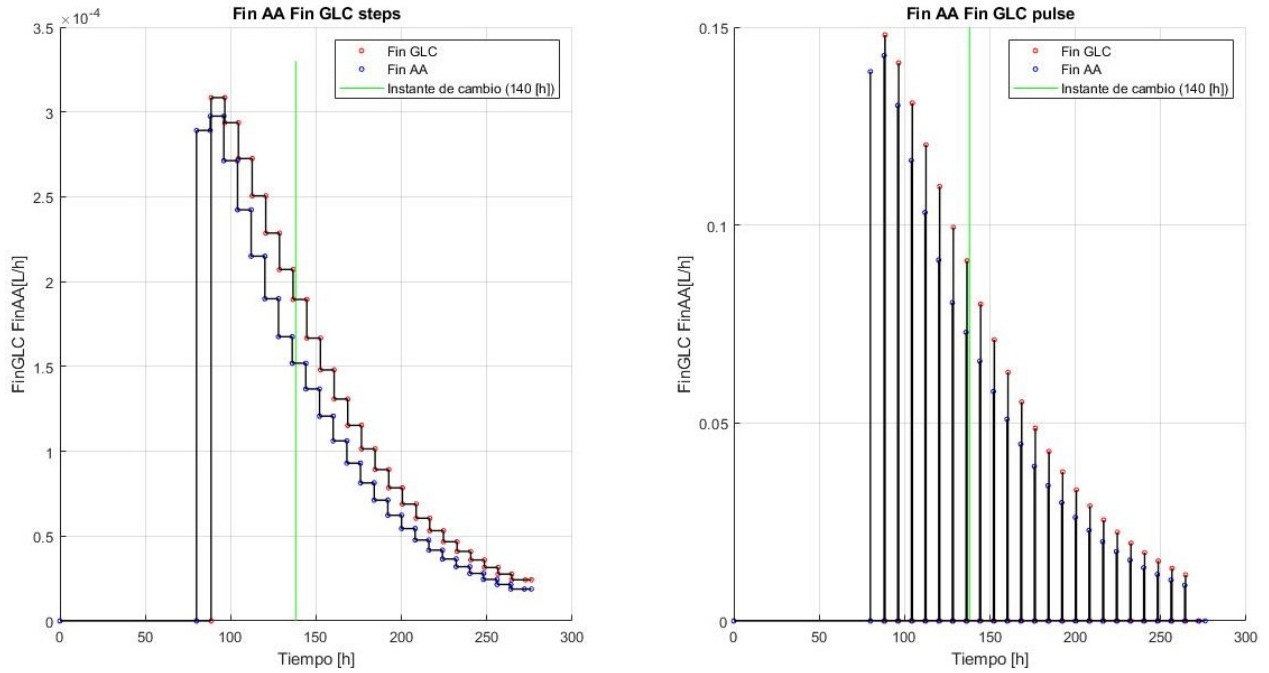


Figura I.9: Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 140 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

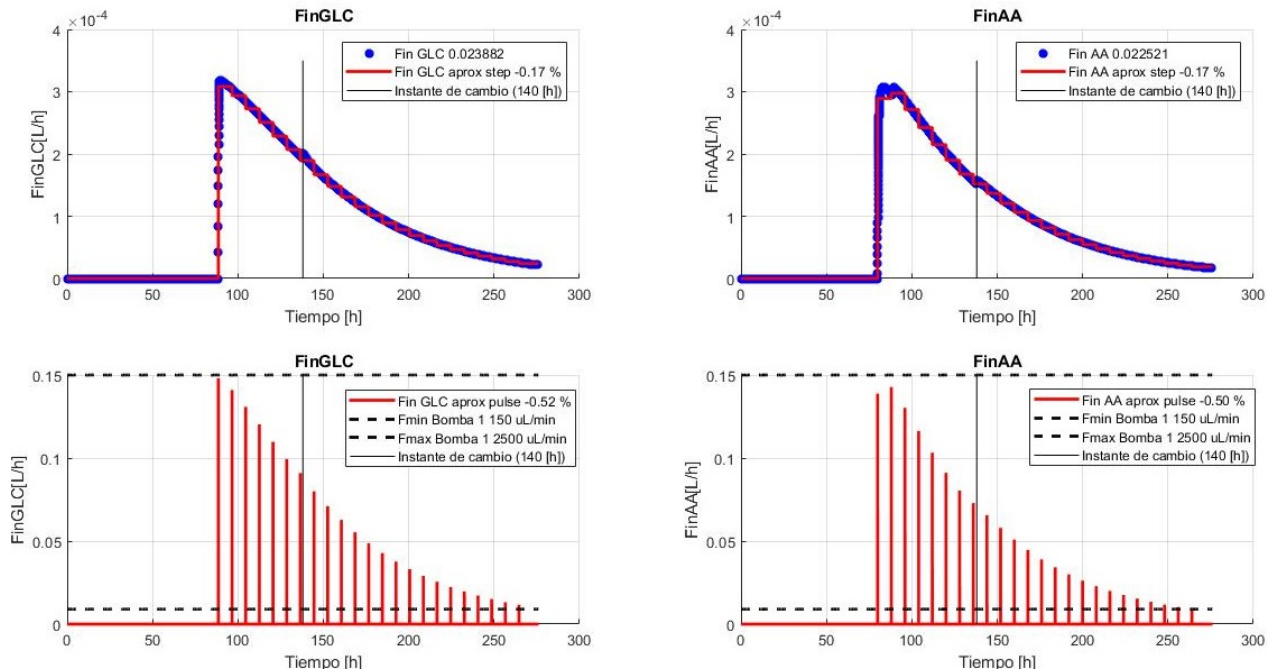


Figura I.10: Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 140 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

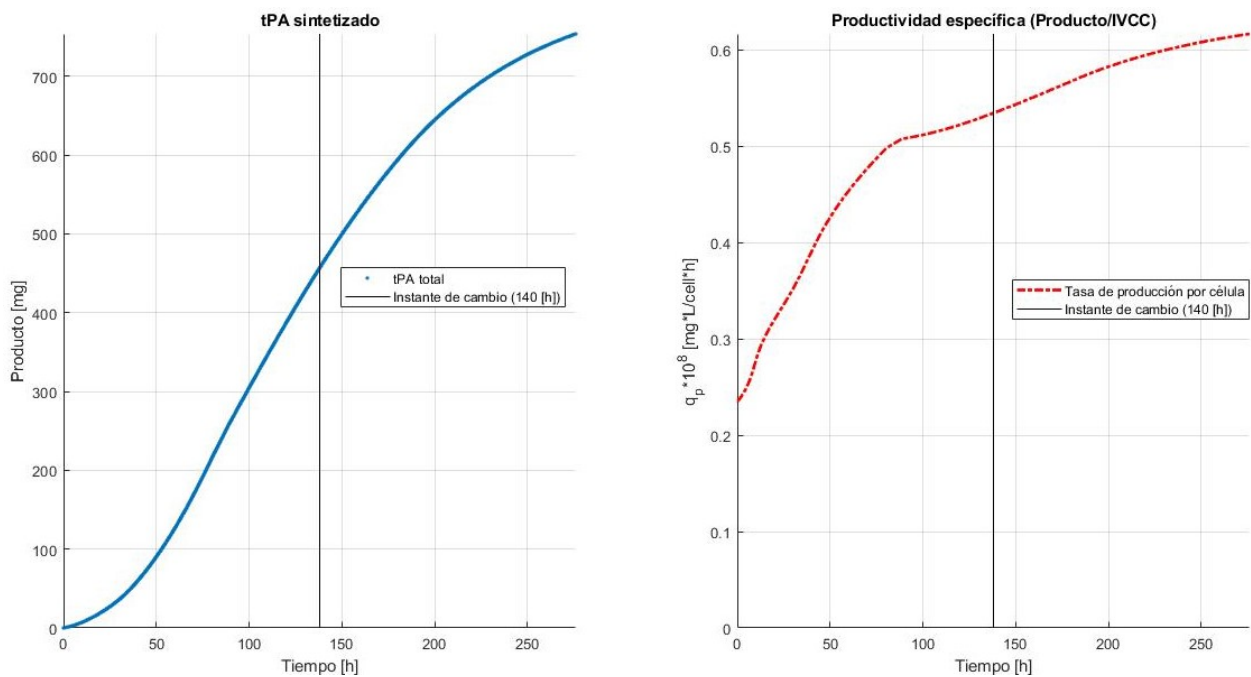


Figura I.11: Producción de tPA y productividad específica, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 140 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

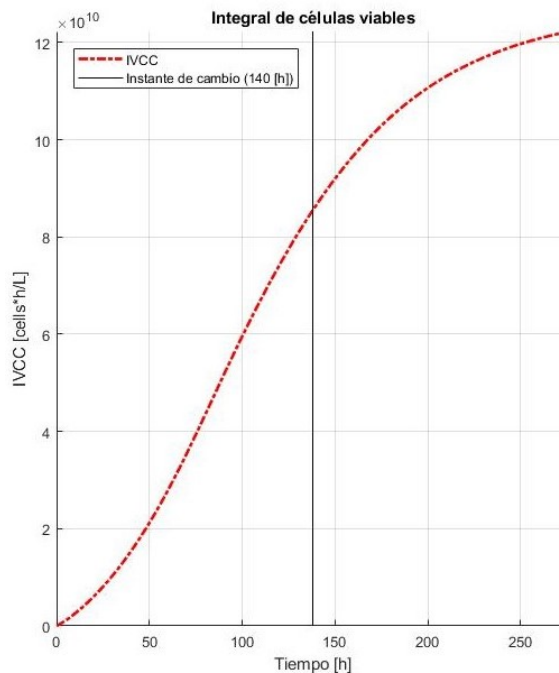


Figura I.12: Integral de células viables, para el cultivo fed-batch no optimizado con un segundo ajuste de composición a las 140 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

## Anexo J

# Simulaciones obtenidas para cultivo fed-batch optimizado con más de un ajuste de composición

Las siguientes figuras corresponden a las predicciones obtenidas mediante la resolución del modelo matemático de la plataforma, para la etapa de diseño fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición durante el cultivo. Se presentan gráficos sobre:

- Resolución del sistema dinámico (simulación original), mostrando las concentraciones ajustables, el volumen del cultivo y las alimentaciones predichas.
- Aproximación de la resolución del sistema en pulsos y escalones, mostrando las concentraciones ajustables (con el rango de tolerancia), el volumen de cultivo y las integrales de las alimentaciones.
- Aproximación de los flujos a alimentar, a pulsos y escalones. Se diferencia el flujo de glucosa del de aminoácidos.
- Flujos a alimentar de acuerdo con el rango factible de las bombas.
- Acumulación de tPA y productividad específica.
- Integral de concentración de células viables.

## J.1. Segundo ajuste de composición a las 85 horas

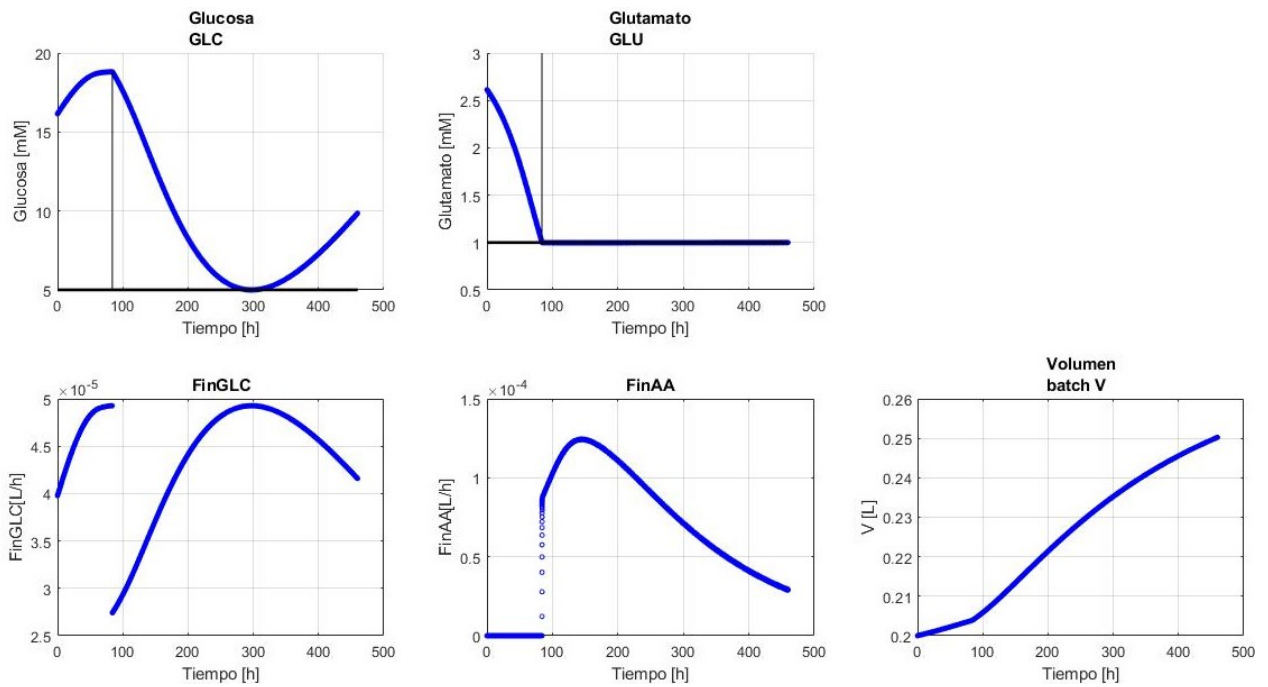


Figura J.1: Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

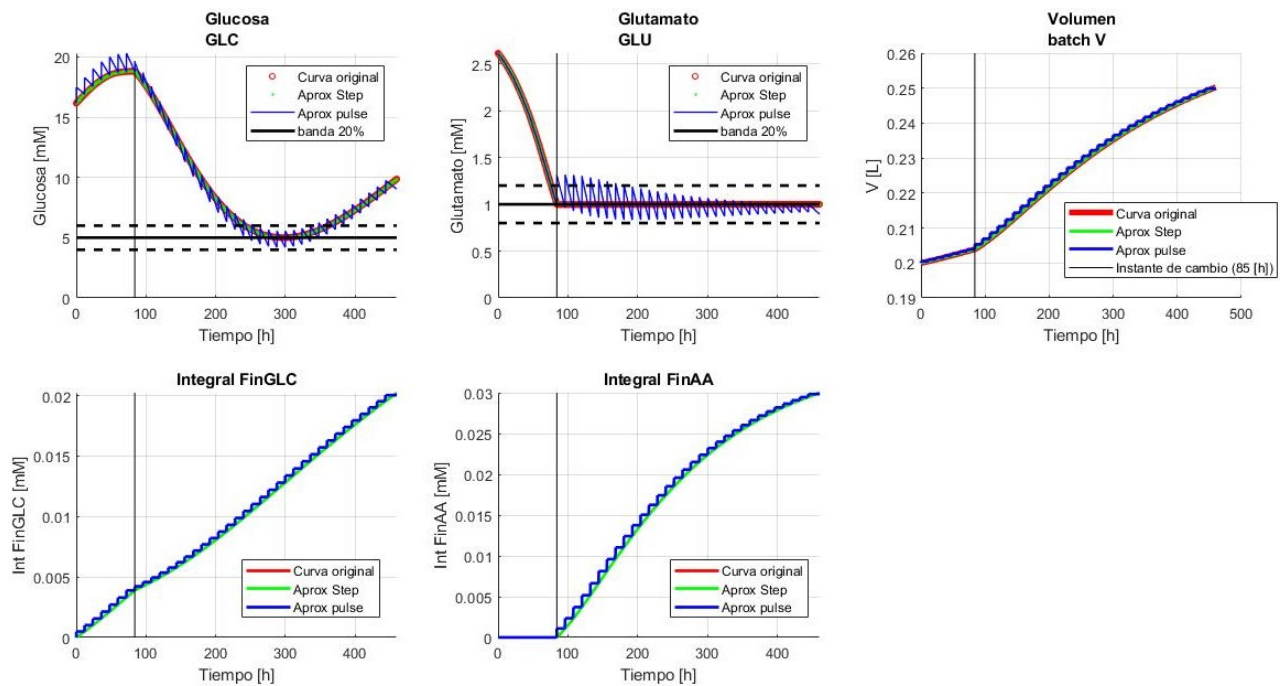


Figura J.2: Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

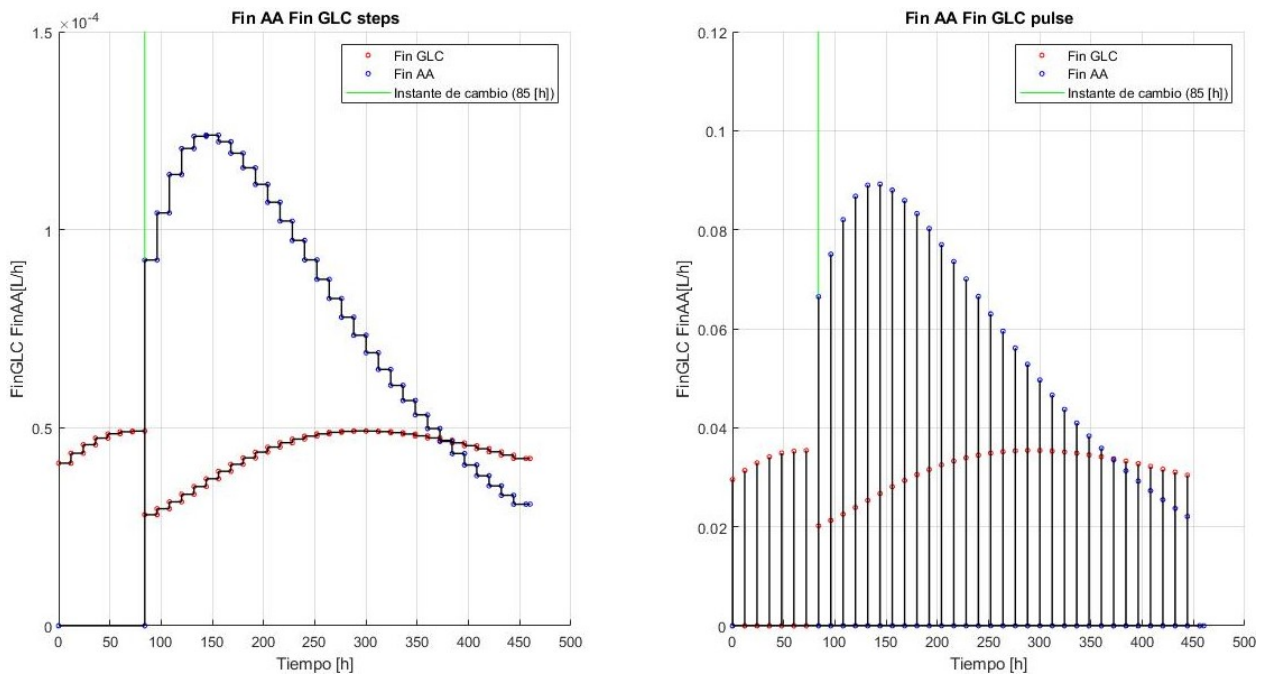


Figura J.3: Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

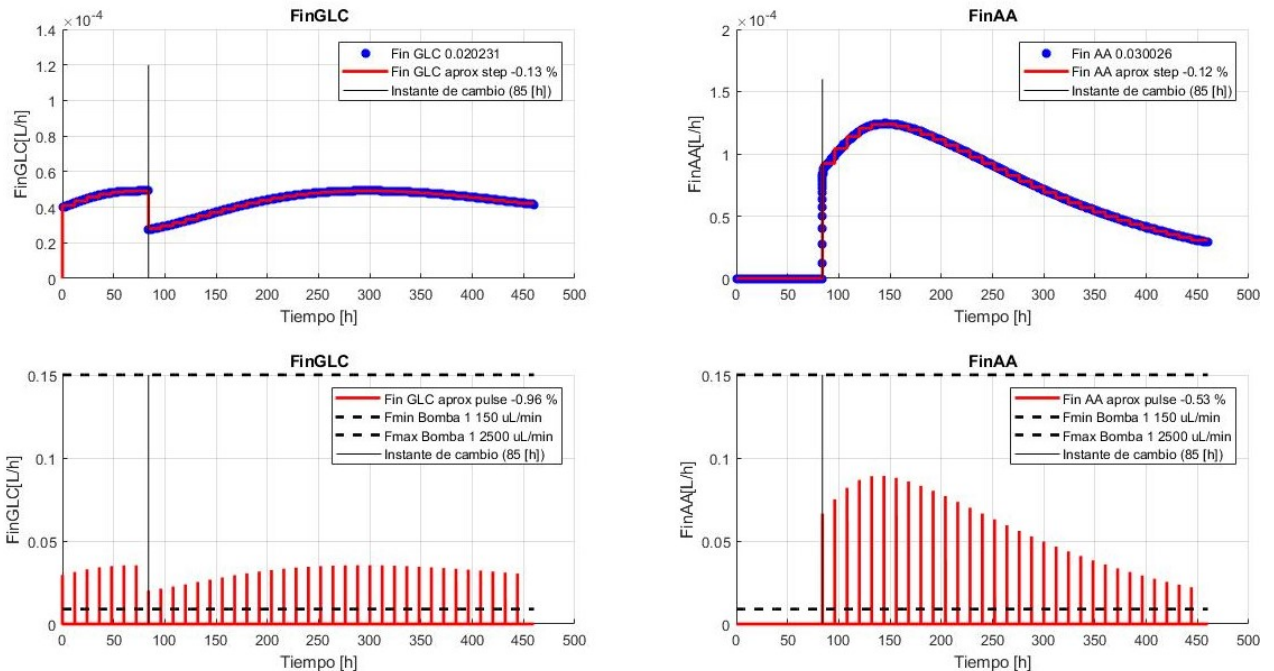


Figura J.4: Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

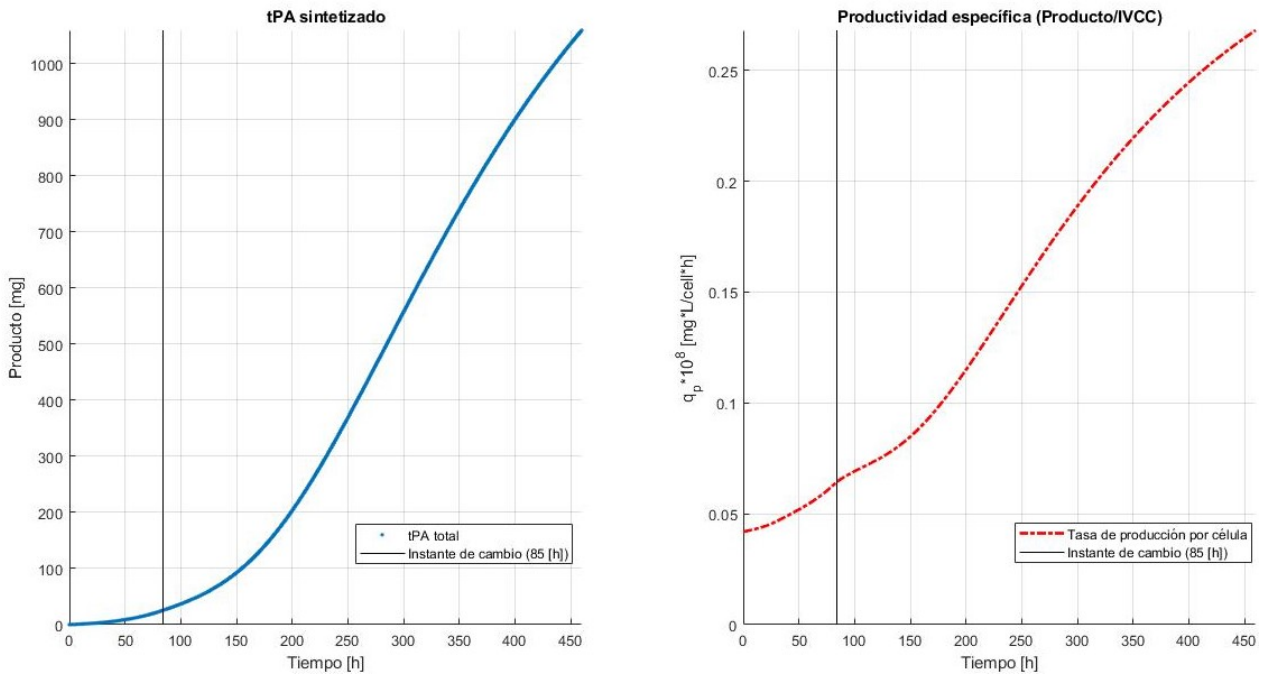


Figura J.5: Producción de tPA y productividad específica, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

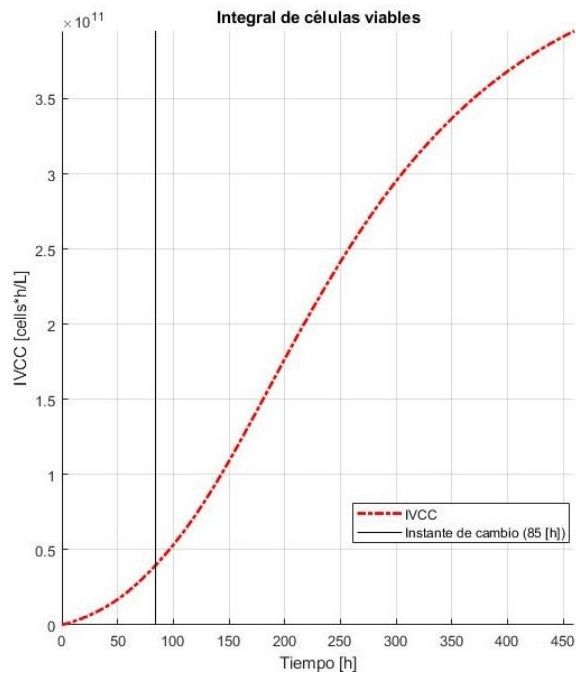


Figura J.6: Integral de células viables, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 85 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.



## J.2. Segundo ajuste de composición a las 135 horas

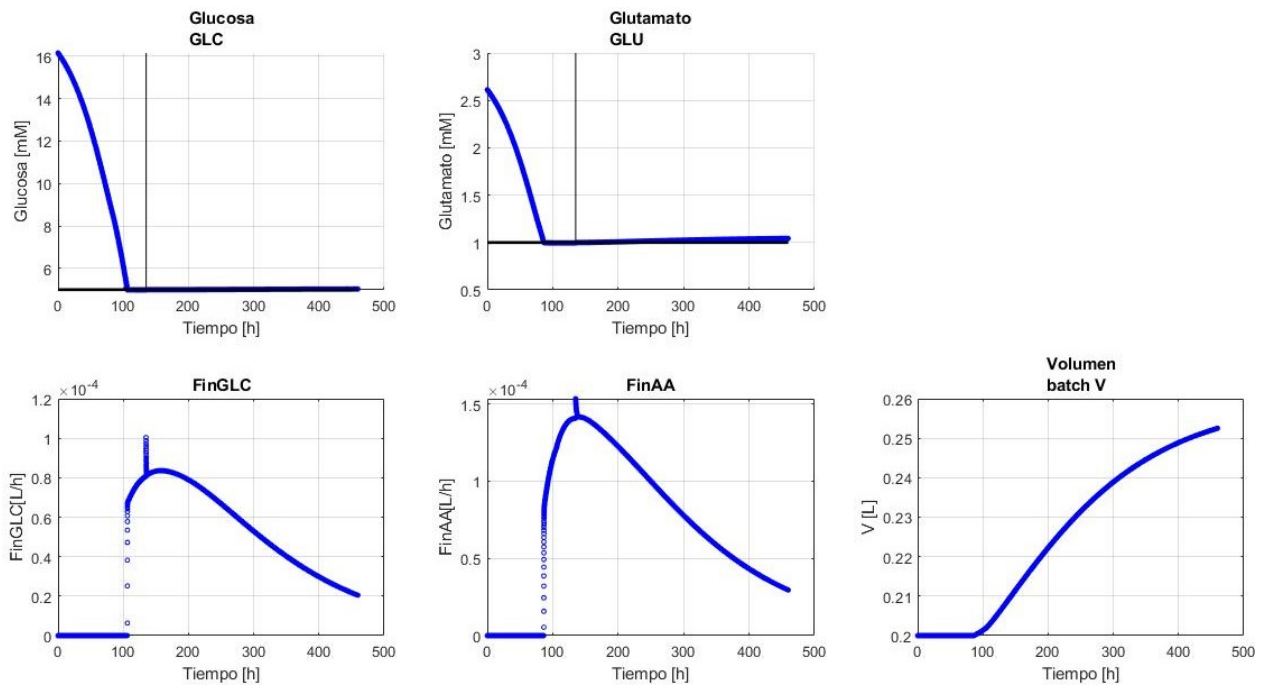


Figura J.7: Resolución original obtenida para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

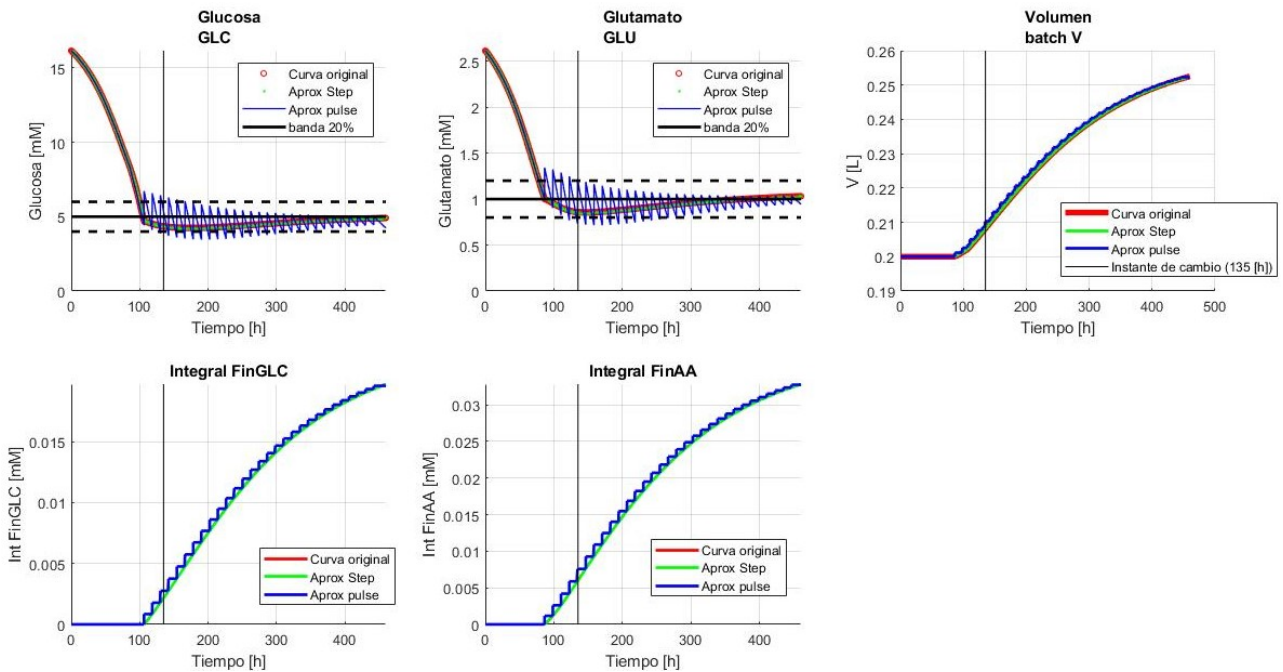


Figura J.8: Aproximación de las concentraciones, volumen de cultivo e integrales de flujos a alimentar, a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

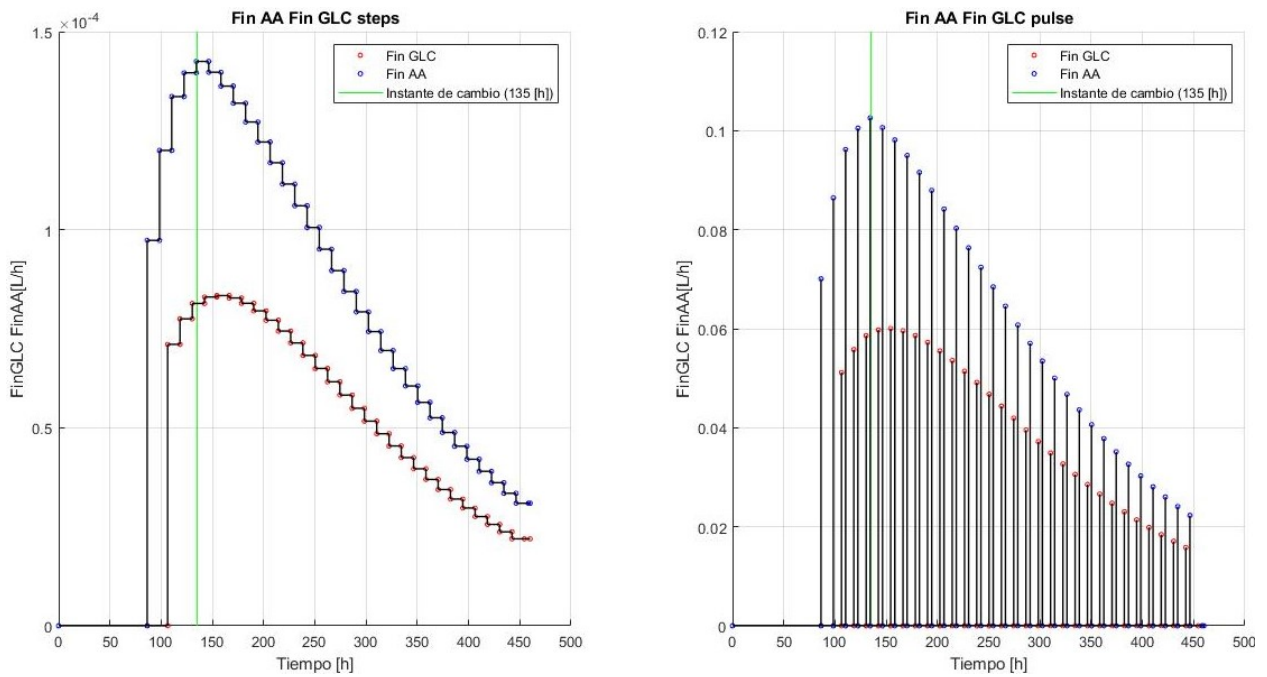


Figura J.9: Aproximación de los flujos de alimentación a pulsos y escalones, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

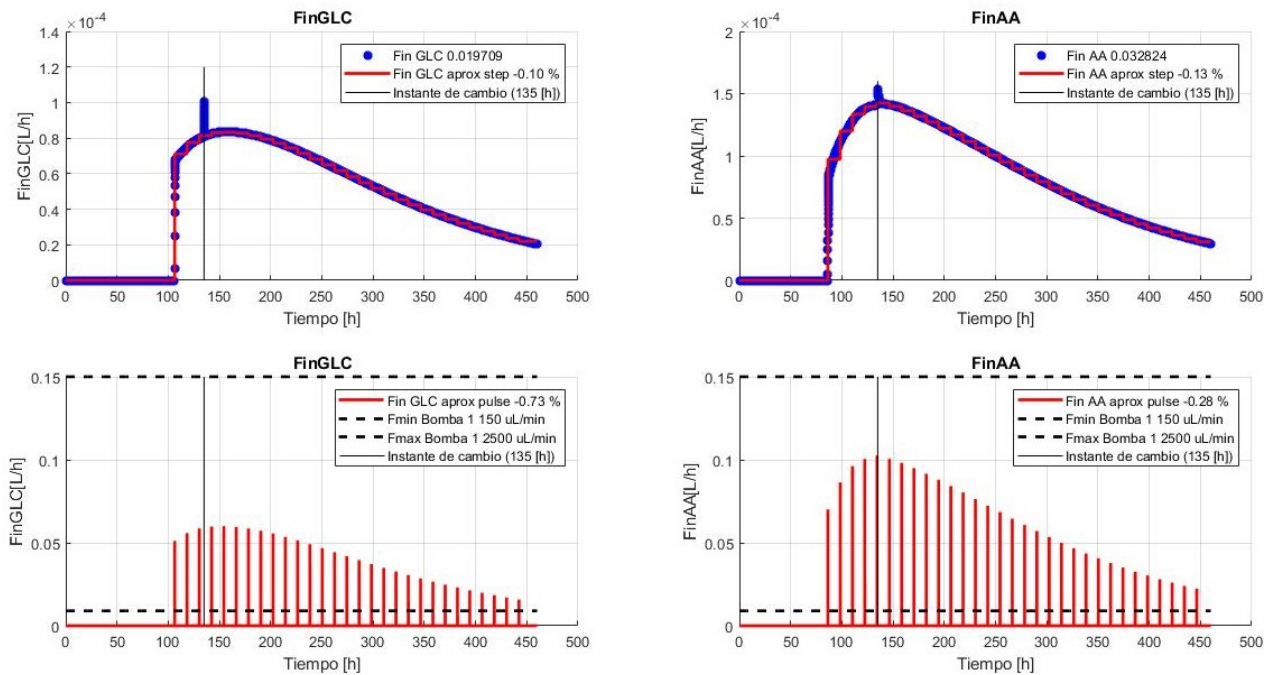


Figura J.10: Flujos a alimentar analizados en el rango de factibilidad de las bombas, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

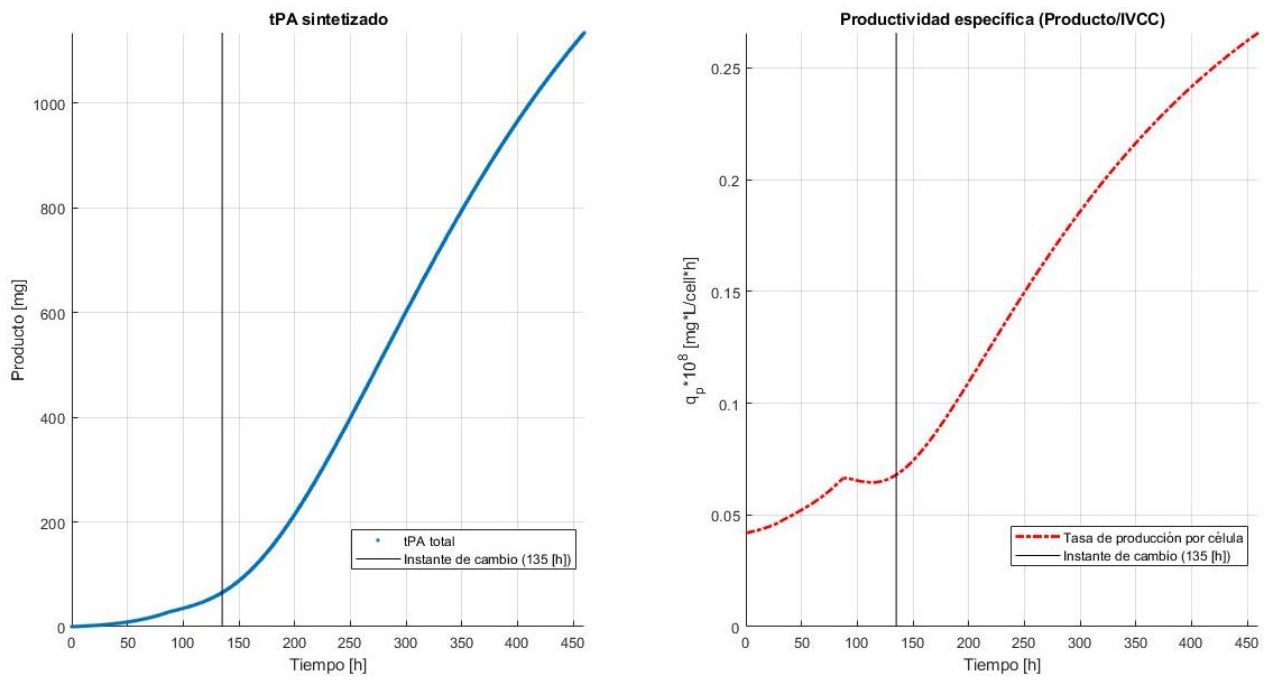


Figura J.11: Producción de tPA y productividad específica, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.

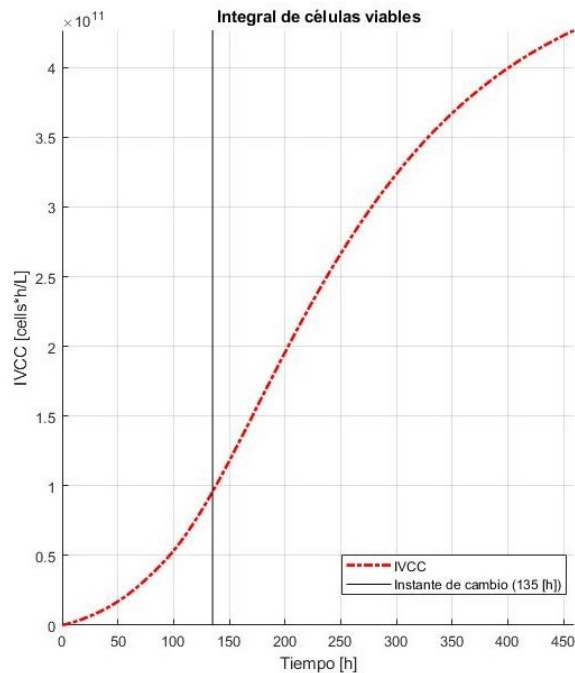


Figura J.12: Integral de células viables, para el cultivo fed-batch optimizado con un segundo ajuste de composición a las 135 horas. La simulación fue desarrollada en MATLAB.