

Desescalado del proceso de fermentación de la proteína recombinante sL22 a un biorreactor de 50 L

Scale down of the fermentation process of sL22 recombinant protein in a 50 L bioreactor

*Roberto Rafael Núñez Ortiz **, *Jennifer de la Caridad Quesada Rodríguez***,
*José Antonio Fernández de la Vega Velázquez****, *María Caridad Duarte Castro*****
*Julio César Dustet Mendoza******

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n2.116793

RESUMEN

Los estudios de un proceso a escala de producción no son económicamente factibles, por tanto, el desarrollo de modelos a pequeña escala que representen el desempeño del proceso de la escala comercial es esencial para lograr una caracterización robusta y un mejor entendimiento de este. En el Centro de Inmunología Molecular (CIM) se obtiene la proteína recombinante sL22 a partir del cultivo a escala comercial de la línea celular NS0. Con el objetivo de evaluar nuevas condiciones en el proceso para su optimización, en la presente investigación se desarrolla un modelo de desescalado de un biorreactor de 50 L que opera en modo continuo desde un biorreactor comercial de 2 000 L que opera en modo perfusión. Se seleccionan como criterios mantener constante el tiempo de mezclado y el coeficiente de transferencia de masa entre ambas escalas. Se realizan tres corridas experimentales y se evalúa el desempeño del cultivo celular a partir de los parámetros cinéticos y del estrés hidrodinámico aportado por las condiciones operacionales propuestas de velocidad de agitación de 100 min^{-1} y un flujo de aire por unidad de volumen de $0,0017 \text{ min}^{-1}$; que implicó operar una potencia por unidad de volumen inferior de los valores que provocan daño celular. El tamaño de los remolinos que genera esta condición de agitación es superior al diámetro de las células de mamíferos, condición que no tiene impacto en el daño celular. La zona de operación permitió una alta viabilidad celular y parámetros cinéticos típicos de las células de mamíferos.

Palabras claves: cultivos celulares; reactor biológico; hidrodinámica; escalado.

ABSTRACT

Studies of a production-scale process are not economically feasible; therefore, the development of small-scale models that represent the performance of the commercial-scale process is essential to achieve a robust characterization and a better understanding of it. At the Center for Molecular Immunology (CIM), recombinant sL22 protein is obtained from

* MSc. Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0009-0009-8714-9644>; robertikinnunez95@gmail.com (Autor de correspondencia)

** MSc. Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0009-0002-5075-3759>

*** MSc. Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0009-0004-5726-7440>

**** MSc. Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0009-0006-2984-8592>

***** PhD. Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría, Cuba; <https://orcid.org/0000-0002-2044-0383>

commercial-scale culture of the NS0 cell line. In order to evaluate new conditions in the process for its optimization, a model of scale down of a 50 L bioreactor operating in continuous mode from a commercial 2 000 L bioreactor operating in perfusion mode is developed in the present investigation. The mixing time and mass transfer coefficient between the two scales are selected as criteria to be kept constant. Three experimental runs were performed, and the performance of the cell culture was evaluated from the kinetic parameters and the hydrodynamic stress provided by the proposed operational conditions of agitation speed of 100 min⁻¹ and an air flow per unit volume of 0.0017 min⁻¹. These implied operating a power per unit volume lower than the values that cause cell damage. The size of the eddies generated by this agitation condition is larger than the diameter of mammalian cells, a condition that has no impact on cell damage. The zone of operation allowed for a high level of cell viability and kinetic parameters that are typical of mammalian cells. It was found that the operational zone facilitated elevated levels of cell viability and kinetic parameters that are characteristic of mammalian cells.

Keywords: cell culture; biological reactor; hydrodynamics; scaling.

Recibido: noviembre 23 de 2024

Aprobado: 25 de octubre de 2025

INTRODUCCIÓN

El cultivo de células animales constituye una de las ramas de la biotecnología de gran interés en los últimos años; originalmente se desarrolló para la producción de vacunas virales y un número limitado de proteínas naturales. Este tipo de cultivo es una tecnología cara, pero única en el sentido que las proteínas que se obtienen a partir de ella no pueden ser sintetizadas por otros organismos más simples, debido a los requerimientos de glicosilación que necesitan muchas proteínas para ser biológicamente activas (Zhang, 2020). Las células de animales son los hospederos por excelencia para más del 70 % de los productos farmacéuticos en el mercado.

El desarrollo de un proceso productivo implica varias etapas que van desde la identificación de la cepa productora del producto de interés, su mejora, la optimización del proceso y el escalado del mismo. Una vez establecido a escala comercial, continúa la caracterización del mismo para comprenderlo en detalle, estudiar la relación entre los parámetros claves de operación y el rendimiento, así como los atributos de calidad del producto final.

Uno de los aspectos más difíciles de caracterizar es la hidrodinámica de los sistemas y la interacción de esta con los mecanismos de transferencia en la escala de producción. Existen dos maneras de resolver los problemas que surgen durante los procesos de escalado:

- Adquirir más conocimientos sobre la hidrodinámica y la interacción con otros mecanismos para obtener una descripción completa de lo que ocurre en el interior de los biorreactores a gran escala.
- Desarrollar procedimientos de escalado que proporcionen una estimación adecuada del rendimiento de los biorreactores a escala de producción basándose en investigaciones a pequeña escala.

El primero de estos métodos no es factible en la práctica debido a los elevados costos operacionales y la limitada disponibilidad de biorreactores a gran escala para la experimentación; por esta razón se utilizan por lo general los modelos de desescalado. Existen diversos métodos para realizar estos estudios, cada uno con sus ventajas y desventajas; entre los que se pueden destacar: Regla del pulgar, tanteo y error y a partir de la modelación matemática (Hall, 2017).

El modo de operación continuo es ampliamente utilizado para la caracterización de cultivos celulares (Tang *et al.*, 2020; Castilho *et al.*, 2008), en la determinación e identificación de variables cinéticas y estequiométricas. En este modo no se alcanzan altas concentraciones celulares como en la perfusión, y no se puede operar a velocidades de dilución por encima de la velocidad específica de crecimiento. Es de gran utilidad en el estudio de factores ambientales y físicos en el desempeño del cultivo celular, debido a la capacidad de establecer estados estacionarios por tiempos elevados de operación, a diferencia de los cultivos discontinuos. La influencia de estos factores puede ser fácilmente estudiada en estos sistemas (González Álvarez, 2024; Castilho *et al.*, 2008). En algunos casos se ha empleado como modelo para el estudio de fermentaciones a escala industrial en modo perfusión. González Álvarez (2024), obtuvo un modelo matemático a partir de una relación lineal entre la velocidad específica de perfusión por célula (CSPR) y la velocidad específica de crecimiento (μ) en el estado pseudoestacionario (ee) para determinar la zona de operación estable y condiciones de mayor productividad en los cultivos de las líneas celulares NS0 y CHO en un biorreactor de 1 500 L que opera en modo perfusión. Para ello desarrolló corridas a escala de 80 L en modo continuo y obtuvo que, al operar al mismo valor de velocidad específica de crecimiento en el estado pseudoestacionario, obtiene el mismo valor de velocidad específica de

perfusión por célula que en el biorreactor de 1 500 L, con un error inferior al 20 %. El autor usó el modelo de 80 L para determinar el valor de CSPR mínimo que puede mantenerse en el cultivo en el estado estacionario con un valor de alta viabilidad para lograr el mismo resultado en el biorreactor de la escala comercial.

En Cuba, la única institución que realiza el cultivo de células animales a escala industrial es el Centro de Inmunología Molecular, dirigido principalmente a la investigación básica, desarrollo y fabricación de productos novedosos para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades autoinmunes. En un biorreactor tipo tanque agitado a escala comercial se obtienen dos proteínas recombinantes, la sL22 empleada en la formulación de un Ingre-diente Farmacéutico Activo contra diferentes tipos de cáncer y la proteína recombinante rC21, materia prima biológica empleada en la formulación de una vacuna viral (Quesada-Rodríguez *et al.*, 2025). Ambos productos se obtienen a partir del cultivo de las líneas celulares NS0 y CHO-K1, respectivamente, bajo similares condiciones de operación. En los últimos años se ha hecho necesario la evaluación de nuevas condiciones en el proceso de fermentación para el desarrollo y optimización del mismo. Para ello es preciso realizar diferentes experimentos de forma tal que se reproduzca el proceso con la mayor similitud posible. Es importante tener en cuenta aspectos como la transferencia de oxígeno, el daño por estrés, así como otros factores hidrodinámicos. Por ello el objetivo de la presente investigación es obtener un modelo de desescalado, tomando como referencia el proceso de fermentación de la proteína recombinante sL22. Los resultados de la presente investigación constituirían una valiosa herramienta para la optimización de ambos procesos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Línea celular

La línea celular empleada fue NS0, un mieloma murino transfectado con el gen que codifica para la proteína recombinante sL22. Se empleó el medio de cultivo comercial libre de proteínas y de suero animal, M1 similar al utilizado por (Boggiano-Ayo *et al.*, 2023).

Biorreactores

La experimentación se desarrolló en un biorreactor de producción comercial, que tiene un volumen de trabajo de 2 000 L (*Bioengineering AG*; Suiza), cuyo diámetro (D_T) es de 1,28 m y la altura del líquido (H_L) es de 1,66 m. Este cuenta con dos impelentes acoplados al mismo eje, una turbina Rushton de seis paletas (impelente inferior) y una propela marina con tres aspas (impelente superior) ambos con un diámetro (D_i) de 0,45 m. Ade-

más, se empleó un biorreactor de 50 L de volumen efectivo (*Bioengineering AG*; Suiza) con igual cantidad y disposición de los impelentes y cuyas dimensiones son: $D_T = 0,39$ m; $D_i = 0,15$ m y $H_L = 0,44$ m.

En ambos biorreactores la temperatura se controló en $36,50 \pm 0,50$ °C, mediante un sistema de dos intercambiadores de calor de placas que enfrían o calientan el volumen de agua contenido en la chaqueta. Además, se alimentó una corriente de aire para mantener una presión constante en los biorreactores. Los niveles de oxígeno disuelto en los cultivos celulares por lo general se controlan entre el 20 y 100 % de saturación de aire; en particular en las corridas en cuestión se alimentó una mezcla de oxígeno y aire a través del distribuidor de gases para que este valor se mantuviera alrededor del 50 %. El biorreactor de 2 000 L presenta un distribuidor de gases con diámetro de orificio de 2,0 mm, mientras el de 50 L tiene un micro burbujeador tipo tubo perforado con diámetro de orificio de 20,0 μ m. El biorreactor de 2 000 L se operó en modo continuo con recirculación de biomasa, con una velocidad de agitación de 80 min^{-1} y un flujo total a través del distribuidor de gases de 7,0 L/min.

Criterios para el desescalado del proceso de fermentación

Existen varios métodos para el escalado de un proceso productivo, en este caso se empleó la regla del pulgar por su amplia utilización en la práctica (Halls, S., 2017). En este las variables del proceso se concentran en tres grupos: variables químico-físicas, variables geométricas y variables de operación. Las primeras se mantuvieron constantes en todas las escalas, como las propiedades del medio de cultivo, la temperatura de operación, el pH, entre otras. En el grupo de las variables geométricas se tienen las dimensiones de los biorreactores, en forma de diferentes relaciones. Las variables de operación se determinaron a partir de aplicar los diferentes criterios de escalado (Aiba *et al.*, 1973).

Se aplicó la siguiente metodología para realizar el desescalado del proceso de fermentación:

1. Selección de la variable objetivo;
2. Selección de la combinación de criterios de escalado a probar;
3. Cálculo de las variables de operación velocidad de agitación (N) y flujo total de gases (Q) en la escala de 50 L, partiendo de los valores que tienen en la escala de referencia;
4. Estudio del proceso en la nueva escala con la aplicación de los criterios seleccionados;
5. Comprobación de la validez del procedimiento aplicado.

Para la aplicación de esta metodología se comprobó si existe similitud geométrica entre las escalas, mediante el

cálculo de diferentes relaciones: D_T/D_i , H_L/D_T y el factor geométrico (f) de acuerdo a la ecuación 1.

$$f = \frac{1}{3} \left(\frac{D_T}{D_i} \cdot \frac{H_L}{D_i} \right)^{0.5} \quad 1$$

Una vez calculado el factor geométrico se analizaron diferentes criterios para determinar la velocidad de agitación (N) en el biorreactor de 50 L, a partir de conocer la velocidad de agitación en el biorreactor 2 000 L y el factor lineal de escala (relación entre los diámetros de impelentes) (Quintero, 1990). Los criterios analizados fueron:

Número de Reynolds (Re) constante (ecuación 2)
Velocidad tangencial (v_{tip}) constante (ecuación 3)
Tiempo de mezclado (t_m) constante (ecuación 4)
Potencia por unidad de volumen (P/V) constante (ecuación 5).

$$\frac{N_2}{N_1} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}} \right)^2 \quad 2 \quad \frac{N_2}{N_1} = \frac{D_{i1}}{D_{i2}} \quad 3$$

$$\frac{N_2}{N_1} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}} \right)^{1/4} \quad 4 \quad \frac{N_2}{N_1} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}} \right)^{2/3} \quad 5$$

donde: el subíndice 1 se refiere a la escala de 50 L y el subíndice 2 a la escala de 2 000 L.

La selección de la velocidad de agitación, mediante los criterios estudiados se realizó a partir de evaluar algunas de las características hidrodinámicas en el biorreactor, ecuaciones 6-8.

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D_i^2}{\eta} \quad 6$$

$$v_{tip} = \pi \cdot N \cdot D_i \quad 7$$

$$\frac{P}{V} = \frac{N_p \cdot \rho \cdot D_i^5 \cdot N^3}{V} \quad 8$$

donde:

ρ - densidad de líquido

N_p - número de potencia, es función del tipo de impelente y del régimen de trabajo

η - viscosidad dinámica.

El flujo de aire Q se calculó mediante el criterio recomendado por (Aiba *et al.*, 1973) basado en mantener constante el coeficiente de transferencia de masa (ecuación 9). Aunque este método fue desarrollado inicialmente para los casos en que no existe agitación mecánica y por tanto la transferencia de masa se produce

por la acción de las burbujas de aire que salen del distribuidor de gases, también se ha utilizado como una buena aproximación para el escalado en los biorreactores del tipo tanque agitado, con resultados superiores a los que se alcanzan con los métodos de mantener constante el flujo de aire por unidad de volumen (vvm) o la velocidad superficial (Aiba *et al.*, 1973).

$$\frac{vvm_1}{vvm_2} = \frac{Q_1/V_1}{Q_2/V_2} = \left(\frac{H_{L2}}{H_{L1}} \right)^{-2/3} \quad 9$$

donde:

vvm- flujo de aire por unidad de volumen

Q- flujo de gases al distribuidor de gases.

Este parámetro se evaluó a partir de observar el comportamiento del oxígeno disuelto en el cultivo para el flujo de gases determinado por la ecuación 9.

Las condiciones hidrodinámicas influyen directamente en el desempeño de las células, pues se pueden generar efectos de cizallamiento en los cultivos celulares. Un indicador potencial del daño celular es la microescala de turbulencia o número de Kolmogorov (Nienow, 2021; García-Ochoa *et al.*, 2020). Este identifica al remolino más pequeño o "eddy" en función de la velocidad de disipación de energía y de la viscosidad del fluido. Se determinó el tamaño de los remolinos mediante la ecuación 10.

$$l = \left(\frac{\eta^3}{P/(\rho \cdot V)} \right)^{1/4} \quad 10$$

donde:

l- tamaño de los remolinos.

Condiciones experimentales

Se desarrollaron tres corridas experimentales a partir de las condiciones de agitación y aireación, seleccionadas para estudiar el proceso en la escala de 50 L. Los parámetros cinéticos que, constituyen las variables objetivos del desescalado se compararon con los de una corrida típica de la escala de 2 000 L en modo continuo con recirculación celular y una corriente de purga. En la fermentación en la escala de 50 L se empleó el modo de operación continuo, utilizado por lo general en las actividades de investigación y desarrollo, y en la caracterización del cultivo celular (Castilho *et al.*, 2008).

En cada corrida el biorreactor fue muestreado con una frecuencia no superior a 4 días. La concentración celular (X_v) y la viabilidad celular fueron determinadas por observación al microscopio mediante el método de exclusión con tripán azul (Sutedjo, 2022). La concentración de producto extracelular P se determinó mediante el ensayo inmunoenzimático ligado a enzima ELISA (Hayrapetyan *et al.*, 2023).

Se determinaron los parámetros cinéticos velocidad específica de crecimiento celular (μ) y velocidad específica de producción del anticuerpo (q_p). Para ello se aplicaron los balances de biomasa y producto, teniendo en cuenta el modo de operación y la etapa de crecimiento del cultivo celular.

El cálculo de la velocidad específica de crecimiento en el cultivo por lote incrementado quedó expresado mediante la ecuación 11.

$$\ln\left(\frac{X_v}{X_{v0}}\right) = \mu \cdot (t - t_0) - \int_{t_0}^t \frac{F}{V} dt \quad 11$$

donde:

F- flujo de adición de medio de cultivo durante el incremento

V- volumen del biorreactor

X_{v0} y t_0 - concentración de células vivas y tiempo de corrida, al inicio del cultivo por lote incrementado.

En el estado pseudoestacionario se determinaron μ y q_p a partir de las ecuaciones de balances de masa para la biomasa y el producto en modo continuo y en modo continuo con recirculación celular (ecuaciones 12 y 13).

$$\mu = \alpha \cdot D_p + D \quad 12$$

$$q_p = \frac{P \cdot Dt}{X_v} \quad 13$$

donde:

D- velocidad de dilución en cultivo continuo

D_p - velocidad de dilución de perfusión

D_t - velocidad de dilución total

α - factor de pase del dispositivo de retención celular.

En el caso del cultivo continuo sin retención de biomasa en la ecuación 12 el término $\alpha \cdot D_p$ se anula y en el cálculo de q_p la velocidad de dilución total es D.

La velocidad específica de dilución por célula en el cultivo de 50 L (CSDR, por sus siglas en inglés) se determinó

mediante la ecuación 14. Esta representa el volumen de medio de cultivo empleado diariamente para sostener cada célula en el cultivo celular, y da una medida de la profundidad nutricional del medio de cultivo para la línea celular en las condiciones de cultivo; provee un microambiente consistente para las células en el cultivo.

$$CSDR = \frac{D}{X_v} \quad 14$$

Esta ecuación se empleó también para determinar la velocidad específica de perfusión por célula (CSPR, por sus siglas en inglés), sustituyendo la D por la velocidad de dilución total en el cultivo de 2 000 L.

Procesamiento estadístico de los datos

Se realizó la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis para medianas con el objetivo de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los valores calculados de los parámetros cinéticos que caracterizan la línea celular NSO productora de la proteína recombinante sL22 en ambas escalas. La prueba se llevó a cabo en el programa *Minitab 18*, donde se tuvo en cuenta que para todo valor p mayor que el nivel de significancia de 0,05 no existían diferencias estadísticas significativas entre las medianas.

RESULTADOS

Proceso de fermentación a gran escala

La figura 1 muestra el comportamiento de la concentración celular, la viabilidad, la velocidad de dilución total y la concentración de producto en una corrida desarrollada en el biorreactor de 2 000 L, que es representativa de esta escala de trabajo, donde en el cultivo de la línea celular NSO en

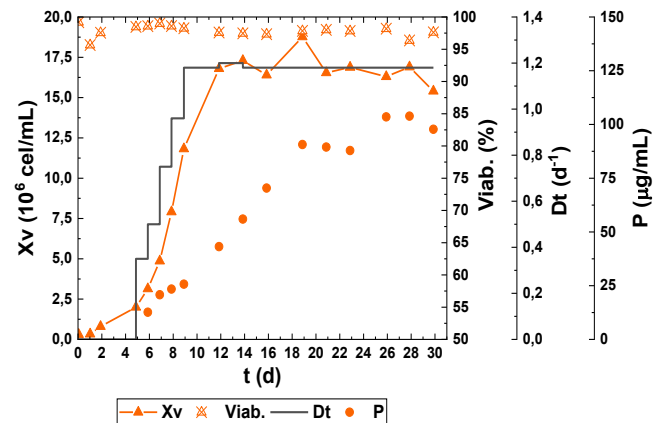


Figura 1. Concentración celular, viabilidad, velocidad de dilución y concentración de producto en el medio de cultivo M1, en el biorreactor de 2 000 L; temperatura $36,50 \pm 0,50$ °C, velocidad de agitación 80 min^{-1} , vvm de $0,004 \text{ min}^{-1}$, pH $6,85 \pm 0,10$.

la obtención de proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales se obtienen concentraciones celulares en el orden de $2,00 \cdot 10^7$ cel/mL para velocidades de dilución hasta $1,20 \text{ d}^{-1}$ (Núñez Ortiz *et al.*, 2023).

La corrida se inoculó a una concentración de células vivas de $3,05 \cdot 10^5$ cel/mL y una viabilidad celular de 99,20 % y presentó una fase de adaptación corta. La adición de medio de cultivo para completar el volumen de trabajo ocurrió entre el segundo y quinto día de fermentación, a un flujo de 20 L/h. Al finalizar el cultivo incrementado se inició la perfusión, con una concentración celular de $2,00 \cdot 10^6$ cel/mL a una velocidad de dilución de $0,35 \text{ d}^{-1}$, la cual aumentó en función del incremento de la concentración celular, para mantener una CSPR alrededor de 0,08 nL/cel/d. El día 12 de corrida se alcanzó un estado pseudoestacionario con X_v de $1,70 \cdot 10^7$ cel/mL, la cual se mantuvo hasta el final de la corrida. La concentración del producto presentó un incremento y alcanzó los valores máximos en el estado pseudoestacionario en el orden de 100 µg/mL.

La velocidad específica de crecimiento en el cultivo por lote incrementado fue $0,035 \text{ h}^{-1}$ y en el estado pseudoestacionario $0,010 \text{ h}^{-1}$ y la velocidad específica de formación de producto fue 6,50 pg/cel/d. Estos se encuentran en el intervalo informado para el cultivo de células de mamíferos (Quesada-Rodríguez *et al.*, 2025; González Álvarez, 2024; Castilho *et al.*, 2008).

Desescalado del proceso de fermentación a 50 L

Se determinó el factor geométrico de acuerdo a la ecuación 1; esta relación entre ambos biorreactores fue 0,88 y evidencia que existe un 88 % de similitud geométrica entre los biorreactores de 50 L y 2 000 L. De acuerdo a Aiba *et al.*(1973) cuando el factor es superior a 0,80 se puede afirmar que los biorreactores son geoméricamente similares.

Quintero (1990) planteó que cuando existe similitud geométrica se pueden emplear diferentes criterios para el cambio de escala. En este trabajo se analizaron los criterios de velocidad de agitación, Re, velocidad tan-

gencial y potencia por unidad de volumen constantes (ecuaciones 2 a 5), a partir de los cuales se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 1.

Se descartó el criterio de mantener el número de Reynolds constante pues la velocidad de agitación necesaria supera los 300 min^{-1} , velocidad máxima que permite el biorreactor de 50 L *Bioengineering* por diseño original. El criterio de velocidad tangencial constante se descartó pues implicaba una potencia por unidad de volumen de $579,44 \text{ W/m}^3$, valor superior a 250 W/m^3 , informado por Nienow (2006), para el cual se recomienda trabajar en estos sistemas sin observar daño en el cultivo celular.

La velocidad de agitación máxima que se debe trabajar en este sistema para no exceder una P/V de 250 W/m^3 (Nienow, 2006) es de 200 min^{-1} ; Hall (2017) plantea que la velocidad de agitación se debe mantener un 20 % alejada de la velocidad crítica. Se debería trabajar a velocidades de agitación inferiores a 160 min^{-1} para cumplir el criterio de Hall (2017); de ahí que se descartó el criterio de mantener constante la potencia por unidad de volumen que supone trabajar a una velocidad de agitación de 165 min^{-1} .

A partir de las consideraciones anteriores se decidió emplear como criterio de desescalado para el cálculo de la velocidad de agitación el tiempo de mezclado constante entre ambas escalas. Este tiempo es una de las características más importantes de los biorreactores para el estudio de los procesos de transferencia, la dinámica de fluidos y en general para la caracterización y entendimiento del proceso. Además, de garantizar la homogeneidad del sistema, es importante para evitar gradientes en las concentraciones de nutrientes y el oxígeno, así como oscilaciones en el pH que puedan afectar la productividad del proceso.

El flujo de gases totales determinado por la ecuación 9 fue de 0,085 L/min con lo cual la relación de flujo de aire por unidad de medio fue de $0,0017 \text{ min}^{-1}$. Este flujo es relativamente bajo; de acuerdo a Langheinrich *et al.* (1998) se

Tabla 1. Criterios de escalado analizados para determinar la velocidad de agitación del biorreactor de 50 L.

| Criterio constante | Velocidad de agitación (min ⁻¹) | Re | Velocidad tangencial (m/s) ≤ 2,5 m/s | P/V (W/m ³) ≤ 250 W/m ³ |
|--------------------|---|---------|---|---|
| Re | 720 | 387 013 | 5,65 | 15 644,84 |
| V _{tip} | 240 | 129 004 | 1,88 | 579,44 |
| t _m | 100 | 53 751 | 0,79 | 41,92 |
| P/V | 165 | 86 003 | 1,26 | 171,69 |

puede plantear que la potencia es similar a la potencia gaseada, lo que simplifica los cálculos de la potencia.

Se determinó además el tamaño de los remolinos mediante la ecuación 10. Mientras menor sea el tamaño del remolino, mayor es la cantidad de energía concentrada y por tanto mayor daño puede ocasionar a la célula. Si la célula es más pequeña que la microescala de turbulencia, no será dañada en el momento de la explosión del remolino, ya que puede acomodarse en su interior (Nienow, 2006). A partir de la relación de P/V para la velocidad de agitación de 100 min^{-1} y la viscosidad dinámica del agua a la temperatura de trabajo, se determinó que el tamaño de la microescala de turbulencia de Kolmogorov es de $53 \text{ }\mu\text{m}$; las células de mamíferos tienen diámetros de $10\text{--}20 \text{ }\mu\text{m}$ (Nienow, 2021), por esta razón se pudiera descartar daño celular bajo esta condición.

Resultado del desescalado en 50 L

La figura 2 muestra el comportamiento de la concentración celular, la viabilidad y la velocidad de dilución de la línea celular NS0 en las corridas de fermentación 1, 2 y

3 desarrolladas en el biorreactor de 50 L; en el caso de las corridas 2 y 3 se muestra además la concentración de producto. En todas las corridas se utilizó el medio de cultivo M1, para la obtención de la proteína recombinante sL22, a partir de las condiciones de velocidad de agitación del impelente y flujo de aeración propuestos.

La corrida 1 (Figura 2a) se inoculó a una concentración de células vivas de $4,73 \cdot 10^5 \text{ cel/mL}$ y una viabilidad celular de $97,22 \%$; y los dos primeros días transcurrieron en modo discontinuo y se comenzó la adición de medio de cultivo a $0,52 \text{ L/h}$ hasta completar el volumen de trabajo, el cuarto día de comenzar la corrida. A partir de este momento, con una concentración celular de $1,53 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$, se inició el cultivo continuo a una velocidad de dilución de $0,25 \text{ d}^{-1}$. A las 48 horas de comenzar el cultivo continuo se aumentó la velocidad de dilución a $0,35 \text{ d}^{-1}$ en función de la concentración celular, con el objetivo de trabajar a velocidad específica de dilución por célula en el orden de $0,1 \text{ nL/cel/d}$. En estas condiciones se alcanzó un estado pseudoestacionario a partir del séptimo día, con una concentración promedio de

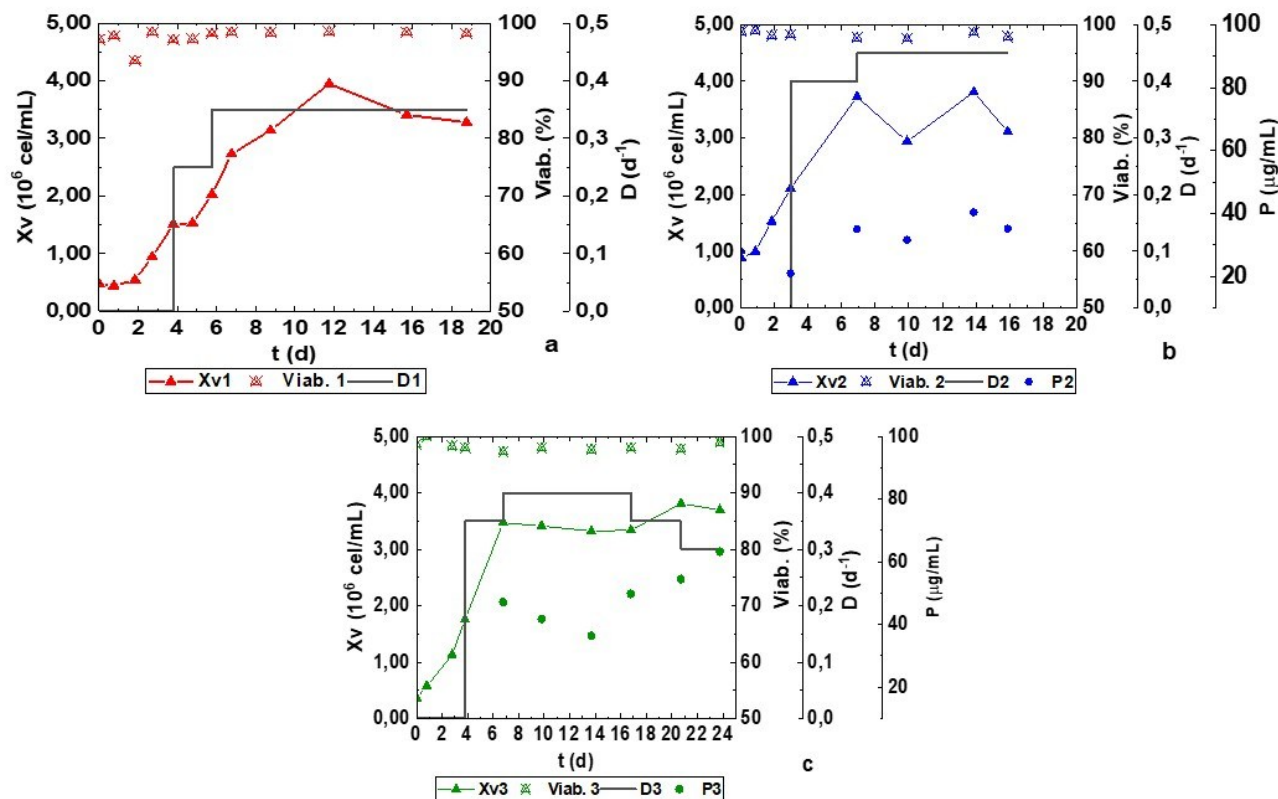


Figura 2. Concentración celular, viabilidad, velocidad de dilución y concentración de producto con el medio de cultivo M1, en el biorreactor de 50 L; temperatura $36,50 \pm 0,50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, velocidad de agitación 100 min^{-1} , vvm de $0,0017 \text{ min}^{-1}$, pH $6,85 \pm 0,10$: a-fermentación 1; b-fermentación 2; c- fermentación 3.

$3,30 \cdot 10^6 \pm 4,43 \cdot 10^5$ cel/mL; el CSDR en esta etapa fue de $0,11 \pm 0,01$ nL/cel/d.

La corrida 2 (Figura 2b) inició con una concentración de células vivas de $1,01 \cdot 10^6$ cel/mL y una viabilidad celular de 99,03 % y la fase de adaptación fue imperceptible. Se comenzó la adición de medio de cultivo a las 24 horas de corrida a un flujo de 0,52 L/h hasta completar el volumen de trabajo durante 48 horas. Al día siguiente, con una X_v de $2,11 \cdot 10^6$ cel/mL se inició el cultivo continuo a una velocidad de dilución de $0,40$ d⁻¹, la cual se incrementó hasta $0,45$ d⁻¹ conforme al crecimiento celular. El final de la etapa de crecimiento e inicio del estado pseudoestacionario ocurrió el séptimo día de corrida hasta el fin de la misma; se alcanzó a una concentración celular de $X_{v2} = 3,40 \cdot 10^6 \pm 4,37 \cdot 10^5$ cel/mL, en esta etapa se obtuvo un CSDR de $0,13 \pm 0,02$ nL/cel/d.

La corrida 3 (Figura 2c) comenzó con una concentración de células vivas de $3,60 \cdot 10^5$ cel/mL y una viabilidad celular de 98,63 %. Al día siguiente se comenzó la adición de medio de cultivo a un flujo de 0,52 L/h hasta aproximadamente las 72 horas de iniciada la corrida, momento en que se llega al volumen de trabajo. El cuarto día se comenzó el cultivo continuo a $0,35$ d⁻¹; el séptimo día de corrida la velocidad de dilución se incrementó a $0,40$ d⁻¹; se alcanzó un estado pseudoestacionario en $3,51 \cdot 10^6 \pm 2,00 \cdot 10^5$ cel/mL hasta el final de la corrida. A partir del día 16 de corrida se implementó la estrategia descrita por (Konstantinov et al., 2006) de buscar el cambio incremental en el proceso del cultivo celular hacia un CSDR más bajo, pues suele comenzar con valores más altos; esto permitió disminuir este parámetro de $0,11$ nL/cel/d a $0,08$ nL/cel/d, similar a la velocidad específica de perfusión por célula a la cual se trabaja en el biorreactor de 2 000 L.

La concentración de producto en el estado pseudoestacionario alcanzó valores entre 30 y 50 µg/mL, sin embargo, en la corrida 3 se pudo observar en las últimas mediciones un ligero incremento, superando los 60 µg/mL. Esto puede estar asociado a la estrategia de la fermentación, donde el día 20 se disminuyó la velocidad de dilución. De acuerdo a Konstantinov et al. (2006), es posible lograr mayores concentraciones de producto disminuyendo la velocidad específica de dilución/perfusión por célula, ya sea por disminución de la velocidad de dilución o aumento de la concentración celular.

Parámetros cinéticos

Los valores de los parámetros cinéticos y la CSDR de los estados pseudoestacionarios se muestran en la tabla 2 junto a los parámetros en la escala comercial.

Las concentraciones celulares de los estados pseudoestacionarios informados en la tabla 2 en las tres corridas de fermentación desarrolladas en el biorreactor de 50 L son superiores a las planteadas por diversos autores (Fernandez-de-Cossio-Diaz et al., 2017; Castilho et al., 2008) para cultivos continuos, a velocidades de dilución similares a las de este estudio. Estas no son comprobables a las obtenidas en el cultivo a gran escala, ya que en el modo perfusión es donde se alcanzan las mayores concentraciones celulares (Konstantinov et al., 2006).

Las velocidades específicas de crecimiento en el cultivo por lote incrementado y en el estado pseudoestacionario, así como las velocidades específicas de formación de producto, son típicas en las células de mamíferos de acuerdo a lo informado en la literatura para líneas celulares similares (Quesada-Rodríguez et al., 2025; González Álvarez, 2024; Núñez Ortiz et al., 2023; Pérez-Rodríguez et al., 2020; Castilho et al., 2008). La velocidad específica de crecimiento es comparable en el cultivo incrementado en ambas escalas sin diferencias estadísticas significativas con un valor p de 0,39, sin embargo, en el estado pseudoestacionario se observan mayores valores en las fermentaciones en el biorreactor de 50 L, por las diferencias entre los modos de operación en ambas escalas. La velocidad específica de producción fue reproducible con el cambio de escala con una diferencia inferior al 30 %, lo cual es aceptable si se toma en cuenta los errores que se introducen en el conteo celular y en la cuantificación de la concentración de producto (Sutedjo, 2022). Los valores determinados de q_p no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ambas escalas (valor p de 0,31).

La velocidad específica de crecimiento en el estado pseudoestacionario y la CSDR coinciden con las observaciones realizadas por González Álvarez (2024), para un cultivo continuo en un biorreactor de 80 L para una línea celular NS0, donde observó que para menores valores de ambos parámetros se manifiesta una tendencia a la muerte del cultivo celular. Si se tiene en cuenta que las velocidades específicas de perfusión/dilución por célula en los cultivos de células de mamífero se encuentran entre $0,05$ y $0,5$ nL/cel/d (Konstantinov et al., 2006), los resultados en la escala de 50 L logran reproducir con bastante similitud los valores de la escala comercial (valor p de 0,17).

La figura 3 muestra el comportamiento de la dispersión de aire en el sistema a partir de la condición de operación propuesta para el modelo de desescalado. En la figura 3a se puede observar el comportamiento del porcentaje de oxígeno disuelto (DO) durante las tres corridas de fermentación para flujo de aire por unidad de volumen de $0,0017$ min⁻¹. En el caso de la figura 3b se

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la línea celular NS0 en el medio de cultivo M1, temperatura $36,50 \pm 0,50$ °C, pH $6,85 \pm 0,10$ en el biorreactor de 50 L: velocidad de agitación 100 min^{-1} ; vvm de $0,0017 \text{ min}^{-1}$; en las tres corridas de fermentación y en el biorreactor de 2000 L: velocidad de agitación 80 min^{-1} ; vvm de $0,004 \text{ min}^{-1}$.

| Variables | Corrida- 1 | Corrida- 2 | Corrida- 3 | Corrida 2000 L |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| $Xv_{ee} \text{ (cel/mL)}$ | $3,30 \cdot 10^6 \pm 4,43 \cdot 10^5$ | $3,40 \cdot 10^6 \pm 4,37 \cdot 10^5$ | $3,51 \cdot 10^6 \pm 2,00 \cdot 10^5$ | $1,68 \cdot 10^7 \pm 9,07 \cdot 10^5$ |
| $\mu_{\text{bote incrementado}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$ | 0,031 | 0,030 | 0,032 | 0,035 |
| $\mu_{ee} \text{ (h}^{-1}\text{)}$ | 0,015 | 0,019 | 0,017 | 0,010 |
| $q_p \text{ (pg/cel/d)}$ | - | 4,61 | 5,02 | 6,50 |
| CSDR/CSPR (nL/cel/d) | $0,11 \pm 0,01$ | $0,13 \pm 0,02$ | $0,10 \pm 0,01$ | $0,08 \pm 0,02$ |

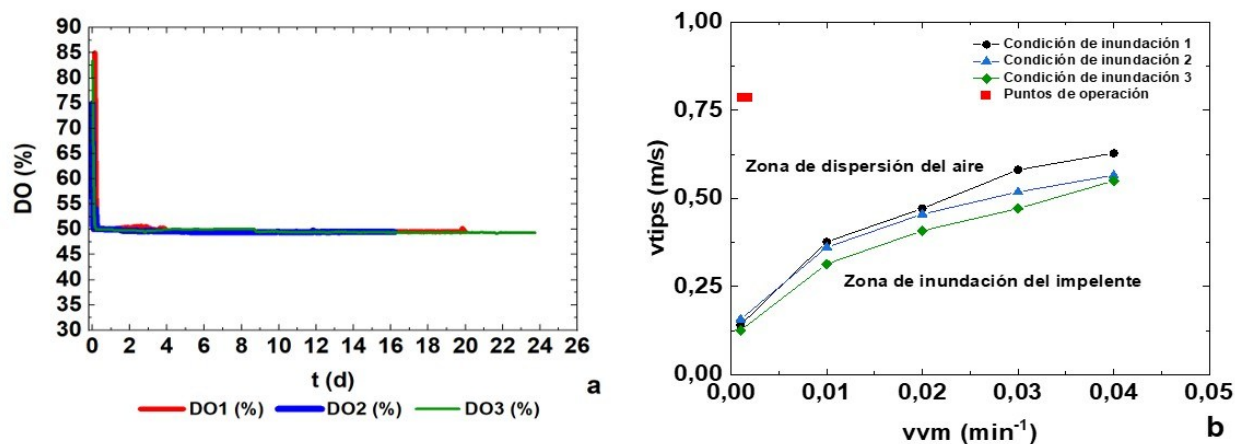


Figura 3. Comportamiento de la dispersión de aire en las tres corridas de fermentación en el biorreactor de 50 L, de la línea celular NS0, con el medio de cultivo M1, temperatura $36,50 \pm 0,50$ °C, velocidad de agitación 100 min^{-1} , vvm de $0,0017 \text{ min}^{-1}$, pH $6,85 \pm 0,10$: a- Porcentaje de oxígeno disuelto; b- Velocidad de agitación necesaria para lograr la dispersión del aire en función del flujo de gases totales en el biorreactor (adaptado de Raffo-Durán *et al.* (2014)).

comparó la zona de operación establecida en las tres fermentaciones desarrolladas con la zona de operación estudiada por Raffo-Durán *et al.* (2014), de curvas empíricas obtenidas para diferentes condiciones de inundación, con el objetivo de verificar si las condiciones de agitación y aireación propuestas se encuentran en una zona adecuada para la dispersión de aire en el sistema.

La figura 3a muestra que las tres corridas comenzaron con valores altos del porcentaje de oxígeno disuelto debido a la saturación del medio de cultivo previo a la inoculación; estos valores disminuyeron rápidamente producto del consumo de oxígeno por parte de las células. Esta variable se estabilizó alrededor del 50 %, lo que indica un buen control de la transferencia de oxígeno hacia el cultivo a partir de la condición de aireación determinada por la ecuación 9.

La zona de operación de la fermentación en el biorreactor de 50 L fue comparada con la adaptación de las curvas empíricas referidas por Raffo-Durán *et al.* (2014). La combinación de las condiciones de agitación y aireación

propuestas fue capaz de garantizar una adecuada dispersión de aire en el sistema, como se observa en la figura 3b, alejada de la condición de inundación del impelente.

DISCUSIÓN

El estudio de las mejoras en los procesos de cultivo celular, por ejemplo, la formulación del medio de cultivo, las condiciones del proceso, así como cambios en la línea celular son habituales durante el ciclo de vida y desarrollo de un producto biotecnológico. De ahí que la utilización de modelos a escalas de laboratorio y piloto hayan cobrado relevancia en las últimas décadas, al permitir la evaluación de diferentes condiciones experimentales e identificar patrones y comportamientos a costos mucho menores que si se realizara la experimentación en la escala industrial. Sin embargo, hasta el momento no existe una única directriz universal sobre como diseñar, operar y escalar estos bioprocesos. En la presente investigación se empleó como modelo de desescalado un cultivo continuo en un biorreactor de 50 L de volumen efectivo. Se realizó una caracterización de la cinética del

cultivo en esta escala a partir de las velocidades específicas de crecimiento y de formación de producto, así como la velocidad específica de dilución/perfusión por célula, y los resultados son comparables con los de la fermentación a gran escala (González Álvarez, 2024).

En los cultivos celulares de biorreactores tipo tanque agitado el mezclado es un parámetro crítico para una operación exitosa; permite la homogenización de la temperatura, el pH y la concentración de nutrientes; además previene la formación de productos tóxicos del metabolismo (García-Ochoa *et al.*, 2020). Las células de mamíferos son consideradas muy sensibles a los efectos de cizallamiento (Nienow, 2021; García-Ochoa *et al.*, 2020), altas velocidades de agitación pueden provocar efectos cortantes que afecten la población celular; sin embargo, bajas velocidades provocan un pobre mezclado del cultivo y en ocasiones agregados celulares. En el presente estudio se empleó como criterio el tiempo de mezclado como regla empírica para determinar la velocidad de agitación. De acuerdo a la metodología de Van't Riet y Van der Lans (2011) el tiempo de mezclado estimado en los biorreactores es de 25 segundos; este es despreciable frente al tiempo de duplicación de las células, el cual es de 24 a 48 horas. Esto es importante pues garantiza una homogeneidad instantánea del sistema de cultivo, frente al tiempo de reacción, a la vez que permite hacer consideraciones en los patrones de flujo que simplifiquen el análisis de fenómenos de transferencia de masa y otros procesos hidrodinámicos. El criterio de escalado empleado para mantener el tiempo de mezclado constante implica un aumento en la potencia ya que el cultivo requiere una mayor velocidad de agitación, no obstante, esto no constituye un problema al tratarse de un desescalado.

La relación de flujo de aire por unidad de medio al distribuidor de gases en los biorreactores de pequeña escala es usualmente superior que en los de mayor volumen, esto se realiza para mantener igual demanda de oxígeno disuelto y bajas concentraciones de CO₂ (Xie *et al.*, 2003); por ello al disminuir de escala el criterio más utilizado es mantener constante la velocidad superficial. En el estudio se utilizó el criterio de mantener constante el coeficiente de transferencia de masa pues los requerimientos de oxígeno en el cultivo para cada biorreactor son diferentes; el biorreactor de 2000 L opera en modo continuo con recirculación de biomasa, alcanza concentraciones celulares cercanas a los $2,00 \cdot 10^7$ cel/mL; sin embargo, el biorreactor de 50 L opera en modo continuo donde las concentraciones celulares son mucho menores (Castilho *et al.*, 2008). Los criterios utilizados para el desescalado a partir de mantener el tiempo de mezclado y el coeficiente de transferencia de masa constantes permitió el desarrollo de tres corridas experi-

mentales reproducibles con una buena viabilidad y concentraciones celulares altas para cultivos continuos (Fernandez-de-Cossio-Diaz *et al.*, 2017; Castilho *et al.*, 2008), aunque se observa que los valores de CSDR son elevados de acuerdo los valores mínimos informados en la literatura (Mayrhofer *et al.*, 2021; Wolf *et al.*, 2019).

Algunos autores no comparten el criterio de utilizar la microescala de turbulencia de Kolmogorov como indicador del daño celular y utilizan otros criterios. Kaur Gill (2013) refiere que el esfuerzo cortante se considera proporcional a la velocidad de punta del impelente y que el daño celular se produce a velocidades superiores a 3,2 m/s; aunque está afectado por diversos factores como la reología del cultivo. La velocidad tangencial determinada para los criterios de potencia por unidad de volumen y de velocidad tangencial constantes para el desescalado se encuentran alejados del valor planteado por Kaur Gill (2013), por lo que se pudieran tomar en cuenta estos criterios para futuras condiciones experimentales.

El desarrollo de un modelo de fermentación a escala de 50 L permitirá la exploración de diferentes espacios operacionales, a fin de evaluar nuevas formulaciones de medio de cultivo, lo que a su vez será de gran importancia para el desarrollo de estrategias de alimentación orientadas a mejorar el rendimiento y la productividad de los cultivos celulares.

CONCLUSIONES

El desescalado a partir de mantener constante el tiempo de mezclado y el coeficiente de transferencia de masa es factible para el biorreactor de 50 L; con una velocidad de agitación de 100 min⁻¹ y un flujo de gases totales de 0,085 L/min. Las condiciones de velocidad de agitación y aeración en el biorreactor de 50 L propuestas generan remolinos de aproximadamente 53 μm, superiores al diámetro de las células de mamíferos, se puede afirmar que no tiene impacto en el daño celular a partir del criterio de la microescala de turbulencia de Kolmogorov. Los parámetros operacionales propuestos en el modelo de desescalado permiten alcanzar concentraciones celulares estables superiores a los $3 \cdot 10^6$ cel/mL en cultivo continuo, con velocidades específicas de crecimiento y de producción en el orden de las referenciadas en la literatura para el cultivo de células de mamífero, sin diferencias estadísticas significativas respecto al cultivo a gran escala. La condición de operación del biorreactor se encuentra en la zona de dispersión de aire, fuera de la inundación del impelente. Esta combinación de criterios puede ser utilizada para intentar comprender fenómenos que se presenten a diferentes escalas productivas y en modos operacionales diferentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Aiba, S., Humphrey, A. E., & Millis, N. F. (1973). *Biochemical engineering*: Academic press.
- Boggiano-Ayo, T., Palacios-Oliva, J., Lozada-Chang, S., Relova-Hernandez, E., Gomez-Perez, J., Oliva, G., . . . Mora, O. (2023). Development of a scalable single process for producing SARS-CoV-2 RBD monomer and dimer vaccine antigens. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1287551.
- Castilho, L., Moraes, A., Augusto, E., & Butler, M. (2008). *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy*: Taylor & Francis.
- Fernandez-de-Cossio-Diaz, J., Leon, K., & Mulet, R. (2017). Characterizing steady states of genome-scale metabolic networks in continuous cell cultures. *PLoS computational biology*, 13(11), e1005835.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., & Santos, V. E. (2020). Fluid dynamic conditions and oxygen availability effects on microbial cultures in STBR: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 164, 107803.
- González Álvarez, A. (2024). *Metodología para determinar las condiciones de mayor productividad volumétrica en los procesos de fermentación del CIM*. (Tesis de maestría). Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría",
- Hall, S. (2017). *Rules of thumb for chemical engineers*: Butterworth-Heinemann.
- Hayrapetyan, H., Tran, T., Tellez-Corrales, E., & Madiraju, C. (2023). Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications. *ELISA: methods and protocols*, 1-17.
- Kaur Gill, N. (2013). *Design and characterisation of parallel miniature bioreactors for bioprocess optimisation and scale-up*. (Tesis de doctorado). Biochemical Engineering.
- Konstantinov, K., Goudar, C., Ng, M., Meneses, R., Thrift, J., Chuppa, S., . . . Naveh, D. (2006). The "push-to-low" approach for optimization of high-density perfusion cultures of animal cells. *Cell culture engineering*, 75-98.
- Langheinrich, C., Nienow, A., Eddleston, T., Stevenson, N., Emery, A., Clayton, T., & Slater, N. (1998). Liquid homogenization studies in animal cell bioreactors of up to 8 m³ in volume. *Food and Bioproducts Processing*, 76(2), 107-116.
- Mayrhofer, P., Castan, A., & Kunert, R. (2021). Shake tube perfusion cell cultures are suitable tools for the prediction of limiting substrate, CSPR, bleeding strategy, growth and productivity behavior. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(10), 2930-2939.
- Nienow, A. W. (2006). Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, 50(1), 9-33.
- Nienow, A. W. (2021). The impact of fluid dynamic stress in stirred bioreactors—the scale of the biological entity: a personal view. *Chemie Ingenieur Technik*, 93(1-2), 17-30.
- Núñez Ortiz, R. R., Pérez Pérez, D., Duarte Castro, M., Fernández de la Vega Velázquez, J., Fernández Oliva, O., Fernandez-de-Cossio-Diaz, J., . . . Chico, E. (2023). Kinetic modeling of NS0 cell line growth impairment in perfusion. *Biotechnol Apl.*, 40(2), 2201-2207.
- Pérez-Rodríguez, S., Ramírez-Lira, M. d. J., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2020). Nutrient supplementation strategy improves cell concentration and longevity, monoclonal antibody production and lactate metabolism of Chinese hamster ovary cells. *Bioengineered*, 11(1), 463-471.
- Quesada-Rodríguez, J. d. I. C., Núñez-Ortiz, R. R., Fernández de la Vega-Velázquez, J. A., Duarte-Castro, M. C., & Chico-Véliz, E. (2025). Establecimiento de la zona de operación para el cultivo a gran escala de células de ovario de hámster chino en la obtención de una vacuna viral. *VacciMonitor*, 34.
- Quintero, R. (1990). Escalamiento de fermentaciones. *Ingeniería Bioquímica: Teoría y aplicaciones*. Ed. Alhambra Mexicana, México, 87.
- Raffo-Durán, J., Dustet-Mendoza, J., & Figueredo-Cardero, A. (2014). Características de la hidrodinámica de un biorreactor industrial tipo tanque agitado. *Revista mexicana de ingeniería química*, 13(3), 823-839.
- Sutedjo, R. (2022). Cell culturing and preparation in biomanufacturing Handbook V1. 0.
- Tang, P., Xu, J., Louey, A., Tan, Z., Yongky, A., Liang, S., . . . Liu, S. (2020). Kinetic modeling of Chinese hamster ovary cell culture: factors and principles. *Critical reviews in biotechnology*, 40(2), 265-281.
- Van't Riet, K., & Van der Lans, R. (2011). 2.07 Mixing in Bioreactor Vessels. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Academic Press, Burlington, 63-80.
- Wolf, M. K., Pechlaner, A., Lorenz, V., Karst, D. J., Souquet, J., Broly, H., & Morbidelli, M. (2019). A two-step procedure for the design of perfusion bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 151, 107295.
- Xie, L., Metallo, C., Warren, J., Pilbrough, W., Peltier, J., Zhong, T., . . . Aunış, J. G. (2003). Large-scale propagation of a replication-defective adenovirus vector in stirred-tank bioreactor PER. C6™ cell culture under sparging conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 83(1), 45-52.
- Zhang, L. (2020). *Development of mathematical modelling for the glycosylation of IgG in CHO cell cultures*. (Tesis de doctorado). KTH-Royal Institute of Technology.