

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

Jennifer de la Caridad Quesada-Rodríguez^{1,2*} ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-5075-3759>

Roberto Rafael Núñez-Ortiz^{1,2} ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-8714-9644>

José Antonio Fernández de la Vega-Velázquez¹ ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-5726-7440>

María Caridad Duartes-Castro^{1,2} ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-2984-8592>

Ernesto Chico-Véliz^{1,2} ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-6717-7288>

¹ Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba.

² Facultad de Ingeniería Química. Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”. La Habana, Cuba.

Autor por correspondencia: jenniferquesadardiguez@gmail.com

El cultivo de células de mamífero en perfusión se caracteriza por alcanzar mayores densidades celulares y la más alta productividad. En el Centro de Inmunología Molecular, con más de 15 años de experiencia en el empleo de esta tecnología a nivel industrial, se desarrolló el cultivo en perfusión de células de ovario de hámster chino productoras de la proteína recombinante rC21 (materia prima biológica empleada en la formulación de una vacuna viral) en un biorreactor tipo tanque agitado de 2.000 L de volumen efectivo. La presente investigación se enfocó en establecer la zona de operación en el cultivo a gran escala a partir de la caracterización de la ingeniería de procesos, en función de parámetros hidrodinámicos. Se estableció una velocidad tangencial de 1,41 m/s que implicó operar una potencia por unidad de volumen alejada 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 a partir del criterio de la microescala de turbulencia de Kolmogorov. La zona de operación posibilitó alcanzar una alta viabilidad celular y parámetros cinéticos típicos de las células de mamíferos.

Palabras clave: perfusión; células CHO; reactores biológicos.

Introducción

El cultivo de células animales fue desarrollado inicialmente para la producción de vacunas virales y un número limitado de proteínas naturales como los interferones. El descubrimiento de la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales y los avances biotecnológicos provocaron una expansión en el número de bioproductos que se obtienen a partir de las células animales. Estas permiten la producción de manera casi exclusiva de biológicos y biofármacos complejos (vacunas tradicionales y recombinantes, proteínas recombinantes glicosiladas, anticuerpos monoclonales, vectores virales para terapia génica, entre otros). Además, brindan dos características fundamentales para la

actividad de un biofármaco como son el plegamiento correcto de las proteínas y la glicosilación compleja, es posible que secreten el biofármaco al medio de cultivo.⁽¹⁾

Las células de ovario de hámster chino (CHO) son la más común elección para la producción de proteínas recombinantes. Son capaces de alcanzar alta productividad, demuestran fenotipos de crecimiento consistentemente buenos, se pueden adaptar a medios químicamente definidos y, por lo general, no generan variantes de productos cuyas modificaciones postraduccionales presenten una preocupación por la calidad del producto. Se conoce que esta línea celular carece de enzimas para permitir la glicosilación terminal observada en las proteínas humanas. Diversos

* Máster en Procesos Biotecnológicos, Especialista III en Investigación, Innovación y Desarrollo, Profesor Instructor. Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba.

investigadores han clonado sub-líneas transfectadas con genes que codifican dichas enzimas, siendo las mismas CHO-K1, CHO-S, CHO-DUKX/B11 y CHO-DG44.⁽²⁾

El desarrollo de un proceso biotecnológico es un enfoque sistemático e iterativo dedicado a la optimización y estandarización de los procesos utilizados en la producción de biofármacos. En fases tempranas consiste en la generación y desarrollo de líneas celulares y la selección del clon principal hasta la conformación de los bancos celulares de investigación y maestro. Posteriormente ocurre el desarrollo del proceso a escala piloto para ajustar diversos parámetros como la composición del medio de cultivo, el pH, la temperatura, la agitación, la aeración, las estrategias de alimentación y otras variables que afectan la expresión del producto de interés.^(3,4) Además, se debe garantizar que el proceso desarrollado sea escalable para satisfacer la demanda comercial y que, independientemente de la escala, sea reproducible con una variación mínima para garantizar la calidad y eficiencia constante del proceso productivo.

Los bioprocesos para la producción de proteínas recombinantes a nivel mundial descansan en su mayoría en el uso de biorreactores tipo tanque con agitación;⁽⁵⁾ estos pueden operar en modos diferentes a partir de varios criterios como: la estabilidad de la línea celular, el tipo de producto de interés o la complejidad operacional.⁽⁵⁾ El Centro de Inmunología Molecular (CIM) tiene como plataforma productiva el modo continuo con recirculación celular, pues tiene una potencialidad de alcanzar las mayores densidades celulares y altas productividades. Además, este modo de operación tiene numerosas ventajas respecto a los otros; entre las que se incluyen la capacidad de mantener bajos los niveles de subproductos del metabolismo celular inhibidores del crecimiento y menor tiempo de residencia del producto, lo cual contribuye a la preservación de la proteína de interés.^(5,6)

En los procesos biofarmacéuticos, el biorreactor utilizado, así como su diseño, revisten una gran importancia. El biorreactor es un elemento clave para la optimización del proceso, ya que en él se llevan a cabo operaciones como la homogeneización, la dispersión, la suspensión de partículas sólidas y la transferencia de calor. En consecuencia, es necesario un conocimiento

detallado del sistema de cultivo utilizado para el escalado o la transferencia de procesos, que puede obtenerse mediante la caracterización de la ingeniería de procesos.⁽⁷⁾

En el CIM se emplea un biorreactor de 2.000 L de volumen efectivo como plataforma tecnológica para la producción de anticuerpos monoclonales, mediante el cultivo de la línea celular murina no secretora (NS0); se requiere evaluar si esta escala pudiera emplearse como plataforma para la obtención de vacunas virales. El objetivo de esta investigación fue establecer la zona de operación en el biorreactor de 2.000 L, mediante la caracterización de la ingeniería de procesos, para la obtención de la materia prima biológica de una vacuna viral a partir del cultivo en perfusión de células CHO-K1.

Materiales y Métodos

Línea celular

La línea celular utilizada fue la CHO-K1, derivada de un subclón de la línea CHO parental y productora de la proteína recombinante rC21, empleada como materia prima biológica para la formulación de una vacuna viral.

Biorreactor a gran escala

El biorreactor de producción comercial, tiene un volumen de trabajo de 2.000 L (*Bioengineering* AG; Suiza), un diámetro (D_T) de 1,28 m y la altura del líquido (H_L) es de 1,65 m. Este biorreactor se emplea actualmente como plataforma tecnológica para la obtención de anticuerpos monoclonales mediante el cultivo de la línea celular NS0.⁽⁸⁾ 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.⁽⁸⁾

La temperatura en el interior del biorreactor se controla mediante un sistema consistente en dos intercambiadores de calor de placas, que enfrían o calientan el volumen de agua contenido en la chaqueta. Además, se alimenta una corriente de aire para mantener una presión constante en el vaso. Los niveles de oxígeno disuelto se controlan entre el 20 y 100 % de

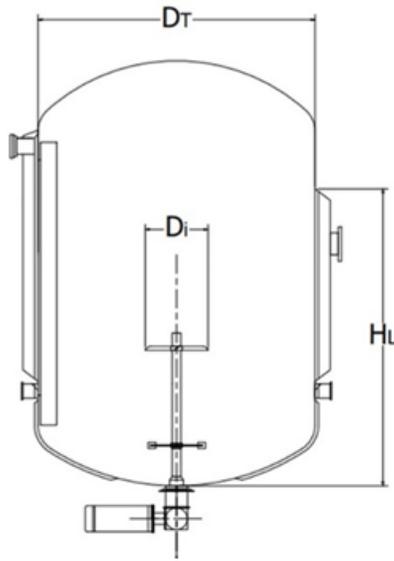


Fig. 1. Esquema representativo de los sistemas tipo tanque agitado *Bioengineering*.

saturación de aire, para el que se alimenta una mezcla de oxígeno y aire a través del distribuidor de gases.⁽⁸⁾

El biorreactor opera en un primer momento en lote incrementado y a partir de alcanzar el volumen de trabajo, en modo continuo con retención de biomasa o perfusión. La operación de perfusión se desarrolla con el uso de dispositivos de retención celular, denominados rotofiltros (cilindros rotarios que giran sobre su eje y permiten la separación celular para la recirculación hacia el biorreactor) con un diseño redundante de dos rotofiltros, que trabajan de forma alterna.^(8,9) La Figura 1 muestra un esquema representativo del biorreactor *Bioengineering*.

Caracterización de la ingeniería de procesos

El proceso de fermentación a gran escala fue establecido a partir de caracterizar la zona de operación en cuanto a la hidrodinámica del sistema, de acuerdo a la metodología de ingeniería de procesos descrita por Dreher y colaboradores en 2014.⁽⁷⁾ Para ello se determinó el régimen de trabajo, la velocidad en la punta del impelente, la potencia por unidad de volumen (ecuaciones 1, 2, 3, respectivamente) y el tamaño de los remolinos, un indicador potencial del daño celular (ecuación 4).

$$Re = \frac{N \cdot \rho \cdot D_i^2}{\eta} \quad \text{ecuación 1}$$

$$v_{tip} = \pi \cdot N \cdot D_i \quad \text{ecuación 2}$$

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

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

donde:

Re: Número de Reynolds (Re)

N: velocidad de agitación

v_{tip} : velocidad tangencial

P: potencia

V: volumen

ρ : densidad de líquido

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

η : viscosidad dinámica

l: tamaño de los remolinos.

Proceso de fermentación a gran escala

A partir de establecer la zona de operación para el cultivo de esta línea celular a gran escala, se desarrolló una corrida de fermentación para analizar el desempeño del cultivo celular bajo estas condiciones. Se empleó el medio de cultivo libre de proteínas y de suero animal M-1, análogo al empleado por Hernández y colaboradores en 2010.⁽¹⁰⁾ La temperatura fue controlada a $36,5 \pm 0,5$ °C y el pH de 6,5 a 7,2.^(8,11,12) El biorreactor fue muestreado diariamente para determinar, por observación al microscopio mediante el método de exclusión con tripán azul, la concentración celular (X) y la viabilidad a partir de un inóculo con una concentración de células vivas de $1,03 \times 10^6$ cel/mL y una viabilidad celular de 97,24 % en un volumen de 600 L.

La adición de medio de cultivo comenzó el segundo día de corrida hasta completar el volumen de trabajo (2.000 L), en un tiempo aproximado de 24 horas. A partir de este momento, se inició el cultivo continuo con retención de biomasa a una velocidad de dilución de $0,30 \text{ d}^{-1}$, la cual se aumentó en función del incremento en la

concentración celular. Con el objetivo de ayudar a mantener un buen estado fisiológico del cultivo celular, a partir del día 6 se realizaron purgas a razón de 0,12 d⁻¹ y 0,15 d⁻¹.

Se determinó la velocidad específica de crecimiento celular (μ) a partir de la solución del balance de masa para la biomasa en modo continuo con recirculación de células y corriente de purga, en la etapa de crecimiento exponencial (ecuación 5).

$$X + \int_{t_0}^t (\alpha \cdot D_p \cdot X + D_{bl} \cdot X) \cdot dt = \mu \int_{t_0}^t X \cdot dt + X_0 \quad \text{ecuación 5}$$

donde:

t: tiempo de corrida (d)

X: concentración de células vivas (cel/mL)

α : factor de pase del dispositivo de retención

D_p: velocidad de dilución de perfusión (d⁻¹)

D_{bl}: velocidad de dilución de purga (d⁻¹)

μ : velocidad específica de crecimiento (d⁻¹)

X₀ y t₀: concentración de células vivas y tiempo de corrida, al inicio de la perfusión.

La velocidad específica de perfusión celular (CSPR, por sus siglas en inglés), variable habitualmente usada en el monitoreo y control de los procesos de fermentación en perfusión, se determinó a partir de los valores de dilución (D) (ecuación 6).

$$\text{CSPR} = \frac{D}{X} \quad \text{ecuación 6}$$

Influencia de la aeración

Se analizó la combinación de la velocidad de agitación y el flujo de gases totales por volumen de medio de cultivo (vvm) (ecuación 7), pues los cultivos de células de mamíferos son muy propensos a trabajar en condiciones de inundación del impelente, caracterizadas por un alto flujo de aire y baja agitación.⁽¹³⁾

$$\text{vvm} = \frac{Q}{V} \quad \text{ecuación 7}$$

donde:

Q- flujo de gases al distribuidor de gases.

Resultados y Discusión

Caracterización de la zona operacional en el biorreactor de 2.000 L

La agitación tiene entre sus funciones, en el biorreactor, mantener la homogeneidad del medio de fermentación y a las células en suspensión. La homogeneidad se persigue con el propósito de evitar zonas donde la velocidad de la reacción se vea limitada por la formación de gradientes que provocan los fenómenos de difusión, de esta forma se aprovecha eficientemente el volumen efectivo. Estos gradientes pueden provocar efectos negativos en el crecimiento y en la expresión de la proteína de interés.⁽¹⁴⁾

El primer parámetro a determinar en el proceso de fermentación de la línea celular CHO-K1 en el biorreactor de 2.000 L es la velocidad de agitación. La máxima que permite la operación de este sistema por diseño original es 100 min⁻¹,⁽⁸⁾ no obstante, se ha trabajado a un valor máximo de 80 min⁻¹ en la fermentación de la línea celular NS0 en este biorreactor, que se corresponde con una velocidad tangencial de 1,88 m/s.⁽⁸⁾ En el cultivo de la línea celular CHO, para obtener otras proteínas recombinantes en el CIM, se ha empleado una velocidad tangencial de 1,41 m/s,^(12,15) que se encuentra en los intervalos típicos de operación en biorreactores industriales.⁽¹⁴⁾ Las células de mamífero son sensibles a los esfuerzos mecánicos por altas intensidades de agitación que pueden provocar daño celular, por lo que se decide operar a 60 min⁻¹ (1,41 m/s), pues se desconoce el efecto de la agitación en el desempeño de esta línea celular a gran escala. Diversos autores refieren que en este tipo de cultivos se deben garantizar velocidades tangenciales no superiores a 2,50 m/s, para evitar daño celular.^(13,16)

En este sentido también se debe considerar la potencia por unidad de volumen, criterio empleado para el escalado en los procesos biotecnológicos que se relaciona con las fuerzas de cizallamiento que ocasionan daño en los cultivos de células de mamífero. Según la ecuación 3, operar a 1,41 m/s implica una potencia por unidad de volumen de 58,60 W/m³, valor inferior a 250 W/m³, reportado por Nienow en 2006⁽¹⁶⁾ para el cual se recomienda trabajar en estos sistemas, sin afectar la proliferación celular y la expresión de la proteína de interés.

En la actualidad son manejados varios criterios acerca del daño celular debido a la agitación; entre los más utilizados se encuentra la microescala de turbulencia o número de Kolmogorov. La teoría de Kolmogorov identifica al remolino más pequeño o eddie, en función de la velocidad de disipación de energía y de la viscosidad cinemática del fluido. Mientras menor sea el 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 porque puede acomodarse en su interior.⁽¹⁶⁾ A partir de la relación de P/V para la velocidad de agitación de 60 min^{-1} y la viscosidad cinemática del agua a la temperatura de trabajo, se determinó que el tamaño de la microescala de turbulencia de Kolmogorov (ecuación 4) es de $49,80 \mu\text{m}$; las células de mamíferos como las de la línea CHO tienen diámetros de $10\text{-}20 \mu\text{m}$,⁽¹⁴⁾ por esta razón se pudiera descartar daño celular bajo la condición propuesta.

A partir de la caracterización del espacio de diseño en el biorreactor de 2.000 L, se propone emplear una velocidad de agitación de 60 min^{-1} en la operación de perfusión. De acuerdo a la metodología de trabajo en este biorreactor para la línea celular NS0, se propone variar la velocidad de agitación desde 30 min^{-1} hasta 45 min^{-1} en función del volumen de trabajo (500 L a 2.000 L) y una vez iniciado el cultivo continuo con retención de biomasa operar a 60 min^{-1} .⁽⁸⁾

Fermentación de la línea celular CHO-K1 en el biorreactor de 2.000 L

Las condiciones de agitación propuestas fueron evaluadas en una corrida de fermentación de la línea celular CHO-K1 en el biorreactor de 2.000 L. En la Figura 2 se muestra el comportamiento de la concentración celular, la viabilidad y la velocidad de dilución de perfusión y de purga en la corrida de fermentación desarrollada en el biorreactor de 2.000 L.

En la Figura 2 se observa que la fase de adaptación fue imperceptible y el final de la etapa exponencial de crecimiento e inicio del estado pseudoestacionario se alcanzó en el quinto día de la corrida, a una concentración celular de $8,37 \times 10^6 \text{ cel/mL}$. En estas

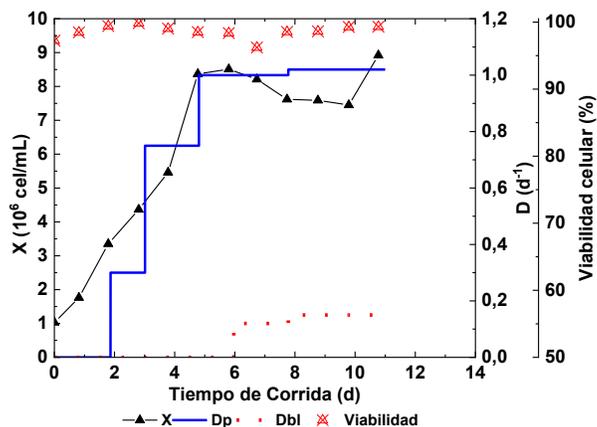


Fig. 2. Comportamiento de la concentración celular, la viabilidad y la velocidad de dilución de la línea celular CHO-K1 productora de la proteína recombinante rC21, en el medio de cultivo M-1, en el biorreactor de 2.000 L; temperatura $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, velocidad de agitación 60 min^{-1} , flujo de aire por unidad de volumen de $0,004 \text{ min}^{-1}$, pH 6,5 -7,0. X: concentración celular. Dp: velocidad de dilución de perfusión. Dbl: velocidad de purga.

condiciones se trabajó a una máxima dilución total de $1,17 \text{ d}^{-1}$ y la concentración celular se mantuvo próxima a $9,00 \times 10^6 \text{ cel/mL}$, análoga a la reportada por Boggiano-Ayo y colaboradores,⁽¹²⁾ para el cultivo de la línea celular CHO-K1 productora de la proteína recombinante RBD-His en similares condiciones en un biorreactor de 500 L de volumen efectivo.

La determinación gráfica de la velocidad específica de crecimiento en la etapa de crecimiento exponencial se muestra en la Figura 3.

El valor de la velocidad específica de crecimiento en el cultivo continuo con retención de biomasa en la etapa de crecimiento ($0,38 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$) se encuentra en el intervalo típico de la velocidad específica de crecimiento en los cultivos de células de mamíferos de $0,20 \text{ d}^{-1}$ a $0,50 \text{ d}^{-1}$.^(5,11,17,18) Se obtiene un buen ajuste en la determinación de la μ con un coeficiente R^2 de 97 %.

Por su parte, la velocidad específica de perfusión celular fue de $0,15 \pm 0,015 \text{ nL/cel/d}$. Esta variable representa el volumen de medio de cultivo consumido por una célula en un día y tiene gran influencia en la estabilidad y mantenimiento de un adecuado ambiente para el crecimiento celular y la continua producción de la

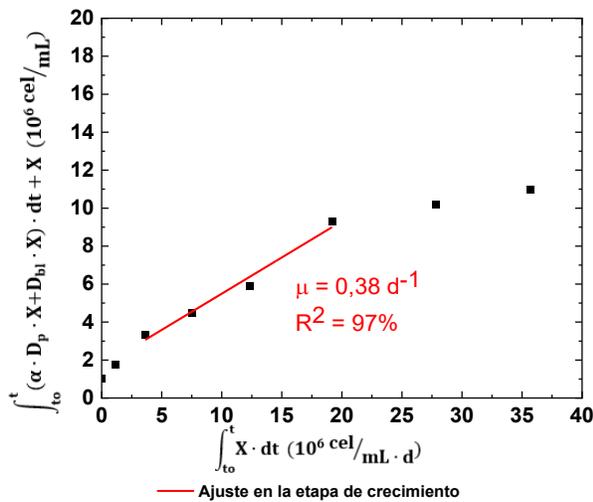


Fig. 3. Determinación de la velocidad específica de crecimiento de la línea celular CHO-K1 productora de la proteína recombinante rC21, en el medio de cultivo M-1, en el biorreactor de 2.000 L; temperatura $36,5 \pm 0,5$ °C, velocidad de agitación 60 min^{-1} , flujo de aire por unidad de volumen de $0,004 \text{ min}^{-1}$, pH 6,5-7,0. t: tiempo de corrida (d). X: concentración de células vivas (cel/mL). α : factor de pase del dispositivo de retención. D_p : velocidad de dilución de perfusión. D_{bl} : velocidad de dilución de purga. μ : velocidad específica de crecimiento.

proteína de interés. Su valor se encuentra en el intervalo referido por Boggiano-Ayo y colaboradores⁽¹²⁾ y por Konstantinov y colaboradores⁽¹⁹⁾ de 0,05 a 0,50 nL/cel/d, para el cultivo de células de mamíferos.

Influencia de los parámetros de operación en el desempeño de la línea celular CHO-K1 a gran escala

En la Figura 4 se muestra la zona de operación en cuanto a la concentración celular y la viabilidad en función de las condiciones de aeración y agitación en el biorreactor de 2.000 L.

El valor máximo de flujo de aire por volumen de medio de cultivo al cual se operó fue de $0,0049 \text{ min}^{-1}$ (dado fundamentalmente por el flujo de oxígeno que demanda el cultivo celular). Este es otro de los parámetros que influye en el adecuado desempeño del crecimiento celular. El criterio de los límites en los que se debe operar varía de acuerdo a las características del sistema y la línea celular. Nienow en 2006⁽¹⁶⁾ refirió que es posible trabajar a un flujo de gases por volumen de medio de $0,010 \text{ min}^{-1}$ en sistemas con macroburbujeadores de tubo sin que se evidencie daño en el cultivo celular. La zona de operación establecida por la combinación de la velocidad tangencial y el flujo de gases por volumen de medio no tuvo impacto en el desempeño de la línea celular CHO-K1 a gran escala; se obtuvieron viabilidades celulares superiores al 97% y se alcanzaron concentraciones celulares cercanas a $9,00 \times 10^6 \text{ cel/mL}$. Esta zona de operación se corresponde con la del cultivo de otra línea celular en este sistema para la obtención del anticuerpo monoclonal nimotuzumab.⁽⁸⁾

Las condiciones de bajas velocidades de agitación y relativamente altos valores de flujo de aire, son

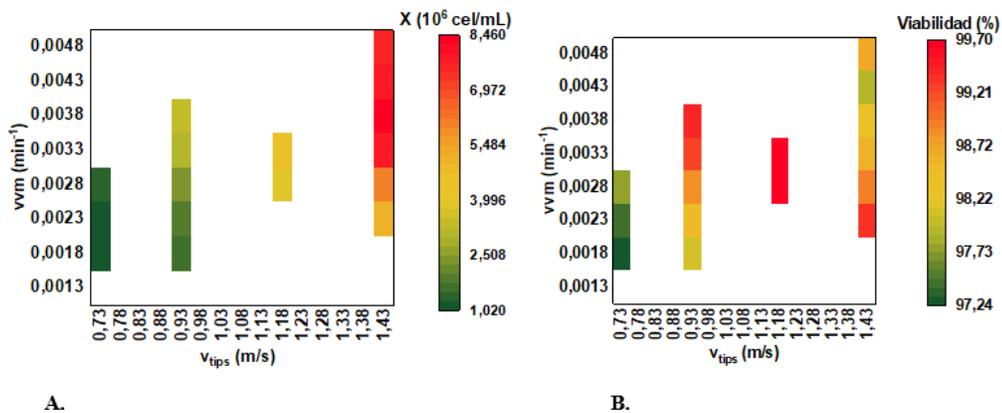


Fig. 4. Zona de operación en función de la velocidad tangencial (v_{tips}) y el flujo de gases totales por volumen de medio de cultivo (vvm) de la línea celular CHO-K1 productora de la proteína recombinante rC21, en el medio de cultivo M-1, en el biorreactor de 2.000 L; temperatura $36,5 \pm 0,5$ °C, pH 6,5-7,0. A. comportamiento de la concentración celular (X). B. comportamiento de la viabilidad.

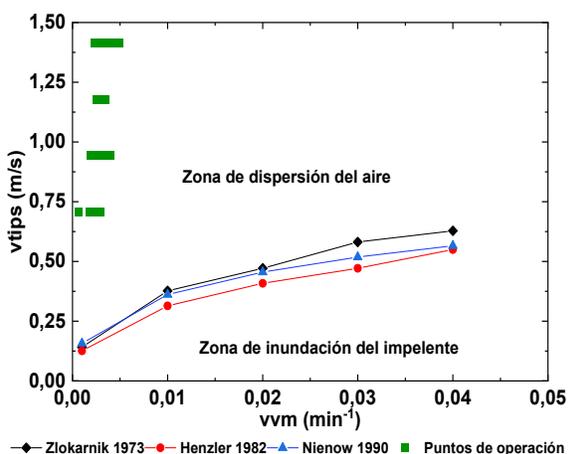


Fig. 5. Velocidad tangencial (v_{tips}) mínima para lograr la dispersión del aire en función del flujo de gases totales por volumen de medio de cultivo (vvm) de la línea celular CHO-K1 productora de la proteína recombinante rC21, en el medio de cultivo M-1, en el biorreactor de 2.000 L; temperatura $36,5 \pm 0,5$ °C, pH 6,5-7,0. Adaptado de Raffo y colaboradores.⁽¹³⁾

condiciones típicas de inundación del impelente, donde la corriente de aire domina el flujo del sistema. Este fenómeno hace ineficiente la dispersión del gas, pues disminuye bruscamente la velocidad de transferencia de masa gas-líquido y la retención del gas en el volumen del líquido, lo cual es una condición indeseable.^(14,16) Raffo y colaboradores⁽¹³⁾ establecieron las zonas de operación en un biorreactor de 1.100 L para garantizar una adecuada dispersión del aire, en función del flujo de gases y la velocidad de agitación. Se toma como referencia la zona de operación establecida por Raffo y colaboradores,⁽¹³⁾ a partir de curvas empíricas obtenidas por otros investigadores^(20,21,22) para condiciones de inundación, y se insertan los puntos de operación de la fermentación en el biorreactor de 2.000 L para analizar si la combinación de estos dos parámetros (agitación y aeración) garantiza una adecuada dispersión de aire en el sistema (Fig. 5).

Los puntos de operación en la Figura 5 se encuentran por encima de las curvas de la literatura para representar la frontera entre las condiciones de dispersión y de inundación, y alejados de esta condición, por lo que la oxigenación del cultivo celular ocurre eficientemente.

Conclusiones

La escala de fermentación de 2.000 L empleada actualmente en la obtención de anticuerpos monoclonales puede emplearse como plataforma para la producción de vacunas virales, a partir del cultivo de la línea celular CHO-K1.

Se propuso una zona de operación para el proceso de fermentación a gran escala de la línea celular CHO-K1 productora de la proteína recombinante rC21, a partir de la caracterización de la ingeniería del proceso. La velocidad tangencial propuesta (1,41 m/s), en combinación con el flujo de aire posibilitó un desempeño favorable de los procesos de transferencia en este sistema y del crecimiento celular, con valores típicos en los parámetros cinéticos del cultivo de células de mamíferos.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

Jennifer de la Caridad Quesada-Rodríguez: conceptualización, procesamiento de los datos, análisis de resultados y redacción.

Roberto Rafael Núñez-Ortiz: conceptualización, supervisión, redacción, revisión.

José Antonio Fernández de la Vega-Velázquez: experimentación, supervisión, revisión.

María Caridad Duartes-Castro: experimentación, supervisión, revisión.

Ernesto Chico-Véliz: conceptualización, supervisión, revisión.

Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

Referencias

- Lalonde ME, Durocher Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J Biotechnol.* 2017;251:128-40. doi: <https://10.1016/j.jbiotec.2017.04.028>.
- Reinhart D, Damjanovic L, Kaisermayer C, Sommeregger W, Gili A, Gasselhuber B, et al. Bioprocessing of Recombinant CHO-K1, CHO-DG44, and CHO-S: CHO

- Expression Hosts Favor Either mAb Production or Biomass Synthesis. *Biotechnol J.* 2019;14(3):e1700686. doi: <https://10.1002/biot.201700686>.
3. Xu J, Ou J, McHugh KP, Borys MC, Khetan A. Upstream cell culture process characterization and in-process control strategy development at pandemic speed. *MAbs.* 2022;14(1):2060724. doi: <https://10.1080/19420862.2022.2060724>.
 4. Castellanos MM, Gressard H, Li X, Magagnoli C, Moriconi A, Stranges D, et al. CMC strategies and advanced technologies for vaccine development to boost acceleration and pandemic preparedness. *Vaccines.* 2023;11(7):1153. doi: <https://10.3390/vaccines11071153>.
 5. Castilho L, Moraes A, Augusto E, Butler M, editors. *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy.* Londres: Taylor & Francis; 2008.
 6. Doran PM. *Bioprocess engineering principles.* London: Academic Press; 2013.
 7. Dreher T, Husemann U, Adams T, de Wilde D, Greller G. Design space definition for a stirred single-use bioreactor family from 50 to 2000 L scale. *Eng Life Sci.* 2014;14:304-10. doi: <https://10.1002/elsc.201300067>.
 8. Duarte Castro MC. Incremento de la productividad del proceso de obtención de nimotuzumab utilizando la formulación de medio de cultivo F3. [Tesis de Maestría]. La Habana: Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría"; 2020.
 9. Núñez Ortiz RR. Modelación cinética de la afectación del crecimiento en tres líneas celulares en modo perfusión. [Tesis de Maestría]. La Habana: Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría"; 2022.
 10. Hernández LY, González A, Bouza J, Mayo O, Kulich E, Riera G. Modelación preliminar del cultivo en perfusión de células de mamíferos en tanque agitado con spinfilter como dispositivo de retención. *Biotecnología Aplicada.* 2010;27(1):42-7.
 11. Díaz Muñoz E. Propuesta para el incremento de la productividad volumétrica de la fermentación con células NS0/H7 en el biorreactor industrial de EPOVAC. [Tesis de Maestría]. La Habana: Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría"; 2023.
 12. Boggiano-Ayo T, Palacios-Oliva J, Lozada-Chang S, Relova-Hernández E, Gómez-Perez J, Oliva G, et al. Development of a scalable single process for producing SARS-CoV-2 RBD monomer and dimer vaccine antigens. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;11:1287551. doi: <https://10.3389/fbioe.2023.1287551>.
 13. Raffo-Durán J, Dustet-Mendoza J, Figueredo-Cardero A. Características de la hidrodinámica de un biorreactor industrial tipo tanque agitado. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 2014;13(3):823-39. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62035738015>. (Consultado en línea: 2 mayo 2024).
 14. Nienow AW. The impact of fluid dynamic stress in stirred bioreactors—the scale of the biological entity: a personal view. *Chemie Ingenieur Technik.* 2021;93(1-2):17-30. doi: <https://10.1002/cite.202000176>.
 15. Oliva Artímez G. Estrategia de fermentación para el cultivo de células CHO para la producción de EPO-hr en el biorreactor de 1500 L. [Tesis de Maestría]. La Habana: Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría"; 2018.
 16. Nienow AW. Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology.* 2006;50(1-3):9-33.
 17. Mayrhofer P, Castan A, Kunert R. Shake tube perfusion cell cultures are suitable tools for the prediction of limiting substrate, CSPR, bleeding strategy, growth and productivity behavior. *J Chem Technol Biotechnol.* 2021;96(10):2930-9. doi: <https://10.1002/jctb.6848>.
 18. Pérez-Rodríguez S, Ramírez-Lira MJ, Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA. Nutrient supplementation strategy improves cell concentration and longevity, monoclonal antibody production and lactate metabolism of Chinese hamster ovary cells. *Bioengineered.* 2020;11(1):463-71. doi: <https://10.1080/21655979.2020.1744266>.
 19. Konstantinov K, Goudar C, Ng M, Meneses R, Thrift J, Chuppa S, et al. The “push-to-low” approach for optimization of high-density perfusion cultures of animal cells. En: Hu, WS. (eds). *Cell culture engineering Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* Heidelberg: Springer; 2006. p.75 -98.
 20. Henzler HJ. Verfahrenstechnische auslegungsunterlagen für rührbehälter als fermenter. *Chemie Ingenieur Technik.* 1982;54(5):461-76.
 21. Nienow AW. Gas dispersion performance in fermenter operation. *Chemical engineering progress.* 1990;86(2):61-71.
 22. Zlokarnik M. Rührleistung in begasten Flüssigkeiten. *Chemie Ingenieur Technik.* 1973;45(9-10):689-92.

Establishment of the area of operation for large-scale culture of Chinese hamster ovary cells to obtain a viral vaccine

Abstract

Mammalian cell culture in perfusion is characterized by higher cell densities and higher productivity. At Center of Molecular Immunology, with more than 15 years of experience in the use of this technology at the industrial level, perfusion culture of Chinese hamster ovary cells line to produce the recombinant protein rC21 (a biological raw material used in the formulation of a viral vaccine) was developed in a stirred tank bioreactor of 2,000 L effective volume. The present investigation focused on establishing the operating zone in the large-scale culture based on characterization of the process engineering, as a function of hydrodynamic parameters. A tangential velocity of 1.41 m/s was established, which implied operating a power per unit volume far from 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 according to the Kolmogorov turbulence microscale criteria. The operating zone made it possible to achieve high cell viability and kinetic parameters typical of mammalian cells.

Keywords: perfusion; CHO cells; bioreactors.

Recibido: 24 de junio de 2024

Aceptado: 3 de febrero de 2025