UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CARACTÉRISATION ET MODÉLISATION DE LA PRODUCTION DE VECTEURS ADÉNOVIRAUX DANS UN BIORÉACTEUR OPÉRANT EN MODE PERFUSION

OLIVIER HENRY
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE CHIMIQUE)
AVRIL 2004

© Olivier Henry, 2004.

National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisisitons et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 0-612-92157-3
Our file Notre référence
ISBN: 0-612-92157-3

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou aturement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

CARACTÉRISATION ET MODÉLISATION DE LA PRODUCTION DE VECTEURS ADÉNOVIRAUX DANS UN BIORÉACTEUR OPÉRANT EN MODE PERFUSION

présenté par: Olivier Henry
en vue de l'obtention du diplôme de: Philosophiae Doctor
a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de:

M. KLVANA Danilo, Ph.D., président
M. PERRIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche
M. KAMEN Amine, Ph.D., membre et codirecteur de recherche
M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre
M. FORESTELL SEAN P., Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le professeur Michel Perrier, pour la confiance qu'il m'a témoignée dans le cadre de cette thèse. Je lui suis également reconnaissant de m'avoir délégué des charges de cours qui furent des expériences enrichissantes et que je considère toutes aussi importantes pour ma formation. Je tiens également à remercier vivement mon codirecteur de recherche, Mr. Amine Kamen, d'abord pour m'avoir accueilli au sein du groupe de cultures de cellules animales de l'IRB dans lequel j'ai joui d'un support intellectuel et technique extraordinaire, ensuite parce qu'il m'a beaucoup appris au travers de nos échanges. Je les remercie conjointement pour la latitude dont j'ai bénéficiée tout au long de la réalisation de mes travaux, pour leurs précieux conseils et les nombreuses discussions qui m'ont grandement aidé à faire avancer ma réflexion.

Je tiens également à souligner l'apport de deux étudiantes stagiaires, Nadia Ouellet et Edwige Dormond, avec qui j'ai pu partager les joies et les aléas de la culture cellulaire.

Je suis également très reconnaissant envers plusieurs membres du groupe de cellules animales à l'IRB qui ont collaboré de près ou de loin à ces travaux : Stéphane, qui a été d'un support inestimable pour l'opération des bioréacteurs et qui n'a jamais été à court de ressources quand les équipements flanchaient; PAG, pour avoir donné de son temps

et facilité mon intégration dans le groupe; Louis et Alice qui ont effectué plusieurs des analyses si critiques à ce travail; Danielle et Hélène qui m'ont patiemment formé et aidé dans le labo; Robert et Ricardo pour le soutien technique; Marc qui a gentillement révisé mes articles; Éric etYves, pour avoir partagé quelques bons verres les vendredis. Mes amis Martin, Dave, Jason, ainsi que tous ceux qui prenaient part aux parties de soccer, de hockey et de volleyball dont je garderais un souvenir impérissable. Je remercie également les autres étudiants que j'ai cotoyés dans le bureau au fil des ans et qui sont devenus des amis, notamment Fred, Louise et Lucie.

J'aimerais également remercier le Conseil de Recherche en Science Naturelle et Génie (CRSNG), le Fond pour l'Avancement de la Recherche (FCAR) et le Conseil National de Recherche du Canada (CNRC) pour m'avoir financé tout au long de mes études.

Je dois également beaucoup à mes parents pour leur présence et leur soutien tout au long de cette thèse, particulièrement à ma mère pour les innombrables re-lectures. Ce sont eux les premiers qui m'ont insufflé le goût de la recherche et l'esprit scientifique.

Enfin, je réserve pour la fin la plus belle chose qui me soit arrivée au cours de ce doctorat, Chantale, que je remercie pour sa compréhension, son amour et son support inconditionnel de tous les instants.

RÉSUMÉ

L'objectif principal de ce travail était d'optimiser la production de vecteurs adénoviraux dans des cultures opérées en mode perfusion par le biais d'une estimation en temps réel de l'état physiologique des cellules.

La première partie de ce travail porte sur l'influence de deux paramètres importants lors d'une production en perfusion: la concentration cellulaire au moment de l'infection et le débit d'alimentation. Des expériences ont été effectuées pour en discerner l'effet sur la productivité des cultures. Des résultats, il est ressorti qu'avec une alimentation de 2 volumes/j, il est possible d'infecter une culture jusqu'à une densité de $3x10^6$ cell/mL, tout en maintenant une production spécifique similaire à celle obtenue dans une culture en cuvée avec changement de milieu. La productivité volumétrique s'en trouve dès lors accrue par un facteur de cinq. Diverses méthodes permettant le suivi en ligne du processus d'infection ont également été examinées. Il ressort que l'augmentation de la respiration et du biovolume des cellules infectées constituent des indicateurs fiables du succès de l'infection. De plus, en raison de l'instabilité du virus produit, le signal de fluorescence s'avère un outil

indispensable pour estimer le moment de la récolte qui correspond au maximum de concentration du virus dans le bioréacteur.

Dans le but d'optimiser la production, la seconde partie du travail a porté sur la caractérisation du métabolisme cellulaire en fonction des conditions opératoires testées. Pour ce faire, la technique d'analyse des flux métaboliques a été utilisée à partir d'un modèle biochimique des cellules 293 développé et validé lors de travaux antérieurs. Les résultats ont montré un lien intime entre l'état physiologique des cellules et la productivité des cultures. De façon plus spécifique, il a été établi que des cultures caractérisées par une activité métabolique plus élevée dans le cycle de Krebs conduisent à une plus grande production d'énergie et donnent lieu à une meilleure productivité. En outre, une infection efficace se traduit par un accroissement significatif des principaux flux suivant l'infection. Les résultats ont également montré que des profils de flux similaires peuvent être obtenus à faible comme à haute densité cellulaire en ajustant le taux de perfusion.

La dernière partie de la thèse est consacrée à l'estimation en temps réel des flux métaboliques comme outil de suivi et d'optimisation du procédé. L'approche développée comporte un algorithme de moindres carrés récursifs pour estimer le taux de croissance à partir d'une mesure en ligne de la capacitance de la

culture. En assumant une composition cellulaire pré-determinée, cela permet d'estimer les taux biosynthétiques requis pour le calcul des flux intracellulaires. Les taux de consommation et de production sont quant à eux estimés à partir de mesures quotidiennes de concentration puis corrigés grâce à un filtre de Kalman, ce qui permet d'atténuer l'effet du bruit de fond. Les taux ainsi générés sont testés pour détecter la présence d'erreurs de mesures grossières par le biais de bilans sur les atomes de carbone et d'azote, puis les flux intracellulaires sont ensuite calculés. Cette approche a permis d'établir qu'au cours d'une culture, les flux glycolytiques diminuent à mesure que la concentration cellulaire augmente. Parallèlement, on note une entrée accrue de pyruvate dans le cycle TCA ce qui se traduit par un métabolisme plus efficace. À partir du modèle métabolique, il est possible d'estimer le taux de production d'ATP. Ce dernier s'avère un bon indicateur de l'activité métabolique des cellules et ce taux est corrélé avec la productivité spécifique des cultures. Il est également démontré comment la connaissance des flux intracellulaires peut servir pour l'optimisation en temps réel d'un procédé. En ajustant d'une façon quotidienne le débit d'alimentation, on peut accroître la densité cellulaire tout en maintenant les cellules dans un état physiologique désiré ce qui maximise la production volumétrique. L'approche a ainsi permis d'infecter une culture à une densité de $5x10^6$ cellules/mL.

Les méthodes de contrôle classiques s'évertuent à maintenir des conditions environnementales propices à la croissance des cellules et à la production. En procurant une connaissance en temps réel de la distribution des flux intracellulaires, ces travaux ouvrent la porte à la conception de stratégies d'alimentation qui soient basées non pas sur le contrôle de l'environnement autour des cellules, mais plutôt sur le contrôle de l'état physiologique même des cellules.

ABSTRACT

The main goal of this work was to optimize the production of adenoviral vector in perfusion cultures, based on a real-time estimation of the physiological state of the cells.

In the first part of this work, the influence of two important operating parameters for perfusion cultures is investigated: the cell density at infection and the perfusion rate. Several experiments were conducted to analyze their influence on the productivity of the cells. Compared to a batch with medium exchange, a five-fold increase in virus titers was obtained when feeding the culture at 2 vol/d. Moreover, the specific productivity was maintained for cell densities at infection up to $3x10^6$ cells/mL. Various online tools were also shown to provide critical information during the infection. Increased respiration and biovolume were found to be consistent and reliable indicators to assess the status of an infection. It is also demonstrated that a fluorescence signal can help to determine the appropriate harvest time by predicting the peak in viral vector concentration.

In the second part of this thesis, the cell's metabolism was studied in relation with the prevailing operating conditions. To characterise the physiological response of the cells, metabolic flux analysis was employed based on a previously established and validated biochemical network for the HEK-293 cells.

The results demonstrated an intimate link between the cell physiological state and the productivity of a culture. More specifically, it was established that cultures characterized by an enhanced Krebs cycle activity lead to greater production of energy and higher cell specific productivity. Moreover, a good production is marked by a significant increase in glycolytic and TCA fluxes following cell infection with an adenovirus. Results also showed that similar flux distribution profiles can be obtained in cultures operated at different cell densities by modulating the perfusion rate.

In the last part of this work, an approach is developed to allow real time estimation of metabolic fluxes for process optimization and monitoring. A recursive least-squares method is used to estimate the specific growth rate from an online culture capacitance measurement. This permits an evaluation of the biosynthetic rates, assuming a constant cellular composition. The specific rates of nutrient consumption and metabolite production are estimated using an extended Kalman filter for noise reduction, based on daily offline concentration

measurements. Prior to flux calculation, the generated rates are tested for the presence of gross measurement errors using elemental balances on carbon and nitrogen. During a culture, the glycolytic fluxes were found to decrease with increasing cell concentrations. A concomitant increase in the flux of pyruvate entering the Krebs cycle was observed. The metabolic model allows for the estimation of the specific ATP production rate. The later was found to reflect the overall metabolic activity of the cells and was correlated with the cell specific productivity.

It is also demonstrated how real time estimation of intracellular rates can be used for process optimization. With daily adjustment of the feed rate, the cell density can be increased while maintaining the cells in a desirable physiological state to maximize the productivity. This approach allowed the infection of a culture at a concentration of $5x10^6$ cells/mL.

Traditional control methods have aimed at maintaining constant environmental conditions favouring cell growth and production. With real-time knowledge of the intracellular flux distribution, this work opens up the possibility of designing new strategies to control directly the physiological state of the cells.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS IV

RÉSUMÉ VI

ABSTRACT X

TABLE DES MATIÈRES XIII

LISTE DES TABLEAUX XX

LISTE DES FIGURES XXII

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS XXVII

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE 4

1.1 PRODUCTION DE VECTEURS ADÉNOVIRAUX ET MÉTABOLISME CELLULAIRE 4

1.2 MAXIMISATION DE LA PRODUCTIVITÉ : LIMITATIONS RENCONTRÉES 6

1.3 CULTURE DE CELLULES ANIMALES : CONSIDÉRATIONS DE BASE 8

1.4 MÉTABOLISME CELLULAIRE DURANT L'INFECTION 10

1.5 STRATÉGIES POUR MAXIMISER LA PRODUCTIVITÉ 11

1.5.1 Cuvée avec changement de milieu au moment de l'infection 12

1.5.2 Cuvée alimentée (Fed-batch) 13

1.5.3 Culture en perfusion 15

1.6 SUIVI DES CULTURES DE CELLULES ANIMALES 17

1.6.1 Suivi des cultures infectées 20

1.6.2 État physiologique des cultures 23

1.7 ANALYSE DES FLUX MÉTABOLIQUES 24

1.7.1 Analyse des flux intracellulaires pour des cultures infectées 31

1.7.2 Analyse des flux métaboliques comme outil d'optimisation 32

1.8 ESTIMATION DES TAUX CINÉTIQUES 33

1.9 MODÉLISATION DES TAUX SPÉCIFIQUES DE CONSOMMATION ET DE PRODUCTION 37

CHAPITRE 2: PRÉSENTATION DES ÉTAPES DE TRAVAIL 39

CHAPITRE 3: MÉTHODOLOGIE 42

3.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES 42

3.1.1 Cellules, milieu de culture et vecteur viral 42

3.1.2 Bioréacteur 43

3.1.3 Méthodes analytiques 45

3.2 CALCUL DES TAUX SPÉCIFIQUES DE CONSOMMATION DES NUTRIMENTS ET DE PRODUCTION DES MÉTABOLITES 46

3.3 CALCUL DES TAUX BIOSYNTHÉTIQUES 48

3.4 CALCUL DU TAUX DE CONSOMMATION D'OXYGÈNE 49

3.5 CALCUL DU TAUX DE PRODUCTION DE CO_2 50

CHAPITRE 4: PRODUCTION DE VECTEURS ADÉNOVIRAUX EN MODE PERFUSION 53

4.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 53

4.2 INSIGHTS INTO ADENOVIRAL VECTOR PRODUCTION KINETICS IN ACOUSTIC FILTER-BASED PERFUSION CULTURES 55

4.2.1 Abstract 55

4.2.2 Introduction 57

4.2.3 Material and Methods 62

Cell Line and Medium 62

Recombinant Viral Vector 62

Culture Conditions 63

Analytical Methods 64

Specific Consumption and Production Rates 65

4.2.4 Results and Discussion 67

Improvement Over Batch Production 69

Detrimental Effect of Low Cell Viability on Production 71

Effects of the Cell Density at Infection 73

Influence of the Perfusion Rate 74

On-line Process Supervision of Infection 76

Cell Metabolism during Growth and Infection of Perfusion Cultures 84

4.2.5 Conclusions 88

Acknowledgements 89

4.2.6 References 89

4.3 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES 95

4.3.1 Cultures effectuées sous d'autres conditions opératoires 95

4.3.2 Infectivité du virus produit 98

CHAPITRE 5: CARACTÉRISATION DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES 101

5.1 MODÈLE MÉTABOLIQUE 102

5.2 CALCUL DES FLUX INTRACELLULAIRES 104

5.3 PONDÉRATION DES MESURES 106

5.4 ERREURS ASSOCIÉES AU CALCUL DES FLUX 108

5.5 DIRECTIONNALITÉ DES FLUX 110

5.6 DÉTECTION D'ERREURS DE MESURE GROSSIÈRES 110

CHAPITRE 6: L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES HEK-293 EN TANT QUE FACTEUR DÉTERMINANT POUR LA PRODUCTIVITÉ DE CULTURES INFECTÉES AVEC UN ADÉNOVIRUS 113

6.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 113

6.2 HEK-293 CELLS PHYSIOLOGICAL STATE AS A DETERMINANT OF ADENOVIRAL VECTOR PRODUCTIVITY IN PERFUSION CULTURES 115

6.2.1 Abstract 115

6.2.2 Introduction 117

6.2.3 Material and Methods 122

Cell Line and Recombinant Viral Vector 122

Bioreactor Cultures 122

Analytical methods 124

Specific Consumption and production rates 125

Metabolic Flux Calculation 127

Data consistency 131

6.2.4 Results and Discussion 132

Culture Productivity 132

Specific Uptake/Production Rates 133

Data consistency 139

Metabolic flux analysis 140

Glycolysis 140
Glutaminolysis and amino acids utilisation 144
TCA activity 147
ATP production rate estimation 148
Metabolic fluxes analysis post-infection 151
6.2.5 Conclusion 159
Acknowledgements 160
6.2.6 References 160
6.3 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES 166
CHAPITRE 7: ESTIMATION DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES EN TEMPS RÉEL 172
7.1 ESTIMATION EN-LIGNE DES FLUX MÉTABOLIQUES 172
7.2 ESTIMATION DES TAUX SPÉCIFIQUES DE CONSOMMATION ET DE PRODUCTION 175
7.2.1 Estimateur-observateur 176
7.2.2 Estimation par un algorithme de moindres carrés récursifs 179
7.2.3 Filtre étendu de Kalman 180
7.3 SIMULATIONS DES ALGORITHMES 183
7.3.1 Génération de données 183
7.3.2 Réglage des algorithmes d'estimation 188
7.3.2.1 Observateur-estimateur 188
7.3.2.2 Estimateur RLS 188
7.3.2.3 Filtre de Kalman étendu 189
7.3.3 Comparaison des méthodes d'estimation 190
7.4 PERFORMANCES DE L'ESTIMATION DES TAUX À PARTIR DE DONNÉES EXPÉRIMENTALES 200
7.5 ESTIMATION EN LIGNE DU TAUX DE CROISSANCE 204

7.5.1 Algorithme d'estimation 204

7.5.2 Réglage et performance de l'estimateur 205

CHAPITRE 8: SUIVI DE CULTURES PAR L'ESTIMATION EN TEMPS RÉEL DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES 211

8.1 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 211

8.2 PHYSIOLOGICAL STATE MONITORING BY REAL-TIME ESTIMATION OF METABOLIC FLUX IN PERFUSION CULTURES 213

8.2.1 Abstract 213

8.2.2 Introduction 215

8.2.3 Material and Methods 219

Cell line, medium and viral vector 219

Bioreactor 220

Analytical methods 221

8.2.4 Real-Time metabolic flux estimation 221

Growth rate estimation 225

Nutrient uptake/Metabolite production rate estimation 227

Data consistency check 229

Metabolic flux calculation 231

8.2.5 RESULTS AND DISCUSSION 233

Growth rate estimation 233

Specific uptake/production rate estimation 236

Data consistency 239

Real-Time estimation of intracellular fluxes 241

Real-Time flux estimation as an optimization tool 246

Physiological state control 249

8.2.6 Conclusions 252

8.2.7 References 253

CHAPITRE 9: DISCUSSION GÉNÉRALE 261

CONCLUSION 264

CONTRIBUTION A L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES 265

PERSPECTIVES, CONTRAINTES ET NOUVELLES VOIES DE RECHERCHE 270

RÉFÉRENCES 273

LISTE DES TABLEAUX

Table 4-1 Summary of the results. 68

Table 4-2 Specific consumption and production rates in perfusion cultures prior and post-infection..... 86

Tableau 4-3 Résultats des expériences supplémentaires 97

Tableau 5-1 Liste des réactions biochimiques du réseau métabolique..... 103

Table 6-1 Listing of biochemical reactions included in the metabolic network.. 130

Table 6-2 Average measured production/uptake rates prior to infection for different operating conditions (values in mmol/10^{10} cells. h, negative rates signify consumption) 137

Table 6-3 Average measured production/uptake rates post-infection for different operating conditions (values in mmol/10^{10} cells. h, negative rates signify consumption) 138

Table 6-4 Calculated consistency index values. Values lower than the χ^2 distribution value (90 % confidence interval, 2 degrees of freedom) indicate that the data set was consistent..... 140

Table 6-5 Calculated intracellular fluxes prior to infection (mmol/10^{10} cells.h). 142

Table 6-6 Calculated intracellular fluxes post-infection (mmol/10^{10} cells.h)..... 154

Tableau 6-7 Expériences supplémentaires..... 167

Tableau 7-1 Valeur des paramètres utilisés pour les simulations 183

Tableau 7-2 Comparaison des méthodes pour l'estimation d'un taux constant. 193

Tableau 7-3 Comparaison des méthodes pour l'estimation d'un taux variable . 199

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Cycle lytique 5

Figure 1.2 Production de virus en mode batch 6

Figure 1.3 Métabolisme de base des cellules animales. 8

Figure 3.1 Bilan sur le CO_2 au cours d'une culture de cellules animales 51

Figure 4.1 Schematic of the perfusion system using an acoustic filter. 65

Figure 4.2 Comparison of adenovirus production in perfusion and batch cultures. 70

Figure 4.3 Viability profiles post-infection for the batch production and the perfusion cultures (see operating conditions in Table 4-1). 72

Figure 4.4 Cell density effect. The cell specific productivity decreases as the cell density at infections is increased for a set perfusion rate of 2 vol/d. 74

Figure 4.5 Influence of the perfusion rate. 77

Figure 4.6 Monitoring cell growth during a perfusion culture (experiment #1).. 78

Figure 4.7 Monitoring infection during a perfusion culture (experiment #1). 80

Figure 4.8 Harvest Time determination. 83

Figure 4.9 Profil des particules virales totales et infectieuses durant une production 100

Figure 6.1 Adenovirus production in perfusion cultures 134

Figure 6.2 Glycolytic fluxes..... 144

Figure 6.3 Glutaminolytic fluxes..... 147

Figure 6.4. Krebs cycle fluxes. 148

Figure 6.5 Estimated ATP production rate..... 149

Figure 6.6 Glycolytic fluxes post-infection and their percentage of variation compared with the values obtained prior to infection. 153

Figure 6.7 Glutaminolytic and amino acids fluxes post-infection 155

Figure 6.8 Krebs cycle fluxes post-infection and their percentage of variation compared with the values obtained prior to infection. 157

Figure 6.9 Predicted ATP flux during infection and percentage of variation compared to the values estimated prior to infection. 158

Figure 6.10 Flux Glycolytiques durant la croissance 169

Figure 6.11 Flux d'ATP durant la croissance 169

Figure 6.12 Pourcentage d'augmentation des flux glycolytiques durant l'infection 170

Figure 6.13 Pourcentage d'augmentation des flux dans le cycle de Krebs durant l'infection 170

Figure 6.14 Pourcentage d'augmentation du flux d'ATP durant l'infection..... 171

Figure 7.1 Approche pour l'estimation en ligne des flux métaboliques 174

Figure 7.2 Profils simulés de la croissance cellulaire et de la concentration de substrat pour un taux de consommation constant. 186

Figure 7.3 Profils simulés de la croissance cellulaire et de la concentration de substrat pour un taux de consommation variable..... 187

Figure 7.4 Estimation d'un taux de consommation constant avec une erreur relative de 10 % sur la concentration cellulaire et de 3 % sur la concentration de substrat..... 195

Figure 7.5 Estimation d'un taux de consommation constant avec une erreur relative de 20 % sur la concentration cellulaire et de 10 % sur la concentration de substrat..... 196

Figure 7.6 Estimation d'un taux de consommation variable avec une erreur relative de 10 % sur la concentration cellulaire et de 3 % sur la concentration de substrat..... 197

Figure 7.7 Estimation d'un taux de consommation variable avec une erreur relative de 20 % sur la concentration cellulaire et de 10 % sur la concentration de substrat..... 198

Figure 7.8 Comparaison entre les taux de consommation estimés par un filtre de Kalman et par calcul direct pour des données expérimentales..... 202

Figure 7.9 Comparaison entre les concentrations prédites par le filtre de Kalman et les mesures expérimentales..... 203

Figure 7.10 Signal brut de capacitance au cours de la phase de croissance d'une culture opérant en mode perfusion..... 207

Figure 7.11 Influence du facteur d'oubli sur l'estimation en ligne du taux de croissance. Dans la figure de gauche, $\lambda_f = 0.99$ et dans celle de droite, $\lambda_f = 0.9$... 207

Figure 7.12 Influence de la covariance initiale sur l'estimation en ligne du taux spécifique de croissance. 208

Figure 7.13 Prédiction de la concentration de cellules à partir de l'estimé en ligne du taux de croissance et comptes cellulaires effectués hors-ligne au microscope (cercle). 209

Figure 7.14 Estimation du taux de croissance et prédiction de la densité cellulaire après pré-filtrage du signal de capacitance. 210

Figure 8.1 Scheme for real-time estimation of intracellular fluxes 224

Figure 8.2 Real-time estimation of the specific growth rate (E & F) from on-line capacitance (A & B) and off-line cell count measurements (C & D). 235

Figure 8.3 Specific glucose uptake and lactate production rates estimation using an extended Kalman filter for two perfusion cultures. 238

Figure 8.4 Time evolution of the consistency index, *h*, during two perfusion cultures. 240

Figure 8.5 Estimated intracellular fluxes for two perfusion operated at 2 vol/d, but infected at low (2.4×10^6 cells/mL) and high cell density (6×10^6 cells/mL), respectively. 244

Figure 8.6 Estimated intracellular fluxes for two perfusions operated at 0.5 and 1 vol/d and infected at 2.1×10^6 and 4×10^6 cells/mL respectively. 245

Figure 8.7 On-line optimization based on evaluation of the estimated ATP flux.248

Figure 8.8 Physiological state control..... 251

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A_{NC}	matrice de la composition élémentaire de chacun des composants du modèle
Ac-Coa	Acétyl-Coa
Ac OLE	Acide oléique
ALA	Alanine
ATP	Adénosine triphosphate
Ala	Alanine
Arg	Arginine
Asg	Asparagine
Asp	Aspartate
C	Carbone
C_{in}	Concentration dans le débit d'alimentation
C_L	Concentration dans le liquide
C*	Concentration d'équilibre
Ca_L	Concentration de carbonate total dans le liquide
cell.	Cellules
CER	Taux de production de CO_2 (Carbon Evolution Rate)
Cit	Citrate
Cte	Cystéine
Cys	Cystine
D	Taux de dilution
DO	Oxygène dissous
e_M	Bruit de mesure

F	Matrice des flux intracellulaires
FADH	Flavine adénine dinucléotide
Fg	débit volumique de gas
FRUC6P	Fructose-6-Phosphate
FUM	Fumarate
G	*glutaminase*
GAP	Glycéraldéhydephosphate
GD	*glutamine déshydrogénase*
Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
Glc	Glucose
Gly	Glycine
His	Histidine
H	Constante de Henry
h	heures
h	Fonction de consistence des données
hpi	Heures post-infection
His	Histidine
Ile	Isoleucine
Kéto	α-cétoglutarate
K	Matrice des coefficients stoechimétriques
K	Gain du filtre de Kalman
K_A	Constant d'équilibre
k_La	Résistance au transfert d'oxygène à l'interface gaz-liquide [h^{-1}]
Lac	Lactate
Leu	Leucine
Lys	Lysine

MAb	Anticorps monoclonaux
Mal	Malate
Met	Méthionine
mM	Millimolaire
M.O.I	Multiplicity of infection (nombre de particules virales par cellule)
N	Azote
n	nombre de métabolites impliqués
NADH	Nicotinamide adénine nucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine nucléotide phosphate
OUR	Taux de consommation d'oxygène (Oxygen uptake rate) [mM/h]
Oxa	Oxaloacétate
P	Pression [kPa]
P	taux de production des métabolites
PBS	Phosphate buffer saline (solution tampon phosphate)
P_{tot}	Pression dans la tête du bioréacteur
P_i	Pression partielle
PFU	Plaque forming units (nombre de particules virales infectieuses)
Phe	Phénylalanine
Pro	Proline
Pyr	Pyruvate
Q-P	Matrice des taux de consommation et de production
P	Matrice de covariance de l'erreur d 'estimation
Q	Matrice de covariance du bruit du système
q_i	Taux spécifique de consommation ou de production [mmole/10^6 cell. viv./h]
$\hat{q}$	Taux spécifique estimé
RIB-5-P	Ribose-5-Phosphate

R	Matrice de covariance du bruit de mesure
R.L.S	Moindres carrés récursifs (recursive least-squares)
R_X	Taux biosynthétique
S	Matrice de la concentration des métabolites intracellulaires
S_M	Concentration mesurée
$\hat{S}$	Concentration estimée
ser	Sérine
SUCCoA	Succinyl-CoA
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
Vg	Volume de gaz
VP	Particules virales
V_L	Volume de liquide
X	Concentration de cellules viables
X_H	Concentration de cellules dans la récolte
X_i	Fraction molaire d'un constituant de la biomasse
Xu5P	Xylulose-5-Phosphate
y_i	Fraction molaire
$Y_{i/j}$	Rendement molaire
α-KETO	α-cétoglutarate
δ	Erreur
ε	Résidu
ϖ	Paramètre de réglage de l'observateur-estimateur
λ	Valeur propre
λ_F	Facteur d'oubli
ϕ	Covariance de l'estimation
φ	Matrice de variance-covariance des résidus

ψ	Matrice de la variance-covariance des mesures
μ	Taux de croissance cellulaire [heures^{-1}]

INTRODUCTION

Actuellement, les vecteurs adénoviraux sont des outils thérapeutiques importants puisqu'ils sont impliqués dans environ 30 % des protocoles de thérapie génique pour le traitement de diverses maladies, notamment le cancer et la fibrose kystique. En décembre 2003, un traitement pour le cancer basé sur la thérapie génique et employant un vecteur adénovirus a obtenu le feu vert des autorités chinoises, suite aux résultats encourageants obtenus à l'étape préclinique. Dans le rôle de vaccin, les adénovirus sont également appelés à connaître un essor important au cours des années à venir puisqu'ils sont au cœur de plusieurs programmes de développement de vaccins pour lutter contre le SIDA. Leur attrait comme vecteur pour le transfert de gènes tient au fait qu'ils peuvent transférer de très grandes portions d'ADN et qu'ils sont capables d'infecter un nombre élevé de types cellulaires avec une efficacité proche de 100%. Autre atout important, ils peuvent également infecter des cellules qui ne se divisent pas contrairement à la majeure partie des rétrovirus. Les adénovirus, dans leur forme naturelle, ne sont pas très nocifs, ne provoquant généralement rien de plus qu'un rhume chez les personnes en bonne santé. Leur utilisation en tant que vecteur est donc relativement sûre. Le seul inconvénient majeur lié à

leur utilisation est de provoquer de fortes réactions inflammatoires et immunitaires.

Si l'utilisation des vecteurs adénoviraux est largement documentée, il en va autrement pour ce qui touche à leurs modes de production. Les vecteurs sont généralement produits en bioréacteurs en utilisant des lignées cellulaires qui permettent la réplication de l'adénovirus. La multiplication des essais précliniques et cliniques, requérant d'importantes quantités de virus, laisse anticiper une demande sans cesse croissante de vecteurs viraux, d'où la nécessité de développer et d'optimiser des procédés de production qui soient fiables, reproductibles et pour lesquels la mise à l'échelle est possible.

Cependant, les méthodes classiques de production présentent généralement des rendements modestes, puisqu'elles sont confinées à opérer à des concentrations cellulaires relativement faibles. En effet, au-delà d'un certain seuil de concentration en cellules, on observe une diminution drastique de la productivité spécifique (par cellule) ce qui se traduit par des concentrations finales en produit très faibles. Pour surmonter ces limites et concevoir des procédés plus performants, il est impératif de mieux comprendre le métabolisme cellulaire qui sous-tend le processus d'infection. En outre, l'optimisation de ces modes de production nécessite parallèlement le

développement d'outils permettant d'identifier et de contrôler les paramètres clefs du procédé.

L'objectif principal de ce travail est donc d'optimiser la production de vecteurs viraux. Afin de lever les limitations des méthodes de production traditionnelles, les cultures ont été opérées en mode perfusion utilisant un filtre acoustique pour retenir les cellules dans le bioréacteur. Pour les fins de suivi et d'optimisation, une approche permettant l'estimation en temps réel des flux intracellulaires a été conçue à partir d'un modèle métabolique développé lors de travaux antérieurs sur le métabolisme des cellules humaines HEK-293.

CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Production de vecteurs adénoviraux et métabolisme cellulaire

La production de vecteurs adénoviraux s'effectue principalement à l'aide de cellules 293 HEK (Human Embryo Kidney). Il s'agit de faire croître les cellules dans un bioréacteur jusqu'à l'obtention d'une concentration cellulaire donnée, puis d'infecter la culture, c'est à dire lui ajouter une certaine quantité de particules virales. Les principales étapes du processus d'infection sont illustrées dans la Figure 1.1. Lorsqu'un adénovirus entre en contact avec une cellule, son ADN traverse la membrane plasmique et se rend jusqu'au noyau, puis réplique, transcrit et traduit son matériel génétique en détournant les mécanismes de réplication de la cellule (la croissance cellulaire est alors stoppée). L'assemblage des constituants du virus est effectué et, finalement, par un mécanisme de lyse (désintégration de la membrane), les nouvelles particules virales sont excrétées et peuvent alors infecter à leur tour d'autres cellules. Le cycle cesse une fois toutes les cellules infectées, le processus entraînant inévitablement la mort de ces dernières.

Du fait de sa simplicité d'opération, le mode cuvée constitue l'approche traditionnelle pour produire des vecteurs viraux. La Figure 1.2 présente des profils typiques de concentrations cellulaire et de virus observés au cours d'une production en cuvée. Au moment de l'infection, le virus est ajouté dans un rapport de 10 à 100 pour 1 cellule (on appelle ce rapport la « M.O.I. », la multiplicité d'infection). Au terme de la production, soit environ 48 heures après l'infection, la quantité de virus aura été amplifiée d'un facteur pouvant aller de 1000 à 10 000 .

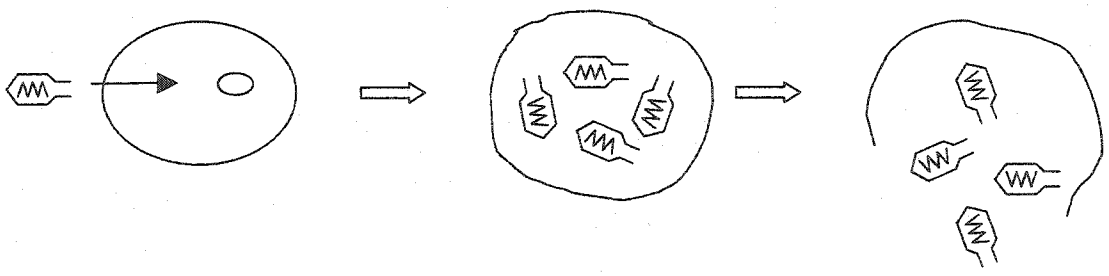


Figure 1.1 Cycle lytique

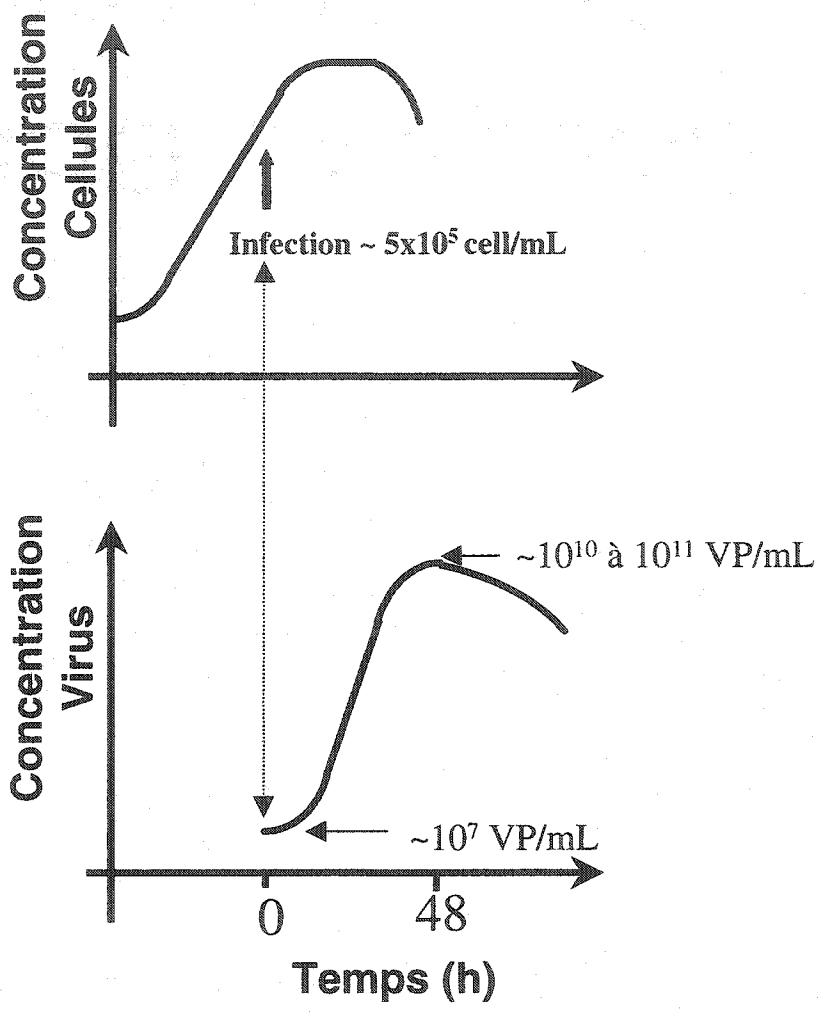


Figure 1.2 Production de virus en mode batch

1.2 Maximisation de la productivité : limitations rencontrées

Dans le cas de la production d'une protéine recombinante en bioréacteur, il existe essentiellement deux approches séquentielles pour augmenter le

rendement: 1) maximiser la production spécifique (par cellule) et 2) maximiser la concentration de cellules. Tout en maintenant la production spécifique optimale. Pour la production de vecteurs viraux, la difficulté réside dans le fait que maximiser la concentration de cellules se fait souvent au détriment de la production spécifique. En effet, au-delà d'un certain seuil (généralement compris entre 0.5 et $1x10^6$ cellules/mL), la production spécifique de virus va décroître dramatiquement et en bout de ligne, les concentrations obtenues seront plus faibles en dépit de concentrations cellulaires plus élevées (Nadeau et Kamen 2003). Ce seuil est très bas par comparaison avec les densités cellulaires qu'on peut atteindre en culture batch avec des cellules non-infectées et pour un même milieu (souvent $3x10^6$ cellules/mL et plus). Le ou les facteurs qui limitent la production à haute densité demeurent inconnus, mais il est vraisemblable que cela soit le résultat de l'épuisement d'un nutriment clef ou d'un phénomène d'inhibition causée par l'accumulation d'un métabolite dans le milieu de culture.

Les méthodes classiques de production ont donc des rendements modestes puisqu'elles sont condamnées à opérer à des concentrations cellulaires relativement faibles. En conséquence, pour générer de grandes quantités de vecteurs viraux, cela nécessite l'emploi de bioréacteurs de très grands volumes.

Comme on est à même de le constater, la production de virus est intiment liée au métabolisme cellulaire. Avant d'aller plus avant et pour mieux comprendre ce lien, il importe de rappeler quelques notions de bases relatives à la culture de cellules.

1.3 Culture de cellules animales : considérations de base

La physiologie des cellules mammifères est très complexe; la Figure 1.3 présente un schéma très simplifié de leur métabolisme. Le glucose et la glutamine constituent les principaux nutriments avec l'oxygène. Pour croître, les cellules requièrent également un milieu de culture contenant des acides aminés, des sels minéraux, des facteurs de croissance, des hormones, des lipides et des vitamines. Les produits principaux sont le CO_2, le lactate et l'ammoniac.

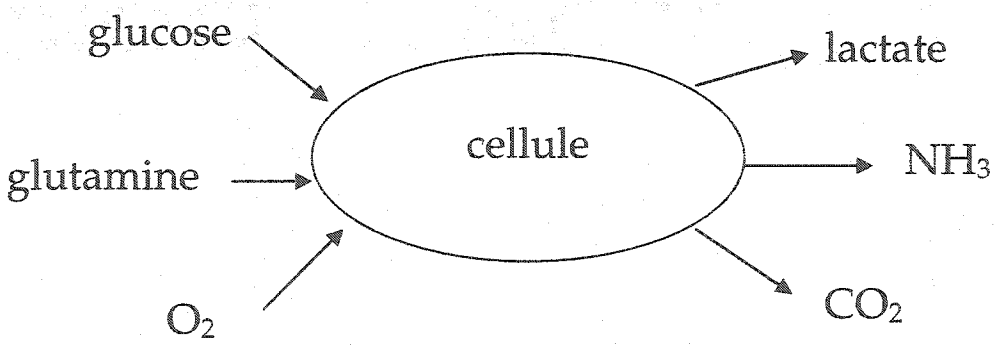


Figure 1.3 Métabolisme de base des cellules animales.

Le glucose est l'une des principales sources de carbone et d'énergie pour une cellule et peut suivre quatre voies métaboliques. La voie oxydative est celle où il est dégradé en CO_2 et H_2O de façon aérobique par le cycle de Krebs. Dans la glycolyse, le glucose est catabolisé de façon anaérobique pour produire du lactate. La troisième voie est celle du cycle du pentose phosphate qui sert à la synthèse des acides nucléiques. Finalement, le glucose peut également être emmagasiné sous forme de glycogène comme réservoir d'énergie. La glutamine, quant à elle, intervient à la fois comme source énergétique et dans la synthèse protéique.

Le lactate et l'ammoniac sont donc les deux principaux déchets issus du métabolisme cellulaire. De nombreuses études ont documenté leurs effets inhibiteurs respectifs sur la croissance et la productivité des cellules. Même si les valeurs varient selon le type de cellules, les effets néfastes du lactate se manifestent généralement à des concentrations de l'ordre de 30 à 40 mM ou plus (Ozturk et al. 1992). Dans le cas de l'ammoniac, les concentrations inhibitrices rapportées se situent plutôt entre 5 et 10 mM (Ozturk et al. 1992).

1.4 Métabolisme cellulaire durant l'infection

Pour comprendre les facteurs limitant la productivité, plusieurs études ont cherché à caractériser le métabolisme des cellules 293 durant l'infection, en relation avec différents facteurs environnementaux et physiologiques.

Plusieurs paramètres ont fait l'objet d'études pour en déterminer l'influence sur le processus d'infection. Parmi les principaux pouvant jouer un rôle déterminant sur la productivité, on note les effets de la température (Jardon et Garnier 2003), du sérum (Cote et al. 1998; Frazzati-Gallina et al. 2001; Merten et al. 1999; Schoofs et al. 1998) du pCO_2 (Jardon et Garnier 2003), du pH (Jardon et Garnier 2003; Xie et al. 2002b), de la multiplicité d'infection (Schoofs et al. 1998) et de l'osmolarité (Nadeau et al. 1996).

En outre, plusieurs groupes se sont penchés sur la consommation de nutriments comme l'oxygène, le glucose et les acides aminés, de même que la production de métabolites tels le lactate et l'ammoniac. Ainsi, une augmentation significative de la consommation de glucose et de glutamine ainsi qu'une production de lactate et d'ammoniac accrue durant l'infection ont été

rapportées (Garnier et al. 1994; Iyer et al. 1999; Xie et al. 2002b). Pour les cellules 293, on a constaté des effets nocifs sur la viabilité cellulaire à des concentrations en lactate de l'ordre de 20 mM (Nadeau et al. 1996). Dans le cas de l'ammoniac, une inhibition de la croissance a été observée pour des concentrations de l'ordre de 1 à 2.5 mM. Tout comme celle du glucose, la consommation spécifique d'oxygène augmente elle aussi après l'infection (Garnier et al. 1994; Kussow et al. 1995). Cela peut s'expliquer en partie par l'augmentation du diamètre et de la masse des cellules post-infection. La consommation des acides aminés serait essentiellement similaire à celle observée lors de la période de croissance pré-infection (Nadeau et Kamen 2003).

1.5 Stratégies pour maximiser la productivité

Dans le but d'améliorer la production d'adénovirus, plusieurs études ont cherché à trouver des moyens pour infecter les cellules à plus haute densité tout en conservant une productivité spécifique au moins comparable à celle obtenue à faibles concentrations (0.5×10^6 cellules/mL). Différentes stratégies d'alimentation et différents modes d'opérations ont été proposés pour tenter de

contrer les limitations nutritionnelles ou l'accumulation de métabolites toxiques. Les principales sont décrites dans les paragraphes suivants.

1.5.1 Cuvée avec changement de milieu au moment de l'infection

Ce mode d'opération consiste à centrifuger les cellules et à les remettre en suspension dans un milieu de culture frais avant de procéder à l'infection. Garnier *et al.* (1994) ont démontré qu'un tel changement de milieu s'avère nécessaire dès que la concentration cellulaire est de $1x10^6$ cellules/mL ou plus, sans quoi les concentrations finales de virus obtenues sont faibles. Une infection à $2x10^6$ cellules/mL nécessite quant à elle un deuxième changement de milieu 24 heures après l'infection. Bien que souvent utilisé (Frazzati-Gallina et al. 2001; Iyer et al. 1999; Merten et al. 1999), ce type d'opération requiert une étape de centrifugation des cellules qui, en plus de perturber la culture, soulève certaines contraintes pour la mise à l'échelle. En outre, infecter à des densités plus élevées nécessiterait des changements encore plus fréquents, rendant le procédé coûteux et peu flexible.

1.5.2 Cuvée alimentée (Fed-batch)

La cuvée « alimentée » est employée pour pallier les limitations nutritionnelles du mode cuvée et consiste à ajouter continuellement des nutriments à la culture. Du fait de sa simplicité d'opération, le mode fed-batch est généralement la voie privilégiée pour augmenter les rendements. La difficulté réside dans la détermination de la nature et de la concentration de la solution d'ajout. En culture de cellules animales, la plupart des stratégies d'alimentation sont conçues de façon à minimiser l'accumulation des principaux métabolites toxiques que sont le lactate et l'ammoniac.

Garnier *et al.* (1994) ont montré qu'une addition de glucose 24 heures post-infection jointe à un ajustement du pH était une alternative équivalente au changement de milieu. Dans une autre étude, l'addition de glucose a permis de maintenir des concentrations résiduelles autour de 5 mM ce qui s'est traduit par une réduction significative à la fois de l'accumulation de lactate et de l'osmolarité (Nadeau et al. 1996). Si la stratégie a permis une infection à une densité cellulaire élevée ($3x10^6$ cellules/mL), la production spécifique était cependant, quant à elle, beaucoup plus faible qu'à basse densité.

Des cultures en mode fed-batch pour réduire la production d'ammoniac en maintenant des niveaux très bas de glutamine ont également été effectuées en milieu sans sérum (Lee et al. 2003). Dans cette étude, une stratégie de contrôle en ligne a permis de maintenir la glutamine à des concentrations de l'ordre de 0.1 mM. Par rapport à des cultures en batch, des densités cellulaires deux fois plus élevées furent atteintes et le temps de culture s'en est trouvé prolongé. Les cultures ont également été infectées à haute densité ($3x10^6$ cellules/mL) et la productivité obtenue était 10 fois supérieure à celle atteinte en batch. Si la production spécifique d'ammoniac était réduite, dans cette étude, le rapport ammoniac/glutamine demeurait quant à lui inchangé. Le rapport lactate/glucose était par contre réduit de façon significative et les auteurs avancent que c'est probablement la réduction de la production de lactate qui explique les différences observées. Il est à noter que les taux spécifiques de consommation pour la plupart des autres acides aminés sont demeurés relativement similaires.

Les travaux de Nadeau *et al.* (2000b) ont également mené à des concentrations cellulaires plus élevées par l'addition de glutamine durant la phase de croissance. En outre, une culture avec ajout d'acides aminés a conduit à des

concentrations cellulaires encore plus élevées, jumelées à une réduction significative de l'accumulation d'ammoniac.

Des cultures avec ajout d'acides aminés, de glucose et de glutamine ont été comparées pour deux densités d'infection (1 et $2x10^6$ cellules/mL) (Nadeau et al. 2000b). Pour une densité plus élevée à l'infection, une baisse de production spécifique dramatique a été observée. Ce résultat suggère qu'un ou plusieurs autres nutriments sont en cause ou alors que l'accumulation d'un métabolite toxique ne peut être entièrement évitée par le simple ajout de glucose, de glutamine ou d'acides aminés.

La mise au point d'un procédé fed-batch plus efficace passe donc par l'identification des facteurs limitant les cultures.

1.5.3 Culture en perfusion

Une culture en perfusion fonctionne comme un réacteur opérant en continu, mais à la différence que les cellules sont maintenues dans le bioréacteur au

moyen d'un dispositif particulier. Ce mode présente deux avantages : l'alimentation en continu permet de résoudre les problèmes de limitations nutritionnelles et la dilution continuelle prévient également l'accumulation de produits toxiques. Pour la production d'anticorps, cela s'est traduit par une augmentation de la productivité par un facteur de 10 (Bibila et Robinson 1995). Cela s'explique par le fait qu'en atteignant des densités cellulaires beaucoup plus élevées, la production volumétrique s'en trouve, elle aussi, accrue. Différents dispositifs existent pour retenir les cellules dans le réacteur. Parmi les principaux employés couramment, on peut citer les filtres rotatifs, les membranes d'ultrafiltration ainsi que les chambres de sédimentation. La rétention des cellules peut également s'effectuer par l'emploi d'un filtre acoustique, ce qui permet de minimiser le stress imposé aux cellules. Dans un contexte de production de vecteur viraux, cela constitue un avantage indéniable en raison de la fragilité accrue des cellules durant la période d'infection (Cote et al. 1998). Des études récentes démontrent en outre que la mise à l'échelle de la filtration acoustique est possible (Gorenflo et al. 2002), contrairement à certaines autres méthodes citées plus haut.

Les avantages du mode perfusion pour une culture infectée ont été démontrés pour la production de baculovirus avec des cellules d'insecte. Si ce système est

différent de l'adénovirus, l'effet de densité cellulaire est également observé pour ce genre de culture. Ainsi, alors que le mode batch permettait des infections à des concentrations de l'ordre de 0.5 à $1x10^6$ cellules/mL, en mode perfusion on a pu accroître cet intervalle de 2 à $3x10^6$ cellules/mL (Chico et Jager 2000).

Toutefois, il est important de souligner que cela se fait au prix d'une consommation accrue en milieu de culture et d'un gain en complexité au niveau de l'opération du bioréacteur. Entre autres, les défis résident dans le choix et le bon fonctionnement du système de rétention, ainsi que dans la sélection du profil alimentation.

1.6 Suivi des cultures de cellules animales

Quelquesoit le mode de culture, il est primordial de pouvoir maintenir les conditions opératoires assurant une bonne croissance et une productivité maximale.

L'application des techniques classiques de contrôle est relativement limitée dans les bioprocédés de part leur nature complexe et l'absence de modèle à la fois

complet et fiable (Tziampazis et Sambanis 1994). Ceci est en grande partie dû au fait que les réponses d'un système biologique à des conditions changeantes ne sont pas aussi reproductibles que les réponses observées dans les procédés chimiques traditionnels. En outre, les senseurs pour mesurer en ligne les variables d'intérêt ne sont pas souvent disponibles. De plus, les mesures hors-ligne sont généralement peu fréquentes (surtout en raison des risques de contamination au moment de l'échantillonnage) et les résultats, souvent obtenus après un certain délai. Principalement pour ces raisons, l'utilisation des modèles en bioprocédés se limite très souvent à un rôle de supervision plutôt que de contrôle.

Le suivi est essentiel pour opérer efficacement un bioprocédé. Il peut également en accélérer le développement et l'optimisation en indiquant rapidement l'influence de certaines variables et en guidant le choix des conditions opératoires appropriées, par exemple le débit d'alimentation.

Pour la culture de cellules animales, les paramètres de base qui font typiquement l'objet d'un suivi et pouvant être perçus comme un pré-requis minimun sont : la température, le pH, la vitesse d'agitation, la concentration d'oxygène dissous et les débits d'alimentation en gaz. Ces mesures permettent

de contrôler l'environnement mais sont toutefois largement insuffisantes pour donner une indication de l'état d'une culture.

Traditionnellement, la supervision des cultures se fait en suivant l'évolution d'au moins un paramètre sensé refléter l'activité métabolique des cellules. Cela peut être par exemple la concentration d'un substrat ou celle d'un métabolite permettant d'évaluer un taux de consommation ou de production. Les mesures sont généralement effectuées hors-ligne (Fike et al. 1993; Ljunggren et Haggstrom 1994; Omasa et al. 1992; Pelletier et al. 1994), mais des techniques d'analyse par injection directe (ou FIA, Flow Injection Analysis) permettent le prélèvement et l'analyse automatiques des échantillons d'un bioréacteur. Elles ont été appliquées avec succès pour le suivi de la concentration de divers nutriments et métabolites comme le glucose (Blankenstein et al. 1994; Konstantinov et al. 1996; Male et al. 1997; Siegwart et al. 1999; van der Pol et al. 1994), le lactate (Blankenstein et al. 1994; van der Pol et al. 1994), la glutamine (Blankenstein et al. 1994; van der Pol et al. 1994) et l'ammoniac (Blankenstein et al. 1994). Le suivi en ligne de la concentration cellulaire est également possible avec les récents développements de plusieurs sondes et de méthodes (Ducommun et al. 2001; Konstantinov et al. 1994).

Cependant, la consommation d'oxygène (OUR) demeure l'une des variables les plus utilisées pour le contrôle des cultures de cellules animales et comme indicateur de l'activité métabolique des cellules (Eyer et al. 1995; Kyung et al. 1994; Lovrecz et Gray 1994; Singh 1996; Yoon et Konstantinov 1994). La production de CO_2 a également été suivie (de Tremblay et al. 1993), mais la présence de tampon bicarbonate dans le milieu de culture complique considérablement la mesure (Bonarius et al. 1995; Neeleman et al. 2000).

Une caractérisation en ligne plus poussée a été rapportée dans une étude (Zhou et Hu 1994). À partir de mesures en ligne de la densité optique et de la consommation d'oxygène, ils étaient en mesure d'estimer la concentration cellulaire, le taux de croissance, le taux spécifique de consommation de l'oxygène ainsi que les taux de consommation de glucose et de production de lactate.

1.6.1 Suivi des cultures infectées

Plusieurs approches ont été proposées pour effectuer le suivi d'une infection dans un bioréacteur. Dans le cas des cultures de cellules d'insecte infectées avec

un baculovirus, on a noté un lien intime entre le taux de consommation d'oxygène et la production de virus (Kamen et al. 1996). Kussow *et al.* (1995) ont démontré une corrélation similaire pour la production de virus porcin en utilisant des cellules épithéliales dans un réacteur en continu. Dans leur étude, le maximum de concentration de virus survient 10 heures après le maximum de consommation d'oxygène, ce qui les a conduits à suggérer l'utilisation de ce signal pour déterminer le moment de récolte. Le suivi du biovolume d'une culture (lié au diamètre moyen des cellules) s'avère un autre indicateur efficace du processus d'infection pour le systèeme baculovirus (Monica et al. 2000; Zeiser et al. 1999). En se basant sur les niveaux de production de lactate différents pré et post-infection, Singhvi *et al.* (1996) ont quant à eux pu établir un critère qui permet d'estimer le pic de concentration de virus. En utilisant un adénovirus contenant le gène de la GFP (green fluorescent protein), la cinétique d'infection a pu être suivie par le biais d'une sonde à fluorescence (Gilbert et al. 2000). Le signal de fluorescence permet alors de prédire lui aussi le maximum de concentration de virus. Cela devient une considération importante pour choisir le meilleur moment pour récolter surtout lorsque le virus produit n'est pas stable dans le temps.

Si le suivi des différentes variables évoquées précédemment permet d'effectuer la supervision des phases critiques du procédé, aucune de ces méthodes ne donne la possibilité de prédire la qualité de la production, c'est à dire si le rendement en virus sera élevé. Pour obtenir une infection optimale, le métabolisme des cellules au moment de l'infection semble le facteur clef à contrôler (Kussow et al. 1995; Nadeau et al. 2000a). Cependant, la plupart des variables qui font l'objet d'un suivi, comme la respiration cellulaire, la croissance cellulaire, la consommation d'un nutriment ou la production d'un métabolite, ne représentent individuellement qu'un aspect du métabolisme global des cellules. Pour être véritablement efficace, une technique de suivi doit pouvoir détecter la réponse physiologique des cellules à des changements de conditions opératoires ou environnementales.

1.6.2 État physiologique des cultures

Le concept d' « état physiologique » d'une culture est employé pour regrouper et décrire toutes les cinétiques de croissance, de consommation et de production des cellules. L'état physiologique peut se définir comme étant l'ensemble des caractéristiques (sur le plan métabolique) propres à des cellules qui conduisent à des profils bien distincts de consommation, de croissance et de production.

En identifiant un état physiologique désirable pour une culture (par exemple, celui pour lequel la production est maximale), on peut alors fixer l'objectif des stratégies d'optimisation et de contrôle comme étant de conduire une culture vers cet état et de l'y maintenir. En pratique, la difficulté réside dans la façon de définir adéquatement cet état physiologique, par le biais de mesures pertinentes.

Une approche proposée dans la littérature (Konstantinov 1996) suggère de quantifier l'état physiologique des cellules par une série de mesures jugées particulièrement significatives sur le plan métabolique. En considérant les données d'une culture en perfusion de cellules CHO produisant des anticorps,

les auteurs de cette étude dressent une liste de ces paramètres qui sont essentiellement des taux de consommation (oxygène, glucose), des taux de production (CO_2, lactate, anticorps) et des rapports de différents taux (oxygène/glucose, lactate/glucose, etc).

Au même titre que les techniques classiques évoquées précédemment, cette approche ne fait intervenir que des mesures effectuées dans l'environnement extracellulaire. Une connaissance plus approfondie nécessite que l'information au niveau intracellulaire soit également prise en compte dans la démarche. Pour cette raison, mais aussi grâce au développement de méthodes analytiques toujours plus fines, les travaux actuels tendent plutôt à caractériser le métabolisme cellulaire en regardant ce qui se passe à l'intérieur même de la cellule, et c'est ce qui fait l'objet de la prochaine section.

1.7 Analyse des Flux métaboliques

L'analyse des flux métaboliques est une approche qui permet de caractériser l'état physiologique des cellules en calculant les flux intracellulaires. Ces flux intracellulaires constituent le reflet des taux de réactions biochimiques à

l'intérieur de la cellule. Pour estimer ces flux, la méthode se fonde essentiellement sur un modèle stœchiométrique pour les principales réactions intracellulaires et sur des bilans de masse utilisant des mesures effectuées au niveau extracellulaire. Normalement, l'analyse des flux métaboliques doit se faire dans des conditions de régime permanent (Bonarius et al. 1996; Zupke et al. 1995), mais il a été démontré qu'il est possible d'effectuer ce genre de calcul en cuvée (ou en cuvée alimentée) en assumant un régime pseudo-stationnaire (Stephanopoulos et al. 1998).

L'analyse des flux métaboliques permet de cerner les principales voies métaboliques que la cellule emploie et de déduire les meilleures stratégies d'alimentation afin de maximiser la croissance d'une part, et la production d'autre part. La technique a surtout été utilisée pour les systèmes microbiens et relativement peu a été fait du côté des cellules animales. Cela s'explique surtout par la complexité accrue de ces systèmes. Néanmoins, un certain nombre de travaux ont démontré l'utilité de l'approche pour mieux caractériser et comprendre le métabolisme cellulaire en réponse à différents facteurs (ex : milieu de culture) ou dans différentes conditions opératoires (ex : stratégie d'alimentation).

L'application de techniques comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Mancuso et al. 1994; Martinelle et al. 1998; Sharfstein et al. 1994; Zupke et Stephanopoulos 1994b), la spectrométrie de masse (Bonarius et al. 2001) et l'emploi de traceurs isotopiques (Fitzpatrick et al. 1993; Nadeau et al. 2002) a permis le développement de modèles métaboliques de plus en plus complets.

Par l'estimation des flux intracellulaires, Zupke *et al.* (1995) ont étudié l'effet de l'oxygène dissous sur la croissance d'hybridomes et ont pu mettre en évidence les changements qui surviennent dans le métabolisme cellulaire à des faibles concentrations d'oxygène dissous dans le milieu. En situation de limitation d'oxygène, il a été observé que le flux de pyruvate dans le cycle de Krebs devient négligeable et cela se traduit par une baisse marquée du taux de production d'ATP. Fait à noter, la baisse de ces flux était corrélée avec une réduction significative de la respiration et de la consommation de glucose.

De façon analogue, Bonarius *et al.* (2000) ont étudié l'impact de stress oxydatif ou réducteur sur le métabolisme des cellules. Ils ont également noté une diminution au niveau des taux de dégradation de plusieurs acides aminés en situation de limitation d'oxygène.

L'analyse des flux métaboliques a également été utilisée pour expliquer les différences observées au niveau de la croissance et de la production lorsque des cellules sont cultivées dans des milieux de culture différents. On a ainsi pu quantitifer les effets de l'ajout de peptides dans le milieu (Bonarius et al. 1996; Nyberg et al. 1999). Cela a permis de mettre en évidence que la présence de peptides accroît l'activité oxydative des cellules et conduit à des densités cellulaires plus élevées.

D'autres études ont caractérisé le métabolisme des cellules en réponse à l'ajout d'ammoniac (Bonarius et al. 1998), à l'addition d'un agent anti-apoptotique (Balcarcel et Clark 2003), en présence de faibles concentrations d'insuline (Chan et al. 2003), dans des conditions d'osmolarités élevées (Lin et al. 1999) et pour un milieu pauvre en glucose (Martinelle et al. 1998).

Exposées à de faibles concentrations de glucose, les cellules utilisent davantage la glutamine et cela conduit à une production plus élevée d'ammoniac (Martinelle et al. 1998). L'analyse des flux a permis de révéler que ces changements sont attribuables à une activité accrue des voies de glutaminase et de glutamate dehydrogénase, alors que ces voies sont régulées négativement lorsque le glucose est en excès.

En ajoutant de l'ammoniac pour en mesurer l'impact sur le métabolisme cellulaire, il a été constaté que la voie du glutamate dehydrogénase s'en trouve alors renversée (Bonarius et al. 1998). Ceci démontre que les cellules peuvent contrer l'accumulation de ce métabolite en le convertissant en glutamate. L'ammoniac étant souvent problématique dans les cultures à haute densité cellulaire, un tel résultat suggère que cet enzyme (glutamate dehydrogenase) pourrait constituer une cible de choix pour le génie métabolique.

L'analyse des taux intracellulaires de cellules cultivées sous différentes concentrations de rapamycin, un agent anti-apoptotique, a permis d'en établir les effets sur le métabolisme cellullaire. La concentration optimale (à l'égard de la viabilité cellulaire et de la productivité spécifique en anticorps) correspond à la situation où le flux de pyruvate vers le cycle de Krebs est le plus élevé et conduit à la formation maximale d'ATP (Balcarcel et Clark 2003). Une corrélation similaire entre l'ATP et la production d'anticorps a été proposée pour expliquer la productivité accrue de cellules hybridomes soumises à une pression osmotique élevée (Lin et al. 1999).

Ces travaux montrent qu'en analysant la distribution des flux, on est alors à même de concevoir des milieux de culture plus performants. La démarche peut également servir à concevoir de façon rationnelle des stratégies d'alimentation plus efficaces (Xie et Wang 1994a).

L'analyse des flux métaboliques a également été appliquée dans le cas spécifique des cellules HEK-293 (Nadeau et al. 2000b) pour caractériser leur métabolisme dans un milieu à faible teneur en glutamine. L'approche a conduit à suggérer une alimentation pulsée en acides aminés, ce qui a permis de réduire la quantité d'ammoniac produit et eu pour effet d'améliorer la croissance cellulaire.

Follstad *et al.* (1999) ainsi que Europa *et al.* (2000) ont eu recours à une analyse des flux métaboliques pour mettre en évidence l'existence de métabolismes cellulaires distincts chez des cellules hybridomes pour des taux de dilution identiques (« multiplicité des régimes permanents »). Ces études ont permis de démontrer qu'en réduisant la concentration de glucose et de glutamine dans le milieu, il est possible d'altérer le métabolisme cellulaire de sorte que ce dernier soit plus efficace (par exemple, moins de lactate produit pour une même quantité de glucose consommée). Ce type de conclusions a des répercussions

évidentes sur la conception de systèmes de culture et peut aider à définir les conditions opératoires permettant d'optimiser la production.

Bien que la littérature concernant l'analyse des flux appliquée aux cellules animales soit en croissance, ce domaine n'a pas encore atteint sa pleine maturité. En effet, certaines questions fondamentales n'ont pas été entièrement élucidées si l'on en juge par les différences notoires et les apparentes contradictions qu'on peut recenser dans les travaux publiés.

Par exemple, plusieurs études ne s'accordent pas sur l'importance relative de la voie du pentose-phospate dans le métabolisme du glucose. Alors que certains travaux font état d'une activité négligeable de cette voie, d'autres rapportent des flux beaucoup plus significatifs. Moins de 4 % du glucose consommée emprunterait cette voie selon Mancuso et al. (1994), 3 % selon Nadeau et al. (2002) et Fitzpatrick et al. (1993), 7 % selon Paredes et al. (1998), 8 % selon Sharfstein et al. (1994), 20 % selon Bonarius et al. (2001) et jusqu'à 95 % selon Bonarius et al. (1996).

Il est possible que de telles différences soient inhérentes aux différentes lignées cellulaires utilisées. Cela peut également être attribuable au fait que les

conditions de cultures ne soient pas les mêmes. Ainsi, dans un réacteur continu (Bonarius et al. 1996), les cellules présentent des taux biosynthétiques plus élevés que des cellules adhérentes cultivées dans un réacteur à fibres creuses (Mancuso et al. 1994). Elles requièrent donc plus de NADPH, ce qui expliquerait l'activité accrue de la voie du pentose-phosphate.

Les méthodes expérimentales utilisées pour la détermination de cette voie étant variées (traceurs radioactifs, spectroscopie de masse et résonance magnétique), il est également possible que ce soit ces-dernières et leurs hypothèses sous-jacentes qui expliquent la diversité des résultats. Ceci demande à être approfondi afin d'augmenter l'exactitude des modèles métaboliques.

1.7.1 Analyse des flux intracellulaires pour des cultures infectées

La technique d'analyse des flux a pu être étendue aux cas particuliers des cultures infectées (Nadeau et al. 2000a). Ces travaux ont permis d'établir un certain nombre de résultats propres à la phase d'infection. Par rapport à la période de croissance, une augmentation substantielle des principaux flux a été observée 10 heures post-infection, temps correspondant au début de la

production de protéines virales, qui culmine entre 20 et 30 heures post-infection. L'approche a également permis de comparer différents milieux de croissance et de révéler une utilisation plus efficace du glucose dans un milieu à faible teneur en protéines. Divers modes d'opération batch et fed-batch ont également été testés (Nadeau et al. 2000a) pour en mesurer les effets sur la production de vecteurs viraux. De ces études, les auteurs ont conclu que la productivité serait favorisée par une alimentation visant à maintenir des concentrations élevées de nutriments, assurant en retour un métabolisme élevé.

1.7.2 Analyse des flux métaboliques comme outil d'optimisation

L'analyse des flux métaboliques est utile par la richesse des données générées, mais l'information sur le métabolisme cellulaire est seulement connue *a posteriori*. Pour que l'approche puisse servir à l'optimisation et au suivi, il faut l'étendre de façon à la rendre applicable en temps réel.

Une telle méthode a été appliquée avec succès pour une culture microbienne. Takiguchi *et al.* (1997) ont utilisé un réseau métabolique très simplifié (11 réactions biochimiques) pour lequel toutes les mesures requises pour le calcul

des flux étaient disponibles en-ligne. L'estimation ainsi obtenue leur a permis d'ajuster de façon continue l'alimentation en fonction de l'état métabolique de la culture. Cela s'est traduit par un gain très net au niveau de la productivité.

Dans le cas des cellules animales qui sont des systèmes intrinsèquement plus complexes, le défi réside dans le fait que la démarche requiert généralement plusieurs mesures et que seulement une fraction d'entre elles sont disponibles en temps réel. De plus, les données disponibles en ligne et hors ligne étant pour la plupart peu fréquentes et entâchées de bruit, un autre défi rencontré est l'estimation adéquate des taux de consommation et de production nécessaires au calcul des flux intracellulaires.

1.8 Estimation des taux cinétiques

Il arrive fréquemment que des variables d'intérêt ne soient pas mesurables directement du fait de l'absence de capteur en ligne, ou bien qu'elles soient mesurées peu fréquemment et avec un certain délai. Dans des cas comme ceux-ci, il est parfois possible d'obtenir un estimé de ces variables à partir d'autres mesures disponibles, par l'utilisation d'algorithmes d'estimation couplés à des

équations théoriques. Dans le cas des bioprocédés, cette tâche est toutefois compliquée car les paramètres sont souvent variables dans le temps et en raison de la présence inhérente de non-linéarités parfois très prononcées Néanmoins, de nombreuses études rapportent l'utilisation de telles techniques appliquées à des systèmes biologiques pour l'estimation de concentrations (Gudi et al. 1994; Hitzmann et al. 2000; Neeleman et al. 2000; van der Heijden et al. 1989) ou l'estimation de taux cinétiques (Bastin et Dochain 1990; Claes et Van Impe 1999; Estler 1995; Gee et Ramirez 1996; Pelletier et al. 1994; Siegwart et al. 1999; Stephanopoulos et San 1984a; Stephanopoulos et San 1984b).

Il existe plusieurs techniques permettant d'estimer des paramètres. Une méthode de moindres carrés récursifs avec facteur d'oubli (Hsia 1977) a été appliquée avec succès dans plusieurs études (Bastin et Dochain 1990; de Tremblay et al. 1993; Williams et al. 1986), notamment pour l'estimation de taux de consommation à partir d'une mesure en ligne de la concentration de glucose (Siegwart et al. 1999) ou l'estimation d'un taux de croissance à partir de la mesure des gaz de sortie (Estler 1995).

Une autre alternative est l'utilisation d'un observateur asymptotique (Bastin et Dochain 1990), méthode appliquée entre autre pour l'estimation du taux de

croissance à partir d'une mesure en ligne de la biomasse (Claes et Van Impe 1999).

Cependant, la technique la plus fréquemment rapportée est le filtre de Kalman étendu (Stephanopoulos et San 1984a; Stephanopoulos et San 1984b). Le filtre de Kalman est utilisé pour obtenir un estimé « optimal » de l'état d'un procédé. L'état peut être une variable de procédé (par exemple une concentration) ou une fonction reliant les variables à un tout autre paramètre (par exemple un taux de production volumétrique). Dans cette approche, une mesure et le modèle du procédé donnent chacun un estimé de l'état et le filtre en combinant ces deux estimés procure un estimé « optimal » ayant une variance plus faible. La méthode permet donc de réduire le bruit contenu dans les données. Son autre principal atout est d'être applicable dans les cas ou la fréquence d'échantillonnage est variable. Toutefois, la méthode repose sur une approximation linéaire et peut donc s'avérer inadéquate en présence de non-linéarités sévères (Gudi et al. 1994). Dans de tels cas, il faut se tourner vers la conception d'observateurs non-linéaires multi-taux (Tatiraju et al. 1999) . Cette technique requiert également que le filtre soit adéquatement réglé afin de donner une bonne estimation. Le paramètre de réglage important est le ratio

des matrices de covariance des mesures et du modèle (Stephanopoulos et San 1984a).

Pelletier et al. (1994) ont utilisé un tel filtre couplé à un modèle non-structuré pour estimer les concentrations de cellules viables et mortes, les concentrations de lactate, glutamine, d'ammoniac et d'anticorps à partir d'une mesure unique, soit la concentration de glucose. Par des approches similaires, Gee et Ramirez (1996) ainsi que Hitzmann et al. (2000) ont, pour leur part, estimé la concentration cellulaire et le taux de croissance à partir de mesures de concentration de substrats.

Les divers algorithmes d'estimation doivent être couplés à un modèle du taux spécifique à estimer. La prochaine section passe en revue les différents modèles rapportés pour décrire les taux de consommation et de production des principaux nutriments et métabolites.

1.9 Modélisation des taux spécifiques de consommation et de production

Plusieurs approches ont été utilisées pour modéliser la consommation de nutriments, selon le type d'organisme et de bioréacteur. En général, les équations pour les taux de consommation expriment les cinétiques comme étant une fonction de paramètres intracellulaires et du milieu extracellulaire. Ces équations sont souvent de nature empirique (Andrews 1993; Tziampazis et Sambanis 1994).

Des cinétiques de saturation (de type Monod) ont parfois été employées (Gaertner et Dhurjati 1993; Kurokawa et al. 1993) pour décrire la dépendance des taux de consommation à l'égard des concentrations. À partir de résultats obtenus en chemostat (Frame et Hu 1991; Hiller et al. 1991), les taux de consommation ou de production (q) sont fréquemment exprimés comme étant fonction du taux de croissance (μ), d'un coefficient de rendement (Y) et d'un terme de « maintenance » (m). Le métabolisme de maintenance inclut toute consommation de substrat pour des dépenses cellulaires énergétiques qui ne sont pas liées à la croissance.

$$q = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m$$

À partir de ces considérations, Zeng and Deckwer (1995) ont proposé un modèle non structuré dans lequel, en présence d'un excès de substrat, le taux de consommation peut s'exprimer comme la somme du taux sous des conditions limitantes plus un terme de consommation additionnel due à l'excédent. Le modèle a permis de décrire correctement un large éventail de conditions. Toutefois, le modèle contient un grand nombre de paramètres à ajuster ce qui peut d'ailleurs expliquer la bonne description des données. Plutôt que de relier le taux de consommation à la concentration résiduelle de substrat, Portner et al. (1994) ont quant à eux établi une relation avec la concentration cellulaire ce qui permet également de décrire la réduction des taux observée durant les cultures en batch.

A la lumière de tous ces résultats, on constate la grande diversité dans la littérature au niveau des données et de leur interprétation. Souvent, ces différences sont attribuables à des conditions opératoires différentes ou à l'utilisation de lignées cellulaires différentes, présentant des métabolismes distincts.

CHAPITRE 2: PRÉSENTATION DES ÉTAPES DE TRAVAIL

Cette section décrit l'organisation générale des principales étapes du travail qui ont fait l'objet de trois articles. En premier lieu, le chapitre 3 présente les différentes méthodes expérimentales et analytiques employées tout au long de ce travail. Le chapitre 4 est quant à lui constitué d'un premier article intitulé : *Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures* accepté pour publication dans la revue *Biotechnology and Bioengineering*. Cet article porte principalement sur l'étude de l'influence du taux d'alimentation et de la concentration cellulaire sur la croissance et la productivité des cultures en perfusion. Des outils de suivi en ligne du processus d'infection y sont également discutés. En fin de chapitre, une section additionnelle présente des résultats complémentaires obtenus postérieurement par de nouvelles expériences et qui confirment les tendances rapportées dans ce premier article.

Les résultats démontrant l'existence d'un lien étroit entre la physiologie cellulaire et la productivité des cultures, la seconde phase du travail porte sur la caractérisation de l'état physiologique des cellules par la technique d'analyse des flux métaboliques. Le chapitre 5 présente le modèle métabolique employé dans le cadre de cette étude, de même que les outils analytiques utilisés pour le calcul des flux, de l'erreur qui s'y rattache, ainsi que pour la détection d'erreurs de mesure. Ces outils ont permis l'étude du métabolisme cellulaire sous différentes conditions opératoires, afin d'identifier les variables clefs qui sont corrélées avec la productivité des cultures et qui pourraient servir au suivi du procédé. Ces travaux font l'objet du chapitre 6 qui est constitué d'un second manuscrit : *HEK-293 cells physiological state as a determinant of adenoviral vector productivity in perfusion cultures,* soumis pour publication à la revue *Biotechnology Progress.*

La dernière partie de la thèse porte sur le développement et l'application d'une approche permettant l'estimation en temps réel des flux métaboliques. Le chapitre 7 présente tout d'abord les algorithmes d'estimation ainsi que des résultats préliminaires qui ont permis de valider la démarche dans un premier temps sur des données simulées, puis sur des données réelles de culture. Les résultats principaux sont quant à eux présentés dans le chapitre 8 qui est

constitué du troisième article intitulé : *Physiological state monitoring by real-time estimation of metabolic flux in perfusion cultures.* Cet article a été soumis pour publication à la revue *Biotechnology and bioengineering*.

CHAPITRE 3: MÉTHODOLOGIE

Ce chapitre décrit les principales méthodes utilisées pour mener les expériences et générer les données.

3.1 Matériel et méthodes

3.1.1 Cellules, milieu de culture et vecteur viral

Toutes les expériences ont été effectuées avec la lignée cellulaire HEK-293 SF bien adaptée à la culture en suspension et sans sérum. Les cellules ont été cultivées dans le milieu NSFM13 développé par Côté *et al.* (1998).

Les cellules étaient maintenues en flacons statiques et diluées 2 ou 3 fois par semaine de façon à les garder en phase exponentielle de croissance. Après quatre mois de « maintenance », un nouvel aliquot était décongelé. L'amplification était effectuée en flacons agités de 125 mL à 2 L et les cultures inoculées à une concentration de l'ordre de $3x10^5$ cellules/mL.

Le vecteur utilisé pour toutes les infections a été un adénovirus de type 5 contenant le gène codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein). Des aliquots conservés à –80°C et à une concentration de $1.7x10^{10}$ IVP/mL ont été employés.

3.1.2 Bioréacteur

Les expériences ont été conduites dans un bioréacteur de 3.5 L muni de trois chicanes de surface et de deux hélices marines. Le volume d'opération était maintenu entre 2.6 et 3.2 L. Durant les cultures, la vitesse d'agitation était de l'ordre de 100 rpm. Le pH était quant à lui contrôlé à 7.2 par l'addition de base (NaOH 1N) ou en contrôlant la fraction de CO_2 dans les gaz d'alimentation. L'utilisation de NaOH a été préférée à celle de $NaHCO_3$ pour faciliter le bilan sur le CO_2. L'oxygène dissous était gardé constant à une valeur de 40 % de la saturation pour 1.1 atm. L'aération était effectuée par la surface et contrôlée par trois débitmètres (O_2, CO_2 et N_2). Le débit gazeux total était fixé à 300 mL/min et la pression dans le réacteur maintenue à 1.1 atm.

La rétention des cellules était effectuée par le biais d'un filtre acoustique BIOSEP 10L. Les paramètres opératoires du filtre étaient les suivants : un temps

de fonctionnement de 90 secondes, un temps de pause de 9 secondes et une puissance initiale de 3W. Cette puissance était ajustée en fonction de la concentration de cellules jusqu'à un maximum de 6 W.

Trois pompes assuraient respectivement l'alimentation, la recirculation (via le filtre acoustique) et la récolte. Le débit de recirculation était ajusté en fonction de l'efficacité de séparation, mais était généralement inférieur à trois fois le débit d'alimentation afin de minimiser le nombre de passage des cellules dans la tête de la pompe. Le débit d'alimentation était déterminé grâce à une balance mesurant le poids de la bouteille de milieu frais. Cette dernière était placée dans un refrigérateur à 4 ° C.

Outre les sondes de pH, d'oxygène dissous et de température, le bioréacteur était muni de sondes à capacitance, à fluorescence, et à gaz carbonique dissous. Un analyseur infrarouge était employé pour doser la concentration de CO_2 dans les gaz de sortie. Des vannes permettaient la prise d'échantillons dans le bioréacteur et dans le courant de récolte.

3.1.3 Méthodes analytiques

Les mesures de glucose, de lactate et d'ammoniac étaient effectuées hors-ligne au moyen d'un analyseur (Biolyzer). Les concentrations cellulaires étaient déterminées par des comptes au microscope au moyen d'un hémacytomètre. La viabilité était quant à elle évaluée après coloration des cellules avec de l'érythrosine. La quantification des acides aminés dans le surnageant des échantillons a été effectuée par HPLC en phase inverse par une technique adaptée de la méthode ACCQ-Tag™ (Waters).

Les concentrations de particules virales totales étaient déterminées par HPLC sur colonne échangeuse d'anions (UNO Q-1, 3.5 cm x 0.7 cm D.I.). Cette méthode permet la quantification à partir de lysats cellulaires non traités (Klyushnichenko *et al.* 2000).

La concentration de virus infectieux a été déterminée par le biais d'un essai de transfert de gènes : une plaque à 6-puits est inoculée à une concentration de $1x10^6$ cellules/mL à partir d'une culture de cellules 293 S. Un volume fixe provenant de l'échantillon à analyser est dilué 1:100 dans du milieu frais (DMEM) puis ajouté en différentes quantités dans chacun des puits. Le facteur

de dilution de l'échantillon est choisi de façon à obtenir un ratio cellules fluorescentes (GFP) sur cellules totales compris entre 0.1 et 0.7. Après une incubation de 20 h, les cellules fluorescentes sont analysées au moyen d'un cytofluoromètre (FCM, EPICS XL-MLC).

3.2 Calcul des taux spécifiques de consommation des nutriments et de production des métabolites

Les taux cinétiques ont été déterminés à partir des mesures de concentration et de paramètres opératoires (volume et débits). Des bilans de matière autour d'un réacteur opérant en mode perfusion conduisent aux équations suivantes :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX_H$$

$$\frac{dS}{dt} = q_S X + D(S_{in} - S)$$

$$\frac{dP}{dt} = q_P X + DP$$

où X dénote la concentration de cellules viables, μ est le taux de croissance (h^{-1}), D est le taux de dilution (h^{-1}), X_H est la concentration cellulaire dans la récolte, S_{in} la concentration dans l'alimentation et q_i les taux spécifiques de consommation ou de production.

On peut donc obtenir les taux spécifiques de consommation (q_S) et de production (q_P) par les approximations suivantes:

$$q_s = -\frac{1}{x}\cdot\left[\frac{ds}{dt} - D\cdot(s_{in} - s)\right] \cong -\left(\frac{2}{x_t + x_{t-1}}\right)\cdot\left[\left(\frac{s_t - s_{t-1}}{t_t - t_{t-1}}\right) - D\cdot(s_{in} - s_t)\right]$$

$$q_P = \frac{1}{x}\cdot\left[\frac{dP}{dt} + D\cdot P\right] \cong \left(\frac{2}{x_t + x_{t-1}}\right)\cdot\left[\left(\frac{P_t - P_{t-1}}{t_t - t_{t-1}}\right) + D\cdot(P_t)\right]$$

A noter que d'autres méthodes permettent une meilleure évaluation des taux spécifiques. Ces méthodes font l'objet du chapitre 7 où elles sont détaillées.

3.3 Calcul des taux biosynthétiques

Une partie des nutriments consommés sert à la synthèse des marcomolécules qui constituent la biomasse. Les principaux constituants d'une cellule sont l'ARN, l'ADN, les protéines, les lipides (principalement dans la membrane cellulaire) et les carbohydrates. Pour les différents constituants de la biomasse, on a le bilan suivant:

$$\frac{dX_{macro}}{dt} = r_X - \mu X_{macro}$$

où X_{macro} désigne la fraction massique d'un constituant sur une base sèche. En assumant que la composition des cellules ne varie pas (Bonarius et al. 1996; Xie et Wang 1994b), les taux biosynthétiques s'obtiennent donc par des mesures sur la composition macromoléculaire des cellules et à partir du taux de croissance:

$$r_X = \mu X_{macro}$$

3.4 Calcul du taux de consommation d'oxygène

Dans un réacteur opéré en perfusion, plus le taux de perfusion est élevé, plus il devient important de considérer la contribution des courants d'alimentation et de récolte pour déterminer la respiration cellulaire. Un bilan massique sur l'oxygène dans la phase liquide conduit à l'équation suivante :

$$\left(\frac{dC_{L.O_2}}{dt}\right) = k_L \cdot a \cdot \left(C^* - C_{L.O2}\right) + D \cdot \left(C_{in.O2} - C_{L.O2}\right) - q_{O_2} X$$

où C_L est la concentration dans le liquide, C* est la concentration d'équilibre, C_{in} la concentration dans l'alimentation et k_La est le coefficient de transfert de masse.

La concentration d'oxygène dissous étant maintenue constante dans le bioréacteur, on a :

$$q_{O_2} = \frac{1}{X}\left[k_L \cdot a \cdot \left(C^* - C_{L.O2}\right) + D \cdot \left(C_{in.O2} - C_{L.O2}\right)\right]$$

L'oxygène gazeux alimenté au réacteur étant mesuré sous la forme d'une fraction molaire, il faut relier ces mesures aux concentrations dans le liquide par la loi d'Henry :

$$C^* = \frac{P_{tot} \cdot y_G}{H_{O_2}}$$

La concentration d'oxygène dans l'alimentation est assumée comme étant égale à la concentration de saturation à 20 °C, une hypothèse validée par une mesure hors-ligne effectués sur un analyseur de gaz du sang (Bioprofile). Les valeurs utilisées pour la constante d'Henry sont de 757 atm.L/mol (20 °C) et 986 atm.L/mol (37 °C)

La vitesse d'agitation et la configuration du bioréacteur étant conservées les mêmes à chaque culture, la valeur du k_La était uniquement ajustée en fonction des fluctuations du volume d'opération selon une équation empirique.

3.5 Calcul du taux de production de CO_2

La détermination du taux de production de CO_2 est difficile pour les cultures de cellules animales puisque les milieux de culture contiennent du bicarbonate

($NaHCO_3$). Lorsqu'on mesure le CO_2 dans les gaz de sortie, il faut pouvoir discriminer entre le CO_2 produit par la respiration cellulaire et le résultat de la simple désorption du CO_2 contenu dans le milieu. Pour ce faire, il faut tenir compte des relations d'équilibre entre les différentes espèces tel qu'illustré sur la Figure 3.1.

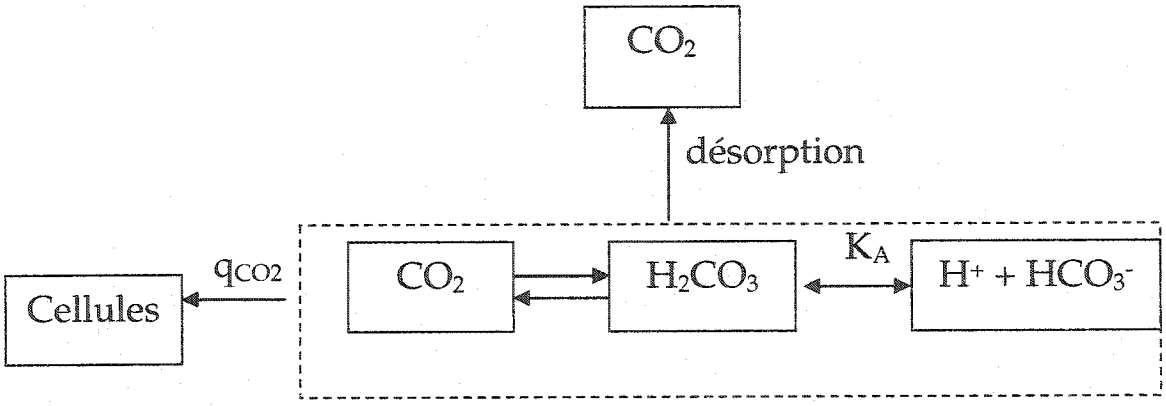


Figure 3.1 Bilan sur le CO_2 au cours d'une culture de cellules animales

Un bilan sur le « carbonate total » (Ca_L) conduit à l'équation suivante :

$$\left(\frac{dCa_L}{dt}\right) = \frac{\dot{n}_g}{V_L} \cdot \left(y_{CO_2}^{out} - y_{CO_2}^{in}\right) + D \cdot \left(Ca_{in} - Ca_L\right) - q_{CO_2} X$$

où

$$Ca_L = C_{CO2} + C_{HCO3} = \frac{P_{CO2}}{H_{CO2}}\left(1 + \frac{K_A}{10^{-pH}}\right) \quad \text{avec } K_A = \frac{\left[HCO_3^-\right]\cdot\left[H^+\right]}{\left[CO_2\right]}$$

n_g est le débit de gaz total alimenté au réacteur, y_i sont les fractions molaires à l'entrée et à la sortie et Ca_{in} est la concentration dans l'alimentation.

K_A est la constante apparente d'équilibre et son $pK_A = -\log(K_A)$ vaut : 6.138 pour un fluide cérébrospinal à 37 °C et à pH 7.2.

Le taux de production de CO_2 est donc calculable en mesurant la composition des gaz à l'entrée et à la sortie (à l'aide d'un débitmètre et d'un analyseur infrarouge), la concentration de CO_2 dans le bioréacteur et dans la récolte (sonde à CO_2 dissous) et la concentration de CO_2 dans le courant d'alimentation (mesure hors-ligne dans le milieu frais).

CHAPITRE 4: PRODUCTION DE VECTEURS ADÉNOVIRAUX EN MODE PERFUSION

4.1 Présentation de l'article

Cette section reprend l'article intitulé ***Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures.*** Cet article a été soumis et accepté pour publication dans la revue ***Biotechnology and Engineering***. Afin de lever les limitations rencontrées en mode batch, des cultures en mode perfusion ont été effectuées. Un filtre acoustique a été utilisé afin de minimiser le stress imposé aux cellules pour les maintenir dans le bioréacteur. Le but de ces travaux était d'étudier l'effet sur la productivité et le métabolisme des cellules de deux paramètres opératoires importants lors d'une culture en perfusion : la concentration cellulaire à l'infection et le taux de perfusion.

Le phénomène de réduction de la productivité spécifique pour des densités cellulaires plus élevées rapporté pour des cultures en batch a également été observé dans les cultures en perfusion. Cependant, l'alimentation de nutriments et le retrait de métabolites en continu a permis d'infecter à des concentrations

cellulaires significativement plus élevées qu'en batch (de l'ordre de 2.4 à $3x10^6$ cells/mL). Les concentrations maximales atteintes se chiffraient à $4.9x10^{10}$ VP/mL ce qui constitue une augmentation de la productivité volumétrique par un facteur 5.

En outre, les résultats démontrent qu'en augmentant le taux de perfusion jusqu'à 2 volumes/j, on améliore généralement la productivité. Toutefois, le recours à un taux de perfusion plus élevé ne s'est pas traduit par une amélioration. Ceci est probablement imputable au fait qu'à des débits plus élevés, il est difficile de maintenir une bonne rétention cellulaire sans que cela ne soit au détriment du stress imposé aux cellules.

Ces études avaient également pour but d'évaluer la valeur des différentes variables mesurées en ligne comme outils pour effectuer le suivi durant la phase d'infection. Des résultats, il ressort qu'une infection réussie se traduit par une augmentation de la respiration et du volume cellulaire. Le suivi de la consommation d'oxygène et de la capacitance (une quantité reliée au volume cellulaire) sont donc des indicateurs fiables et simples du processus d'infection. En outre, la mesure en ligne de la concentration de GFP par le biais d'une sonde à fluorescence permet de suivre les cinétiques de production et d'estimer le

temps optimal pour procéder à la récolte, c'est à dire quand la concentration virale atteint son maximum dans le bioréacteur.

4.2 Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures

Olivier Henry[1,2], Edwige Dormond[1,2], Michel Perrier[2], Amine Kamen[1]

[1]Institut de Recherche en Biotechnologie, CNRC, 6100 avenue Royalmount, Montréal, Québec H4P 2R2, Canada; Telephone: 514-496-2264; Fax: 514-496-6785; e-mail: amine.kamen@nrc.ca

[2]École Polytechnique de Montréal, Campus de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Correspondence to: Amine Kamen

4.2.1 Abstract

One of the major limitations in the production of adenoviral vectors is the reduction in cell specific productivity observed for increasing cell density at infection in batch cultures. This observation strongly suggests some nutrient depletion and/or metabolite inhibition in the media. These limitations have been partially overcome through other feeding strategies, such as fed-batch and

sequential batch operations. To improve these results, we evaluated perfusion as a strategy to increase the volumetric productivity of HEK-293 cell cultures, by allowing productive infection at higher cell densities. An acoustic cell separator was employed in consideration of the increased shear sensitivity of the cells during the infection phase. The effects of perfusion rate and cell density at infection on the production of a recombinant adenovirus expressing the GFP were investigated. The perfusion mode allowed successful infection at cell densities in the range of 2.4 to to $3x10^6$ cells/mL, while maintaining a similar cell specific productivity (17 900±2400 VP/cell) to that of a batch infected at a low cell density ($5x10^5$ cells/mL). The highest virus concentrations ($4.1±0.6x10^{10}$ VP/mL) were attained for a feed rate of 2 vol/day and constituted a five-fold increase compared to a batch with medium replacement. Rapid assessment of the infection status was achieved through the use of online monitoring of respiration, fluorescence and biovolume. Analysis of the kinetics of nutrient consumption and metabolite production revealed that a reduction in specific productivity is correlated with a reduced metabolic activity.

keywords: adenovirus production; perfusion culture; acoustic separator; HEK-293 cells; on-line monitoring; respiration; biovolume; fluorescence detection;

4.2.2 Introduction

In recent years, recombinant adenovirus vectors have increasingly been used as gene delivery vehicles in strategies for human gene therapy. To meet the growing requirements of preclinical and clinical testing, large amounts of viral material need to be generated through the design of efficient and scalable processes. However, the development of high-yield production methods has been largely hampered by the reduced cell specific productivity observed at high infection cell densities. This "cell density effect" (Nadeau et Kamen 2003) is believed to be caused by factors such as nutrient limitation or the presence of metabolic wastes. Different feeding strategies have been explored to improve volumetric productivities by eliminating at least in part the cell density effect. Particular care must be exercised when comparing the values reported in the literature because they strongly depend on the type of viral construct, the transgene expressed and the quantitation assays used.

A common approach to increase the productivity consists in doing a total medium replacement at the time of infection. This mode of operation has been frequently reported in the literature for viral vector production (Frazzati-Gallina et al. 2001; Iyer et al. 1999; Merten et al. 1999). Using this media

exchange strategy for the infection of 293 cells with an adenovirus, Garnier et al. (1994) were able to increase the density of infection from $0.5x10^6$ to $1x10^6$ cells/mL, while preserving similar productivities. However, media replacement prior to infection was of limited value, because infection at cell densities higher than $1x10^6$ cells/mL resulted in substantially less protein. It was shown for HEK-293 cells that a second medium replenishment 24 hours after infection permitted infection at $2x10^6$ cells/mL (Garnier et al. 1994). It is likely that further gain in productivity would require even more frequent complete media exchange. Although relatively easy to perform at small scale, the practical applicability of this mode of production at large scale raises some concerns related to the shear stress imposed on the cells during the centrifugation step required to re-suspend the cells in fresh medium. Significant increases in operating costs and contamination risks are among other major disadvantages associated with the sequential batch mode.

To circumvent the need of media replacement, various fed-batch approaches have also been investigated. The control of glucose and glutamine at low levels allowed to increase the density of infection and have led to higher virus titers (Wong et al. 1999). However, a reduction in specific production was noted, hypothesised to result from a decrease in infection efficiency due to cell

aggregate formation. Similar results were obtained by Nadeau et al. (1996) using glucose addition to supplement a culture infected at $3x10^6$ cells/mL. This feeding regime led to a reduction of lactate accumulation and osmolarity, but the specific production was significantly reduced.

Another study reported that a glutamine controlled fed-batch infected at $3x10^6$ cells/mL led to a 10-fold improvement in virus titer compared to a batch infected at 1.5 $x10^6$ cells/mL (Lee et al. 2003). However, caution must be used when comparing the two experiments in terms of specific productivity, because the batch culture may have been under strong limitations due to the high cell concentration at infection. In cultures of HEK-293 cells infected at $2x10^6$ cells/mL, the addition of glucose, glutamine and amino acids could not maintain the specific productivity of cultures infected at a lower cell density ($1x10^6$ cells/mL) (Nadeau et al. 2002) . Although more flexible and easy to implement than sequential-batch, the efficiency of fed-batch processes primarily relies on the identification of the factors limiting the culture. To date, the strategies employed have had limited success because these factors have not been completely elucidated for infected cultures, which greatly limits the applicability of fed-batch operation.

Perfusion processes offer the advantages of allowing to reach high cell densities and avoid nutrient limitations through continuous feed of fresh media and dilution and removal of by-product inhibitors. For the production of secreted recombinant proteins, perfusion processes have led to increased productivities (Banik et Heath 1995; Bibila et Robinson 1995). But more importantly, perfusion process have gained broader acceptance by regulatory agencies and are becoming a more common processing formats in industry for recombinant protein production (Chu et Robinson 2001; Voisard et al. 2003). The perfusion mode has been used previously in the context of viral vector production, but has relied mainly on membrane-based cell retention devices. (Kallel et al. 2002; Perrin et al. 1995).

As an alternative to membraned-based perfusion systems, the acoustic separator provides efficient separation (Gorenflo et al. 2002; Trampler et al. 1994) combined with reduced stress on the cells (Merten 2000). Since infected cells are more fragile, the latter is particularly desirable if the perfusion is to be maintained throughout the infection phase. Zhang et al. (1998) have investigated the infection of insect cells taken from a high density culture using an acoustic filter. Their results showed that the ultrasonic filter does not affect the cells ability to support virus production.

In the present work, our main objective was to demonstrate that perfusion cultures using an ultrasonic separator could overcome the limitations encountered in batch and fed-batch operations and improve the volumetric productivity of HEK-293 cells infected with an adenoviral vector expressing GFP. More complex in nature, perfusion processes have several parameters needed to be fine-tuned for adequate operation. In this study, the influence of perfusion rate and cell density at infection on cell growth and virus production was investigated. Another goal was to demonstrate the usefulness and limitations of online measurements such as respiration, fluorescence and biovolume to assess the status of the infection. Finally, in an effort to identify the key factors that can help to infer the yield of a production, the kinetics of nutrient consumption and metabolite production were analysed to better characterise the metabolism of the cells during growth and infection.

4.2.3 Material and Methods

Cell Line and Medium

Experiments were performed using the 293SF-3F6 cells (referred to as HEK-293 throughout the paper), derived from the human embryo kidney cells expressing the E1A and E1B proteins constitutively (Cote et al. 1998; Graham et al. 1977). Cells were maintained in T-flasks at 37°C and 5 % CO_2 atmosphere and subcultured twice a week at 1–2x10^5 cells/mL. After three months of maintenance, the cells were discarded and a new aliquot was thawed. Cells were grown in NSFM13, a low-protein serum-free proprietary medium formulation. Inocula were prepared in 0.5 – 2 L shake flasks and the cells were maintained in their exponential phase at a density lower than 1x10^6 cells/mL.

Recombinant Viral Vector

For the infection, an adenovirus type 5 containing the Green Fluorescence Protein (GFP) under the control of the CMV promoter was used. Viral stock titres were 1.7x10^{10} IVP/ml and aliquots were stored at –80 °C. The MOI used ranged from 10 to 20 for all experiments. Data generated in shake flasks

demonstrated that the productivity of infected 293 SF cells is similar for MOI of 5,10,25,50 and 100, but decreases below MOI of 1.

Culture Conditions

The cultures were performed in a controlled 3.5 L Chemap CF-3000 bioreactor (Mannedorf, Switzerland) equipped with 3 surface baffles and two marine impellers. Exponentially growing cells were inoculated at around $0.4x10^6$ cells/mL. Temperature was maintained at 37 °C by a water jacket. pH (Ingold pH probe, Andover, MA) was controlled at 7.2 with the addition of 1 M NaOH solution or controlling the percentage of CO_2 in the gas inlet. Nitrogen and oxygen were used for controlling the dissolved oxygen concentration at 40 % of air saturation. Sparging was not used to minimise shear stress. The fed gas was introduced by surface aeration and its composition was controlled by mass flow controllers. The fraction of CO_2 in the outflow gas was performed using a Servomex 1400 infrared analyser (Norwood, MA). The bioreactor was also equipped with dissolved CO_2 (YSI 8500 CO_2 monitor, Yellow Springs, OH) and biomass (Aber instruments Ltd., Aberystwyth, UK) probes. An *in-situ* probe allowed the real-time measurement of fluorescence as described in Gilbert et al. (2000). Data acquisition was performed using FIX MMI software (Intellution,

Norwood, MA, USA). Cells were retained in the reactor using a BioSep 10L acoustic filter (Applikon Inc., Foster City, CA). Masterflex L/S peristaltic pumps (models 7521-40, Cole-Palmer, Vernon Hills, IL) were used to add fresh medium, harvest cells and pump the culture through the recirculation loop (Figure 4.1). The flow rate in the external recirculation loop was set at 3 times that of the harvest pump.

Analytical Methods

Viable and total cells were counted using a haemacytometer (Hausser Scientific, Horshaw, PA). Viability was assessed by dye exclusion method using erythrosine. The Biolyzer (Kodak, New Haven, CT) was used for the analysis of glucose, lactate and ammonia. Amino acids were analysed by HPLC (Kamen et al. 1991). The total virus particle titre was assayed by HPLC as described in Klyushnichenko et al.(2000). The quantification of infectious particle was performed as described by Coté et al. (1997) by doing a gene transfer assay using an EPICS XL-MCL flow cytofluorometer (Coulter, FL).

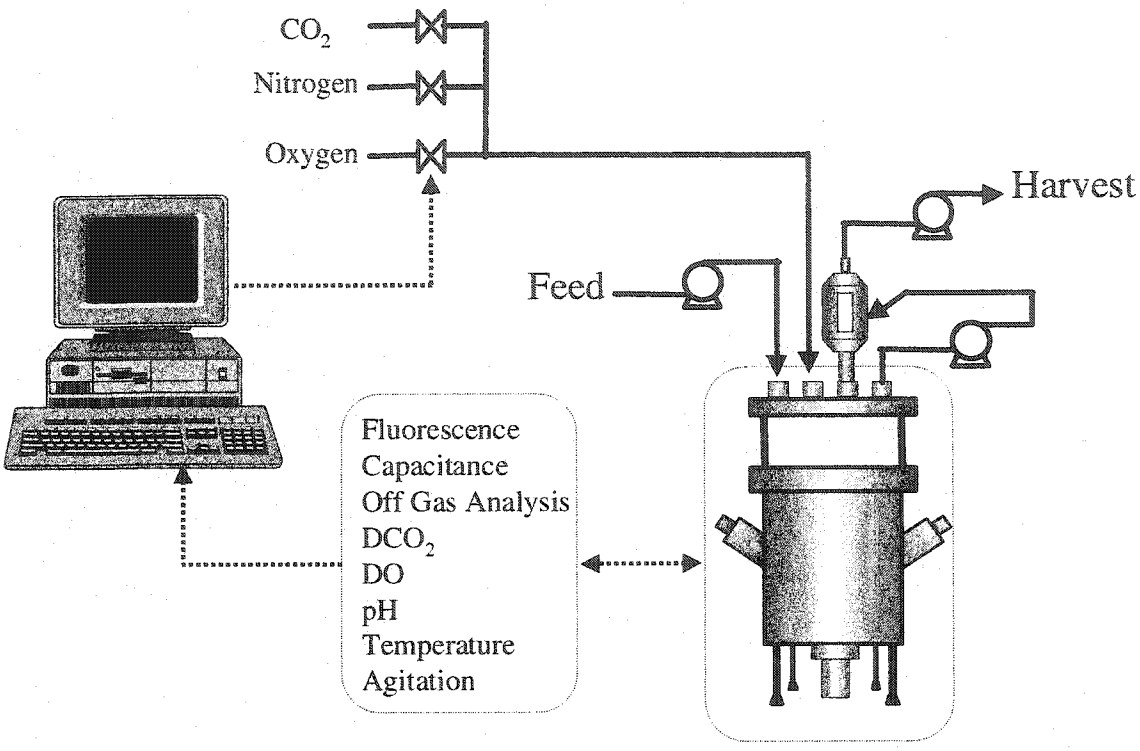


Figure 4.1 Schematic of the perfusion system using an acoustic filter.

Specific Consumption and Production Rates

The specific uptake and production rates were calculated using material balances based on viable cell concentrations. Nutrient balances around the bioreactor yield the following equations:

(1) $\frac{dS}{dt} = -q_S X + D(S_{in} - S)$

(2) $\frac{dP}{dt} = -q_P X + DP$

where D is the perfusion rate, q_S and q_P are the specific consumption and production rates, S is the nutrient concentration in the reactor, S_{in} is the nutrient concentration in the feed and P is the metabolite concentration in the reactor.

The oxygen uptake rate was calculated as follow:

(3) $OUR = -V\left(\frac{dC_L}{dt}\right) + K_L a(C^* - C_L)V + D(C_{L0} - C_L)V$

Where V is the culture volume, C_L is the dissolved oxygen concentration in the reactor, C_{L0} is the dissolved oxygen concentration in the feed, C* is the oxygen concentration at equilibrium with the gas phase and K_La is the mass transfer coefficient for oxygen.

4.2.4 Results and Discussion

To study the effect of various operating conditions on product yield, several perfusion cultures were performed. Table 4-1 summarises the different experimental conditions tested and the results obtained are reported in terms of virus concentrations and cell specific productivity. Following inoculation, cells were initially grown in batch mode for 2 to 3 days until a cell density of about 1 millions cells/mL was reached. The perfusion was then initiated and the cells were allowed to grow until they reached the targeted density for infection. In all experiments, the cultures were infected at an M.O.I ranging from 10 to 20. Since the feed and harvest pumps were not stopped at the time of infection, higher values of M.O.I. were used in the experiments with high renewal rate to account for virus loss in the harvest line and ensure synchronous infection.

Table 4-1 Summary of the results.

Experiment	Perfusion rate (Vol/d) [1]	Cell density and viability at infection (cells/mL)	M.O.I	Max Titer in Bioreactor (VP/mL)	Max Cumulative Titer[2] (VP/mL)	Cell Specific Productivity (VP/cell)	Yield on Media[3] (10^9 VP/mL)
Batch with media replacement	- - -	$5x10^5$ (95 %)	10	$(7.8\pm0.6)x10^9$	- - -	15600±2800	7.8±0.6
#1	0.5	$2.1x10^6$ (96 %)	10	$(2.4\pm0.3x10^{10}$	$(2.5\pm0.4)x10^{10}$	9200±2400	11.1±1.8
#2	1	$2.7x10^6$ (60 %)	10	$(9.1\pm0.3)x10^9$	$(9.6\pm0.4)x10^9$	3600±510	n.a.
#3	1	$4x10^6$ (88 %)	10	$(3.5\pm0.2)x10^{10}$	$(4.5\pm0.3)x10^{10}$	11 300±1900	14.7±1
#4	2	$2.4x10^6$ (86 %)	20	$(4.7\pm0.3)x10^{10}$	$(5.3\pm0.4)x10^{10}$	19 600±3400	4.2±0.3
#5	2	$3x10^6$ (95 %)	20	$(3.5\pm0.1)x10^{10}$	$(4.9\pm0.3)x10^{10}$	16 200±2600	6.0±0.4
#6	2	$5.8x10^6$ (92 %)	20	$(1.4\pm0.1)x10^{10}$	$(2.1\pm0.2)x10^{10}$	3800±740	2.4±0.2
#7	3	$2.6x10^6$ (95 %)	20	$(1.6\pm0.2)x10^{10}$	$(4.1\pm0.3)x10^{10}$	15 900±2750	2.6±0.2

(1) 1 vol/d ≈ 2.8 Litres/d

(2) taking into account the virus measured in the harvest line

(3) with respect to the total media consumed

Improvement Over Batch Production

Table 4-1 presents the results of parallel batch experiments during which the cells were re-suspended in fresh medium prior infection and were infected at a low cell concentration ($0.5x10^6$ cells/mL) to avoid limitations and ensure a good specific productivity. On average, batch cultures reached a maximum virus concentration of $7.8x10^9$ VP/mL at 48 hours post-infection and the cell specific productivity was 15 600 VP/cell.

In comparison, the maximum concentration of viral vector achieved in a perfusion run (experiment #4 and 5) was $4.1x10^{10}$VP/mL, which constituted a five-fold increase over batch production (Figure 4.2).

During the perfusion cultures #4 and #5, cells were infected at concentrations of $2.4x10^6$ to $3x10^6$ cells/mL and the perfusion rate was kept constant at 2 vol/d throughout the growth and infection phases. Since both culture modes yielded similar cell specific productivities, these results clearly demonstrate that perfusion cultures can alleviate in part the density effect and allow productive

infection at higher cell concentrations without impairing the specific productivity.

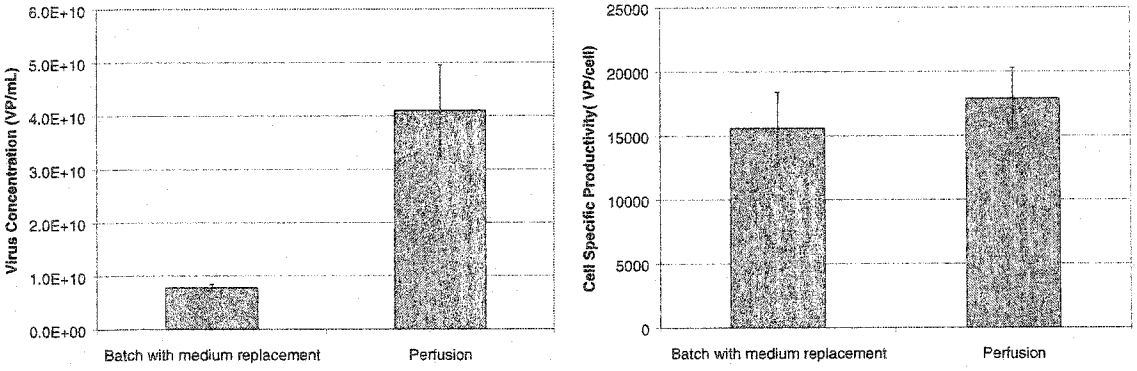


Figure 4.2 Comparison of adenovirus production in perfusion and batch cultures.

In the batch experiments, a total media replacement was performed prior infection and the cultures were infected at a cell density of $5x10^5$ cells/mL. The perfusion cultures were infected at 2.4 to $3x10^6$ cells/mL and led to a five-fold increase in virus titer while maintaining a similar specific productivity.

Detrimental Effect of Low Cell Viability on Production

Cell viability is a determining factor for the yield of a production. In experiment #2, the culture was infected after a plateau in viability was achieved. As soon as a steady-state in viable cell concentration was established, a significant increase in dead cell density was observed, concomitant with a decrease in viability. This is commonly reported for perfusion cultures (Mercille et al. 2000). At the time of infection, the cell viability was only 60 % in the bioreactor and, as shown in Table 4-1, this led to a low virus concentration and a poor specific productivity. The presence of significant amounts of cell debris may have contributed to create adverse conditions for cell growth as well as reduce the efficiency of the infection process by viral particle attachment to non-viable cells and cellular debris. Therefore, in all the other cultures performed, it was ensured that the viability was 85 % or greater at the moment of infection and the cultures were infected before the cells reached a plateau phase. With cell viability at the time of infection ranging between 85 to 96 %, no correlation was observed with virus productivity (Table 4-1, experiments #1,3,4,5,6,7). Figure 4.3 presents the cell viability profiles post-infection for the batch and several perfusion cultures (#1,3,4,5,6,7). The adenovirus being a lytic system, viability decreases as a

consequence of a successful infection. The decrease in viability was similar in the batch production and in the perfusions run at low perfusion rates. In general, experiments performed at perfusion rates of 2 vol/d presented slightly higher viability profiles. These results demonstrate that, under these conditions, the shear generated by the acoustic filter is not significantly damaging the cells.

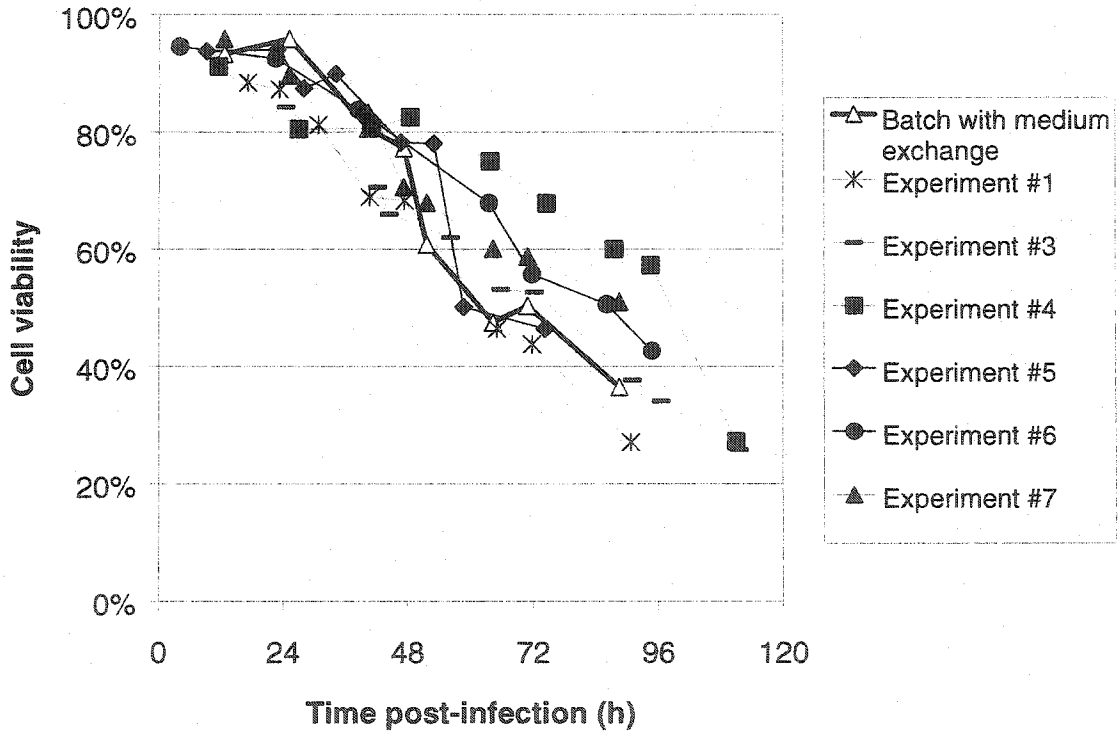


Figure 4.3 Viability profiles post-infection for the batch production and the perfusion cultures (see operating conditions in Table 4-1).

Effects of the Cell Density at Infection

The "cell density effect" reported in batch cultures (Nadeau et Kamen 2003) for infections at cell densities beyond $0.5x10^6$ cells/mL was also observed in perfusion cultures, but occurred at higher cell concentrations. As shown in Figure 4.4, the specific productivity decreases with increasing cell density at the time of infection for a set perfusion rate of 2 vol/d. Comparing experiment #1 and #3 (Table 4-1), we note that to obtain a similar productivity when the cell density is twice as high ($4x10^6$ vs $2x10^6$), the perfusion rate must be increased by a factor of two, suggesting some sort of limitation (nutrient depletion and/or waste inhibition). Specific productivity comparable to those of low cell density infected cultures (15 000 to 20 000 VP/cell) could only be maintained for cell densities up to $3x10^6$ cells/mL with a perfusion rate of 2 vol/day (run #5). For a similar feeding regime, infection at a cell density of $6x10^6$ cells/mL (run #6) led to a 5-fold reduction in specific productivity. Thus, infection at cell concentrations higher than $3x10^6$ cells/mL would require to further increase the perfusion rate to overcome the limitations and preserve the specific productivity.

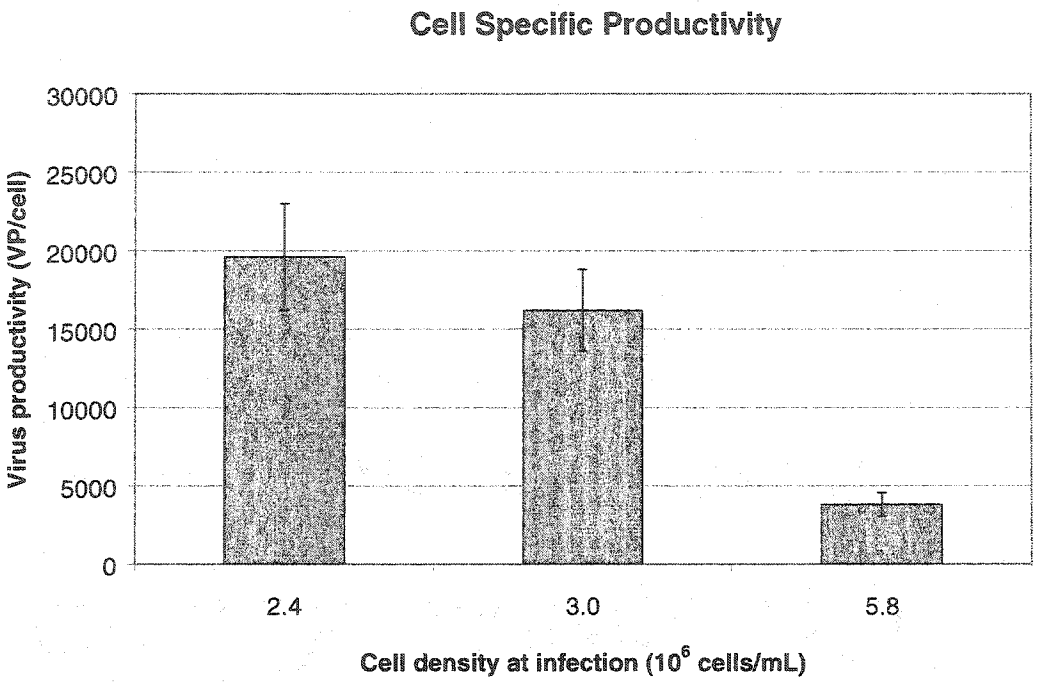


Figure 4.4 Cell density effect. The cell specific productivity decreases as the cell density at infections is increased for a set perfusion rate of 2 vol/d.

Influence of the Perfusion Rate

For similar cell densities at infection, the highest virus productions were achieved for the higher perfusion rates (Figure 4.5), again supporting the hypothesis that the cell density effect may be a result of a nutrient limitation or toxic metabolite accumulation. The maximum viral concentration in the bioreactor was obtained at a dilution rate of 2 vol/day (Figure 4.5A). At higher

dilution rate, the concentration of virus was lower inside the bioreactor because a significant fraction of vectors produced were washed out of the culture in the harvest line (Figure 4.5B). Since most of the virus produced remains intracellular, this is not solely due to dilution effect of the increased flow rate, but is also correlated to a reduced cell retention efficiency. Operating at high renewal rates creates a trade off situation. To maintain the efficiency of the acoustic separator at high flow rates, both the separator power input and the flow in the recirculation loop have to be increased (Gorenflo et al. 2002) and these might negatively affect cell viability. The latter increases circulation of cells through the peristaltic pump that can lead to cell damage (Merten 2000), especially during the infection phase when the cells are more shear sensitive. This may explain why the specific productivity was not improved by feeding at 3 vol/d (Figure 4.5D). One possible solution would be replacing the recirculation loop by a regular air-backflush of the filter chamber as suggested by Gorenflo et al.(2003).

Dilution of the product at high perfusion rates also raise some important considerations related to downstream processing. For instance, in experiment #4, harvesting only the 3 litres of the bioreactor would recover around 90 % of the total virus produced, whereas in the case of experiment #7, the recovery

would only be about 40 % of the total production. It is also worth mentioning that the increase in productivity at high feed rates is obtained at the expense of operating costs, since the yields on media were generally higher at low perfusion rates (last column of Table 4-1).

On-line Process Supervision of Infection

Figure 4.6 shows the filtered profiles of oxygen uptake rate (OUR), capacitance and fluroescence during growth and infection. The OUR is computed online from the fraction of oxygen in the gas fed to the headspace of the bioreactor. As reported previously for several other cell lines (Konstantinov et al. 1994), the oxygen uptake rate and the capacitance signals are both well correlated to the viable cell concentrations during the growth phase (pre-infection).

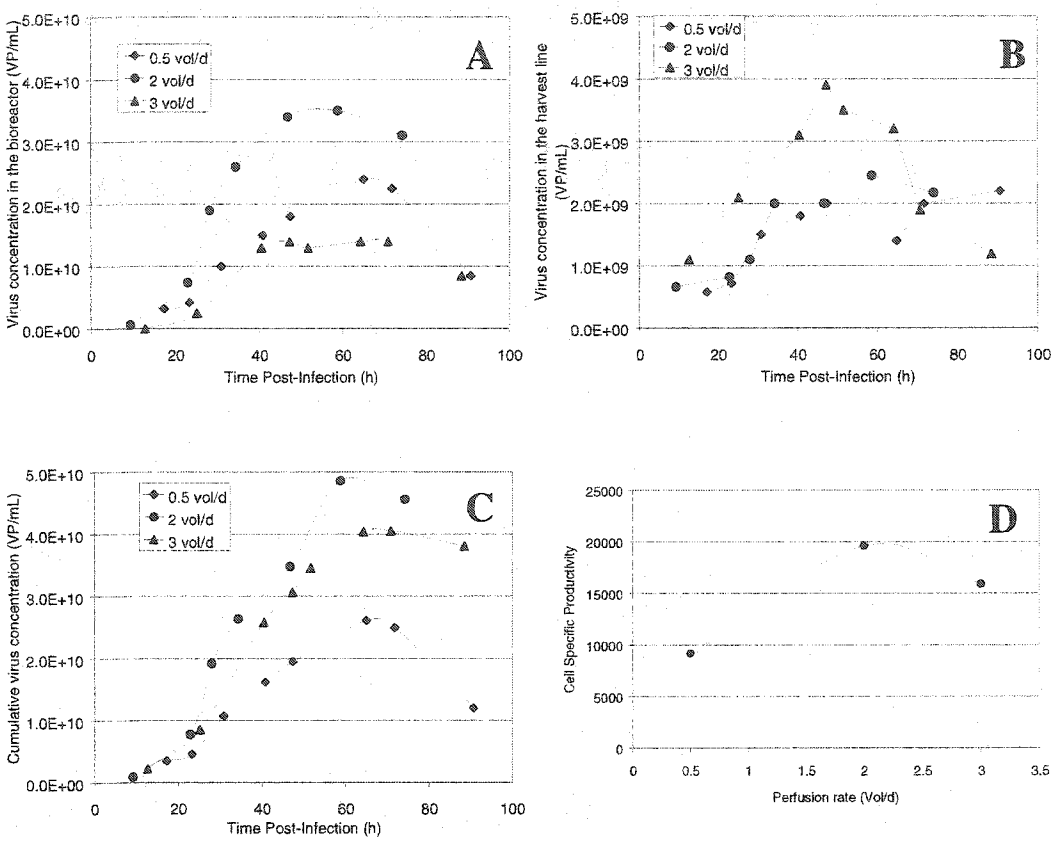


Figure 4.5 Influence of the perfusion rate.

A) Virus concentration inside the bioreactor. B) Virus concentration measured in the harvest line. C) Cumulative virus production taking into account the virus washed out in the harvest line. D) Cell specific productivity as a function of the perfusion rate. The three experiments shown were infected at similar cell densities ($2x10^6$ cells/mL).

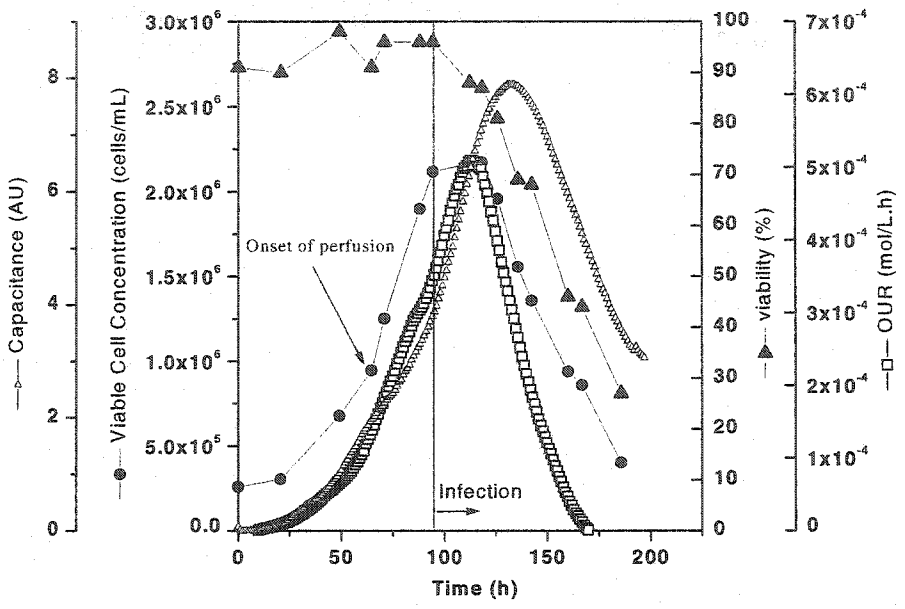


Figure 4.6 Monitoring cell growth during a perfusion culture (experiment #1).

During the growth phase, the cell concentration profile correlates with the oxygen uptake rate and the culture capacitance measurement using a biomass probe.

Upon infection, two important physiological changes occur. An increase in both respiration and biovolume is observed and constitute reliable and early indicators of the infection. As shown in Figure 4.6, even though the viable cell concentrations level off shortly after infection, the oxygen uptake rate continued to increase and go through a maximum at around 20 hours post-infection. As

viral DNA replication progresses, the oxygen demand starts to decrease concomitantly with the cell viability. The relationship between oxygen uptake rate and virus production have been reported (Garnier et al. 1994), especially in insect cells infected with baculovirus (Kamen et al. 1996).. Kussow et al. (1995) showed a similar correlation for porcine virus production using porcine epithelial cells cultivated on microspheres in a stirred tank bioreactor. The virus concentration peak occurred consistently 10 hours after the maxium OUR and led the authors to suggest using the decrease in OUR to determine the time point of virus harvest. Clearly, this strategy would not apply for our system as the maximum virus titer is attained much later (Figure 4.7). Rather, the OUR peak seems to coincide with the beginning of virus production.

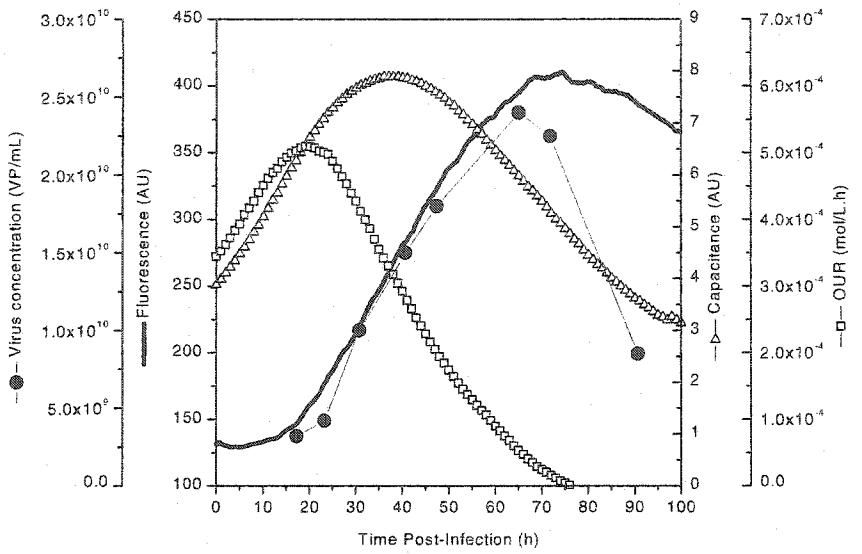


Figure 4.7 Monitoring infection during a perfusion culture (experiment #1).

Following infection, two important physiological changes occur. First, an increased respiration is observed immediately post-infection. Second, during the viral protein synthesis phase, the cell radius increases, leading to an augmentation of the cell volume. As a result, the capacitance measurement, which is an estimation of the biovolume of the culture, reached a maximum 18 hours after the cell concentration and OUR peaks. Both measurements constitute simple and reliable indicators of an infection.

After infection, the capacitance measurement does not correlate with either the viable cell density or the OUR profiles. A maximum is attained approximately 18 hours after the OUR peak (38 hpi). During the infection phase, as the viral

DNA synthesis is initiated, the mean cell volume increases and cell aggregates are disrupted. This translates into an increase in the capacitance signal, which is closely related to the total biovolume of the culture (Zeiser et al. 2000). For example, during the viral protein synthesis phase, the mean cell radius of infected HEK-293 cells can increase from 14 to 16 μm, leading to a 50 % augmentation of the cell volume.

Upon reaching its maximum, the total virus particle concentration profile exhibits a sudden decrease (Figure 4.7). This drop in viral vector concentration measured by HPLC cannot be solely explained by the continuous wash out of product in the harvest line. In fact, a similar behaviour was observed in all the modes of production employed in our laboratory: batch, fed-batch, sequential batch and perfusion processes (Gilbert et al. 2000). Moreover, the decrease rate appears to be correlated with cell viability. This trend has not been discussed in the literature, probably because most of productions are harvested as early as 48 hours post-infection. The causes behind this apparent instability is still under investigation and many factors are under examination such as virus aggregation impairing the detection method, but the most likely explanation is related to the instability of incomplete virus (Vellekamp et al. 2001) .

Due to the unstable nature of the virus in culture, it becomes critical to be able to determine the appropriate harvest time. However, this is a challenging task because real-time measurement of virus concentration in cell culture is difficult and must generally be inferred from other measurements. Since the OUR and capacitance signal maximums occur approximately 45 h and 27 h before the maximum in virus concentration, it is unpractical to use these signals for that purpose. To study the kinetics of infection, the green fluorescence protein (GFP) was used as a marker transgene. A fluorescence probe allows the *in-situ* measurement of intracellular GFP and the GFP contained in the supernatant (Gilbert et al. 2000). Protein synthesis typically starts 10-15 hours post infection, reaches its maximum approximately 10 hours after the peak in viral particle and then the fluorescence measurement decreases as a result of protein wash out in the harvest line. Hence, the maximum GFP concentration, which can be inferred from the fluorescence measurement, cannot be used directly to predict the maximum virus titer. However, as reported by Gilbert et al. (2000) for batch cultures, the production rate of GFP may be used as an indicator to determine the appropriate harvest time. The production rate can easily be computed on-line from the fluorescence measurement. It was shown that the virus titer peak consistently occurs 14 hours after the maximum in GFP production rate. In perfusion cultures, the delay between the maximum GFP production rate and

the peak in virus concentration was approximately 30 hours. As shown in Figure 4.8, this delay can provide a reasonable estimate for the time at which the virus concentration will be maximum.

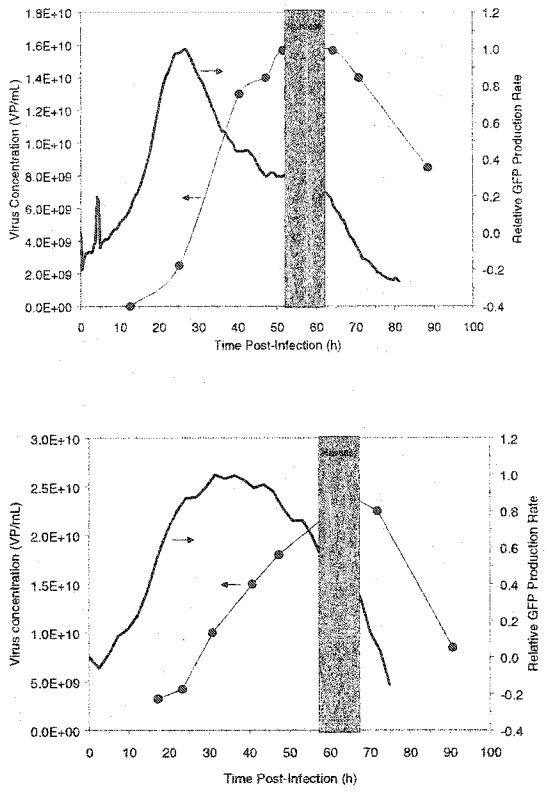


Figure 4.8 Harvest Time determination.

The GFP production rate, estimated from the fluorescence measurement, can be used to determine an appropriate harvest time. The maximum in virus concentration is achieved approximately 30 hours after the peak in GFP production rate. This delay can be used to define a window of operation for the harvest. Using a conservative 5 hours margin is sufficient to provide a

reasonable time span for harvesting. Shown here are the data from two experiments (#1 at the bottom and #7 on top) performed at different perfusion rates (0.5 and 3 vol/d).

Cell Metabolism during Growth and Infection of Perfusion Cultures

All the aforementioned tools can give valuable information regarding the status of infection but none of them can provide *a priori* indication on the productivity of the culture, which is most likely influenced by the physiological state of the cells. Thus, the design of more effective monitoring techniques relies on a better understanding of the metabolism of the cells prior to and during the infection.

The kinetics of nutrient consumption and waste metabolite production prior to and post-infection are summarised in Table 4-2. The values reported for the infection phase correspond to the time when the maximum respiration occurred. We note that the glucose and oxygen uptake rates are higher during the infection phase. This can be related to the increase in cell volume and mass, but also to an increased energy requirement for protein synthesis. These results are consistent with previous reports showing data from batch and fed-batch experiments (Garnier et al. 1994; Iyer et al. 1999; Nadeau et al. 2002; Xie et al. 2002a). The production of lactate is also greater during infection, but the

lactate/glucose molar ratio remained relatively unchanged. In contrast with glucose utilisation, glutamine consumption and ammonia production did not vary significantly prior to and post-infection. This result is similar to the kinetics obtained on infected PERC.6 cells (Xie et al. 2002a), another human cell line used for production of adenoviral vectors.

The production and consumption rates were lower in the case of the culture infected at high cell density (experiment #6). The significant reduction in cell specific productivity is thus correlated with a reduction in metabolic activity. In contrast with all the other experiments, the period of increased respiration following infection lasted less than 24 hours (Table 4-2). The culture is also characterised by a slight decrease of the ratio of lactate/glucose at 24 hours post-infection. This is consistent with a previous report in which the increased lactate production of infected cells was used to assess the progression of virus infection in cultures (Singhvi et al. 1996).

Table 4-2 Specific consumption and production rates in perfusion cultures prior and post-infection.

#Exp	1		3		4		6		7	
Perfusion rate (vol/d)	0.5		1		2		2		3	
Density at infection (cells/mL)	$2.1x10^6$		$4x10^6$		$2.4x10^6$		$5.8x10^6$		$2.6x10^6$	
Specific Productivity (VP/cell)	9200		11 300		19 600		3800		15 900	
Specific consumption or production rates (10^9 mmol/cell.h)										
	growth	infection	growth	infection	growth	infection	growth	infection	growth	infection
qGlu	0.15	0.28	0.18	0.21	0.15	0.27	0.09	0.12	0.16	0.22
qLac	0.25	0.47	0.26	0.40	0.30	0.40	0.14	0.18	0.35	0.43
qGln	0.028	0.035	0.034	0.034	0.024	0.043	0.02	0.023	0.03	0.043
qNH_3	0.011	0.017	0.016	0.015	0.025	0.028	n-a	n-a	0.021	0.02
qO2	0.18	0.25	0.17	0.21	0.20	0.27	0.16	0.16	0.15	0.20
Molar ratios										
$Y_{Lac/Glu}$	1.6	1.8	1.5	1.9	2	1.5	1.5	1.5	2.2	2
$Y_{NH3/Gln}$	0.4	0.5	0.5	0.5	1	0.7	n-a	n-a	0.7	0.5
Residual Concentrations (mM)										
Glu	16.2	11.8	18.9	13.6	19.5	15.3	14.2	13.7	25.0	24.2
Lac	20.7	26.1	14.7	26.7	8.7	13.5	18.8	24.4	6.6	8.1
Gln (mM)	4.3	4.0	4.6	3.9	4.3	3.7	2.8	2.4	6.1	5.9
NH_3 (mM)	1.4	1.56	0.99	0.99	0.98	1.1	n-a	n-a	0.78	0.76

In general, the kinetics are relatively unaffected by the perfusion rate. Only a slight increase in the lactate/glucose molar ratio is observed for the highest perfusion rate, probably due to a higher concentration of glucose. Despite the little differences in productivity obtained in the other perfusion cultures, the rates remained about the same. The culture with the highest product yield showed a slightly higher ratio of ammonium/glutamine but since only minor variations of glutamine uptake rate were observed, this is likely due to the generation of ammonium by the oxydation of other amino acids in the Krebs cycle.

As expected, the highest lactate and ammonia residual concentrations were observed at the lowest perfusion rate tested. Previous studies have shown that, during the infection of batch cultures, lactate concentration over 20 mM had a detrimental effect on cell viability and ammonia was found to inhibit the growth of HEK-293 cells in the range of 1 to 2.5 mM (Hassel et al. 1990; Nadeau et al. 1996). Different feeding strategies have been investigated to maintain glucose and glutamine at low levels to reduce the production of lactate (Siegwart et al. 1999) and ammonia (Lee et al. 2003) and to allow infection at higher cell densities. Experiment #1 and #3 were performed with different operating conditions (perfusion rate, density at infection) but showed similar

residual lactate concentrations and yielded similar cell specific productivity. However, when comparing experiment #4 and #7, which led to similar productivities, we note that a further reduction in waste concentration did not translate into improvements.

4.2.5 Conclusions

The present study showed that perfusion cultures can be a useful strategy to eliminate, at least in part, the limitations observed in batch operations. With a perfusion rate of 2 vol/d, cultures can be infected at cell densities in the range of 2.4 to to $3x10^6$ cells/mL without a loss in specific productivity, while increasing volumetric productivities up to five-fold. It is expected that further increases in cell concentration at infection is likely to increase the maximum virus concentration achieved, but at the expense of greater media consumption and assuming that the cell retention efficiency can be maintained at high perfusion rate without impairing the viability of the cells by increased shear stress.

We have also demonstrated that the combination of the OUR, fluorescence and capacitance probe signals allowed real-time monitoring of the status of the infection. However, no reliable method is yet available to assess the

productivity of a culture on-line. It was established that a reduced metabolic activity led to a significant reduction in specific productivity, which confirms that the physiological state of the cell at the time of infection is a determining factor. Future work will explore the use of metabolic flux analysis to get more insight into the cell metabolism at the intracellular level. In turn, this will permit the development of online estimators of the physiological state of the cells and allow for better control of the process.

Acknowledgements

The authors thank Alice Bernier, Danielle Jacob, Marc Aucoin and Louis Bisson for their contribution to this work. Financial support from the National Science and Engineering the Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds Québécois d'Aide à la Recherche (FCAR) is gratefully acknowledged.

4.2.6 References

Banik G, Heath CA. 1995. «Hybridoma growth and antibody production as a function of cell density and specific growth rate in perfusion culture». *Biotechnol. Bioeng.* 48:289-300.

Bibila TA, Robinson DK. 1995. «In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production». *Biotechnol. Prog.* 11:1-13.

Chu L, Robinson DK. 2001. «Industrial choices for protein production by large-scale cell culture». *Curr. Opin. Biotechnol* 12:180-187.

Cote J, Bourget L, Garnier A, Kamen A. 1997. «Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by GFP-expression monitoring». *Biotechnol. Prog.* 13:709-714.

Cote J, Garnier A, Massie B, Kamen A. 1998. «Serum-free froduction of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells». *Biotechnol. Bioeng.* 59:567-575.

Frazzati-Gallina NM, Paoli RL, Mourao-fuches RM, Jorge SAC, Pereira CA. 2001. «Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers». *J. of Biotechnol.* 92:67-72.

Garnier A, Cote J, Nadeau I, Kamen A, Massie B. 1994. «Scale-Up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells». *Cytotechnol.* 15:145-155.

Gilbert P-A, Garnier A, Jacob D, Kamen A. 2000. «On-line measurement of Green Fluorescent Protein (GFP) Fluorescence for the Monitoring of Recombinant Adenovirus Production». *Biotechnol. Lett.* 22:561-567.

Gorenflo V, Angepat S, Bowen BD, Piret JM. 2003. «Optimization of an acoustic cell filter with a novel air-backflush system». *Biotechnol. Prog.* 19:30-36.

Gorenflo VM, Smith L, Dedinsky B, Persson B, Piret JM. 2002. «Scale-up and optimization of an acoustic filter for 200 L/day perfusion of CHO cell culture». *Biotechnol. Bioeng.* 80:438-444.

Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn MR. 1977. «Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5». *J. Gen. Virol.* 36:59-72.

Hassel T, Gleave S, Butler M. 1990. «Growth inhibition in animal cell culture». *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30:29-40.

Iyer P, Ostrove JM, Vacante D. 1999. «Comparison of manufacturing techniques for adenovirus production». *Cytotechnol.* 30:169-172.

Kallel H, Jouini A, Majoul S, Rourou S. 2002. «Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells». *J. of biotechnol.* 95:195-204.

Kamen A, Bedard C, Tom R, Perret S, Jardin B. 1996. «Online monitoring of respiration in recombinant baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures». *Biotechnol. Bioeng.* 50:36-48.

Kamen A, Tom R, Caron AW, Chavarie C, Massie B, Archambault J. 1991. «Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor». *Biotechnol. Bioeng.* 38:619-628.

Klyushnichenko V, Bernier A, Kamen A, Harmsen E. 2000. «Improved HPLC method in the analysis of adenovirus particles». *J. of Chromatogr B.* 755:27-36.

Konstantinov K, Chuppa S, Sajan E, Tsai Y, Yoon S, Golini F. 1994. «Real-time biomass concentration monitoring in animal cell cultures». *Trends Biotechnol* 12(324-333).

Kussow CM, Weichang Z, Gryte DM, Hu W-S. 1995. «Monitoring of mammalian cell growth and virus production process using on-line oxygen uptake rate measurement». *Enzyme Microb. Technol.* 17:779-783.

Lee YY, Yap MGS, Hu WS, Wong KTK. 2003. «Low-glutamine fed-batch cultures of 293-HEK serum-free suspension cells for adenovirus production». *Biotechnol. Prog.* 19:501-509.

Mercille S, Johnson M, Lanthier S, Kamen AA, Massie B. 2000. «Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates». *Biotechnol. Bioeng.* 67:435-450.

Merten OW. 2000. «Constructive improvements of the ultrasonic separation device ADI 1015». *Cytotechnol.* 34:175-179.

Merten OW, Manuguerra JC, Hannoun C, van der Welf S. 1999. «Production of influenza virus in serum-free mammalian cell cultures».*Inactivated influenza vaccines prepared in cell cultures.* Brown F, Robertson JS, Schild GC, Wood JM. Basel: Karger. p 23-27.

Mittereder N, March KL, Trapnell BC. 1996. «Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy». *J. of Virology* 70(11):7498-7509.

Nadeau I, Garnier A, Cote J, Massie B, Chavarie C, Kamen A. 1996. «Production with the human adenovirus/293S expression system using fed-batch strategies». *Biotechnol. Bioeng.* 51:613-623.

Nadeau I, Gilbert PA, Jacob D, Perrier M, Kamen A. 2002. «Low-protein medium affects the 293SF central metabolism during growth and infection with adenovirus». *Biotechnol. Bioeng.* 77:91-104.

Nadeau I, Kamen A. 2003. «Production of adenovirus vector for gene therapy». *Biotechnol. Adv.* 20:475-489.

Perrin P, Madhusudana S, Gontier-Jallet C, Petres S, Tordo N, Merten O-W. 1995. «An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 cell suspension culture process: use of serum-free medium and perfusion-reactor system». *Vaccine* 13(13):1244-1250.

Siegwart P, Cote J, Male K, Luong JHT, Perrier M, Kamen A. 1999. «Adaptive control at low glucose concentration of HEK-293 cell serum-free cultures». *Biotechnol. Prog.* 15:608-616.

Singhvi R, Markusen JF, Ky B, Horvath BJ, Aunins JG. 1996. «Assessment of virus infection in cultured cells using metabolic monitoring». *Cytotechnol* 22:79-85.

Trampler F, Sonderhoff SA, Phylis WSP, Kilburn DG, Piret JM. 1994. «Acoustic cell filter for high density perfusion culture of hybridoma cells». *Bio/Technology* 12(March):281-284.

Vellekamp G, Porter FW, Sutjipto S, Cutler C, Bondoc L, Liu, Y-H., wylie D, Cannon-Carlson S, Tang JT, Frei A, Voloch M and others. 2001. «Empty capsids in column-purified recombinant adenovirus preparations». *Hum Gene Ther* 12:1923-1936.

Voisard D, Meuwly F, Ruffieux P-A, Baer G, Kadouri A. 2003. «Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian Cells». *Biotechnol. Bioeng.* 82:751-765.

Wong K, Guardia MJ, Lee S, Hu WS. 1999. «Adenovirus vector production in 293 fed-batch cultures».*Animal cell technology: products from cells, cells as products*. Bernard A, Griffiths B, Noé W, Wurm F. Dordrecht: Kluwer Academic. p 367-369.

Xie L, Pilbrough W, Metallo C, Zhong T, Pikus L, Leung J, Aunins JG, Zhou W. 2002. «Serum-free suspension cultivation of PER.C6 cells and recombinant adenovirus production under different pH conditions». *Biotechnol. Bioeng.* 80:569-579.

Zeiser A, Elias C, Voyer R, Jardin B, Kamen A. 2000. «On-line monitoring of physiological parameters of insect cell cultures during the growth and infection process». *Biotechnol. Prog.* 16:803-808.

Zhang J, Collins A, Chen M, Knyazev I, Gentz R. 1998. «High-density perfusion culture of insect cells with a biosep ultrasonic filter». *Biotechnol. Bioeng.* 59:351-369.

4.3 Résultats complémentaires

4.3.1 Cultures effectuées sous d'autres conditions opératoires

Des expériences supplémentaires ont été menées sous des conditions opératoires différentes. Ces nouveaux résultats confirment les tendances évoquées précédemment : en augmentant le taux de perfusion on parvient à accroître la productivité pour une même densité à l'infection (expériences #8 et #9). En outre, en ajustant le débit d'alimentation en fonction de la concentration cellulaire, une culture a pu être infectée à $5x10^6$ cellules/mL (expérience #10).

Cependant, ces résultats ne peuvent être directement comparés avec les résultats antérieurs. En effet, une réduction systématique des niveaux de production a été observée, tant dans les perfusions que dans les contrôles en flacons menés en parallèle lors de chaque nouvelle expérience. Ces expériences ont été conduites plusieurs mois aprés les précédentes. La cause exacte de cette réduction n'a pu être identifiée, elle est sans doute le résultat d'un ou de plusieurs facteurs : l'âge du stock viral, l'effet d'un dégel prolongé impromptu (résultat d'une défaillance technique), une modification au niveau de la

méthode analytique de mesure (remplacement de colonne du HPLC pour la mesure des particules totales), variation entre les lots d'un même milieu de culture, âge des cellules, etc.

A titre comparatif, les résultats ont été exprimés sur une base relative, par rapport aux niveaux moyens obtenus dans les contrôles infectés à $0.5x10^6$ cellules/mL (de l'ordre de 15 600 VP/cell pour la 1ère série d'expériences et 8500 VP/cell pour la seconde)

Tableau 4-3 Résultats des expériences supplémentaires

# Expérience	Taux de perfusion (vol/j)	Concentration cellulaire à l'infection (cell/mL)	Productivité (VP/cell)	Productivité Relative
8	0.5	$4x10^6$	3000	0.35
9	2	$4x10^6$	6800	0.8
10	Variable (0.5 à 4)	$5.1x10^6$	7220	0.85
Expériences antérieures				
1	0.5	$2.1x10^6$	9200	0.59
2	1	$2.7x10^6$	3600	0.23
3	1	$4x10^6$	11 300	0.72
4	2	$2.4x10^6$	19 600	1.25
5	2	$3x10^6$	16 200	1.04
6	2	$5.8x10^6$	3800	0.24
7	3	$2.6x10^6$	15 900	1.02

4.3.2 Infectivité du virus produit

Les données rapportées jusqu'à maintenant l'étaient en terme de particules virales totales. Pour des raisons encore mal comprises dans la littérature, de ce total, seulement un certain nombre ont la capacité d'infecter des cellules. On pense que les autres seraient en fait des virus dont l'assemblage serait incomplet (Vellekamp et al. 2001). Il faut donc établir une distinction entre le virus « non-infectieux » et le virus « infectieux ». Bien qu'aucune méthode ne permette de les séparer, seuls les virus infectieux sont efficaces pour le transfert de gènes dans les applications thérapeutiques et il est donc primordial de quantifier l'infectivité du virus produit. Même si la bioactivité du virus dépend des méthodes et des conditions de quantification utilisées, le pourcentage de virus infectieux varie généralement de 20 à 30 % du nombre de particules totales (Mittereder et al. 1996). Un essai de transfert de gènes a donc été effectué et le profil de particules infectieuses est illustré dans la Figure 4.9.

On constate que les maximums de particules totales et infectieuses coincident. Jusqu'à l'atteinte de ce maximum, le pourcentage de particules infectieuses est relativement constant autour de 30 %. Cette valeur est similaire aux résultats

obtenus en mode batch ce qui établit que le mode perfusion n'a pas d'effet néfaste sur l'infectivité du virus. On observe également qu'au moment où la concentration de particules totales chute, la concentration de virus infectieux semble beaucoup plus stable (la légère baisse étant principalement attribuable au phénomène de dilution). Cette tendance, également observée en batch, suggère qu'en récoltant plus tard, on puisse obtenir un stock viral avec une proportion plus grande de particules infectieuses. Ceci demande à être étudié plus en détails, car cela pourait avoir des répercussions assez importantes sur l'éventuelle utilisation du produit en thérapie génique, la réponse immunitaire s'en trouvant diminuée.

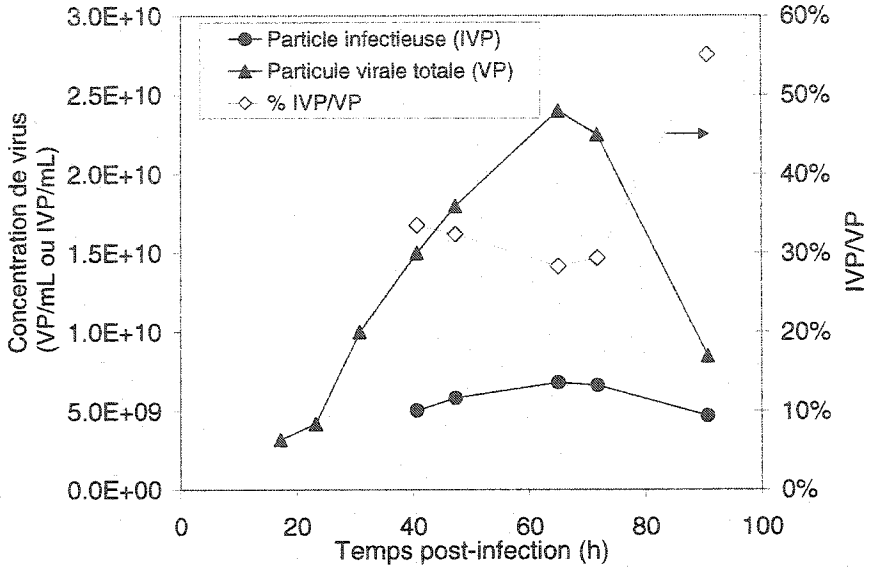


Figure 4.9 Profil des particules virales totales et infectieuses durant une production

CHAPITRE 5: CARACTÉRISATION DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES

Les résultats rapportés dans le chapitre précédent démontrent l'influence du taux d'alimentation et de la concentration de cellules à l'infection sur la productivité spécifique des cellules. Afin d'optimiser les productions en déterminant les conditions opératoires appropriées, il s'avère essentiel de mieux comprendre l'impact de ces deux paramètres sur les cultures. L'hypothèse de recherche est que les conditions d'opérations et environnementales au cours d'une culture déterminent l'état physiologique des cellules, lequel influence ultimement le niveau de productivité.

Pour caractériser l'état physiologique des cellules, la technique d'analyse des flux métaboliques a été employée afin d'évaluer quantitativement les différences au niveau des réactions biochimiques intracellulaires. L'emploi de cette approche se justifie d'une part par la richesse de l'information qu'elle procure et d'autre part par la disponibilité d'un modèle métabolique pour les cellules utilisées dans le cadre de ce travail.

5.1 Modèle Métabolique

Une adaptation du modèle développé et validé par Nadeau *et al.* (2000a) spécifiquement pour les cellules HEK-293 a été utilisée pour l'analyse des flux métaboliques. Le modèle est constitué de 40 flux et comporte principalement les voies cataboliques du glucose, de la glutamine, de 17 autres acides aminés ainsi que les taux de biosynthèse.

Les principales modifications apportées au modèle original sont les suivantes :

1) Le milieu de culture utilisé étant pauvre en protéines, l'apport de ces-dernières comme source d'acides aminés s'avère négligeable et a été éliminé.

2) La concentration de proline pouvant être désormais déterminée, ce composé est ajouté comme mesure additionnelle pour consolider les calculs.

3) La voie de dégradation de la glutamine en acide pyrrolidone carboxylique et la voie de conversion du glutamate en sérine donnant lieu à des taux négligeables et/ou négatifs ne sont plus considérées dans le modèle.

Tableau 5-1 Liste des réactions biochimiques du réseau métabolique

1 Glc + ATP → Fruct6P
2 Fruct6P + ATP → 2 GAP
3 GAP → Pyr + 2 ATP + NADH + H^+
4 Pyr + NADH + H^+ → Lac
5 mPyr + CoA → ACCoA + NADH + CO_2 + H^+
6 Pyr + Glu → Ala + ∝KG
7 OAA + Glu → Asp + ∝KG
8 mGln + H_2O → mGlu + NH_3
9 2 Gln +5/4 Asp + Rib5P + ½ Gly + 27/4 ATP + 5/8 NADPH → ADN | ARN + ¾ NADH + ¾ Fum + 2 Glu
10 mMal + 2ATP → mPyr +CO_2 + NADPH + H^+
11 Asp + Gln + ATP → Asn + Glu
12 Glu + ATP + 2 NADPH +2 H^+→ Pro
13 2 Gly → Ser + NH_3
14 G6P + ATP → 1/3 Rib5P + 2/3 Xu5P + 2 NADPH + H^+ + CO_2
15 R5P + 2 Xu5P → 2 Fruct6P + GAP
16 2 (9 Cit + 17 ATP + 9 CoA + 16 NADPH) → AcOLE + 18 OAA
17 Extracellular Proteins → ΣAA
18 ΣAA→ Intracellular Proteins
19 Lys + 2 m∝KG + NADPH → 2 AcCoA + 2 CO_2 + 4 NADH + 3 H^+ + $FADH_2$ + 2 mGlu
20 Leu + m∝KG + ATP → 3 AcCoA + mGlu + CO_2 + NADH + H^+ + $FADH_2$
21 Ile + m∝KG + ATP → SuCoA + AcCoA + CO2 + 2 NADH + 2 H^+ +$FADH_2$ + mGlu
22 Thr → CO_2 + 2 NADH + 2 H^+ + $FADH_2$ + NH_3 + mPyr
23 Val + m∝KG + ATP → SuCoA + 3 NADH + H^+ + $FADH_2$ + 2CO_2 + mGlu
24 Met + Ser + 2 ATP → Cte + SucCoA + NADH + H^+ + CO_2 + NH_3
25 Phe + O_2 + NADPH + H^+ → Tyr
26 Tyr + m∝KG + 2O_2 → Fum + 2 AcCoA +m Glu
27 Arg + m∝KG → mGlu + NADH + H^+
28 His → mGlu + NH_3
29 mOAA + AcCoA → Cit
30 Cit → m∝KG + CO_2 + NAPH + H^+
31 m∝KG → SuCoA + NADH + H^+ + CO_2
32 SuCoA → Fum + ATP + $FADH_2$
33 Fum → mMal
34 mMal → mOAA + NADH + H^+
35 NADH + ½ O_2 → 3 ATP
36 Pyr → mPyr
37 Glu + mAsp → mGlu +Asp
38 Gln → mGln
39 mMal + ∝KG → Mal + m∝KG
40 mGlu + mOAA → mAsp + m∝KG

5.2 Calcul des flux intracellulaires

Par un bilan massique autour d'une cellule, on obtient l'équation suivante pour les composés (S):

$$\frac{dS}{dt} = KF + DS + Q - P$$

où S désigne la concentration intracellulaire des métabolites, K est la matrice des coefficients stœchiométriques, F est le vecteur des flux intracellulaires, D.S est le terme de dilution dû aux variations du volume cellulaire, Q est le vecteur des taux de consommations et P, le vecteur des taux de production.

En invoquant l'hypothèse de régime pseudo-stationnaire (Zupke et Stephanopoulos 1994a), il vient:

$$\frac{dS}{dt} = 0$$

En outre, le terme de dilution est assumé négligeable.

$$D \cdot S = 0$$

et l'équation de bilan se simplifie donc à :

$$KF = (P - Q)$$

Lorsque le nombre de taux mesurés est égal au nombre de réactions biochimiques, le système est dit « déterminé » et les taux de réactions inconnus s'obtiennent par une simple inversion de matrice selon:

$$F = K^{-1}(P - Q)$$

En général, il est souhaitable que le nombre de mesures soit supérieur au nombre minimum de réactions requis pour le calcul des flux. Ceci permet de réduire l'erreur expérimentale et permet de détecter la présence d'erreurs grossières dans les données. On dit du système qu'il est alors « sur-déterminé » et la solution s'obtient par une méthode de moindres-carrés. Cependant, comme elle contient des mesures redondantes, la matrice K n'est plus carrée et on ne peut pas en déterminer l'inverse. Toutefois, la décomposition en valeurs singulières permet de définir un *pseudo-inverse* pour des matrices rectangulaires ou des matrices carrées singulières.

$$F = (K^T K)^{-1} K^T (P - Q)$$

Le terme $(K^T K)^{-1} K^T$ est appelé inverse généralisé ou inverse de « Moore-Penrose ».

La matrice K étant de dimensions 46x40, pour solutionner le problème il faut obtenir les taux spécifiques de consommation et de production de 46 composantes. Toutefois, un certain nombre de ces composantes étant exclusivement intracellulaires, leur taux net de production/consommation est égal à 0. Cela réduit la tâche à l'obtention de 36 mesures, plus une mesure additionnelle (celle du CO_2 produit) servant à valider la démarche en comparant avec la valeur prédite par le modèle.

5.3 Pondération des mesures

La solution faisant appel à la méthode du pseudo-inverse est obtenue en conférant un poids égal à toutes les valeurs de taux mesurés. Or, les taux sont obtenus à partir de concentrations mesurées par différentes méthodes analytiques (HPLC, test enzymatique, etc) et il est donc raisonnable de penser que l'incertitude rattachée à chacune des valeurs soit différente. Par exemple, le

pourcentage d'erreur sur la mesure des concentrations d'acides aminés par HPLC est en moyenne inférieur à 5 %. En comparaison, la détermination du poids sec qui intervient dans le calcul de la composition des cellules est relativement imprécise, le pourcentage d'erreur pouvant être de 30 %. Dès lors, il est plus approprié de résoudre par une méthode de moindres carrés pondérés, de façon à conférer plus de poids aux mesures qui sont les plus précises. On peut le faire en pondérant les taux par leurs variances respectives selon :

$$F = (K^T \psi^{-1} K)^{-1} K^T \psi^{-1} (P - Q)$$

où ψ est la matrice de variance-covariance du vecteur de mesures *(P-Q)*. Comme on dispose généralement de peu d'information sur le bruit de mesure, cette matrice ne peut généralement pas être spécifiée (Stephanopoulos et al. 1998). On pose l'hypothèse que les mesures ne sont pas corrélées et, en négligeant les covariances, ψ devient alors une matrice diagonale (dont les éléments sont les variances de chacune des mesures).

5.4 Erreurs associées au calcul des flux

Un aspect souvent ignoré dans le calcul des flux est l'évaluation des erreurs associées à ces calculs. Il est pourtant très important d'en tenir compte pour interpréter les résultats. En effet, la valeur de certains flux étant relativement faible en comparaison avec d'autres, il se peut que des tendances apparentes ne soient dues qu'au bruit de mesure.

Les erreurs associées aux flux peuvent provenir de deux sources. La première source peut concerner la modélisation, c'est à dire la définition du réseau de réactions biochimiques. Les modèles étant des simplifications, il est possible que l'oubli de certaines voies métaboliques existantes entraîne des résultats erronés. Pour réduire cette source d'erreur, il faut améliorer le modèle par le biais de stratégies de marquage (Mancuso et al. 1994; Martinelle et al. 1998; Sharfstein et al. 1994; Zupke et Stephanopoulos 1994b), permettant de confirmer expérimentalement les hypothèses formulées lors de la définition du modèle.

La deuxième source d'erreur est liée à la détermination des taux spécifiques de consommation et de production, qui constituent les entrées du modèle. C'est un

aspect non-négligeable en raison de la variabilité inhérente aux bioprocédés, de l'imprécision de certaines méthodes de mesures et du faible nombre de données disponibles.

Pour estimer l'incertitude attachée aux flux, on pondère le système par les variances des mesures :

$$D_{ij} = \frac{K_{ij}}{\sqrt{\sigma_i}} \qquad b = \frac{(P-Q)_i}{\sqrt{\sigma_i}}$$

Ce qui transforme la méthode des moindres carrés pondérés en une forme équivalente non-pondérée :

$$F = \left(D^T D\right)^{-1} D^T b$$

La matrice $(D^T D)^{-1}$ est la matrice de variance-covariance du vecteur de flux (F). La variance d'un flux F_I est alors donnée par le $i^{ème}$ élément de la diagonale de cette matrice.

5.5 Directionnalité des flux

Dans l'écriture du modèle métabolique, un sens a été assumé pour l'ensemble des réactions biochimiques. Comme un certain nombre de réactions peuvent procéder dans les deux sens, il est donc possible d'obtenir des flux négatifs dans la solution. Toutefois, la plupart des voies métaboliques sont irréversibles. Pour prendre en compte que certaines solutions ne sont pas admissibles, ou, de façon équivalente, pour tenir compte de la « directionnalité » des flux, il faut ajouter des contraintes d'inégalité à la définition du système à résoudre. Obtenir la solution optimale (au sens des moindres carrés) devient alors un problème d'optimisation. Basée sur une méthode de points intérieurs et de région de confiance, la fonction « lsqlin » de Matlab permet de solutionner ce type de problème.

5.6 Détection d'erreurs de mesure grossières

Avant de procéder au calcul des flux, il est primordial de s'assurer qu'aucune erreur grossière de mesure ne soit présente dans les données. Cela peut se faire

par le biais d'équations de bilan redondantes et d'un test statistique, suivant la méthodologie proposée par Bonarius et al. (1999). Deux bilans de matières élémentaires sur le carbone et l'azote sont utilisés à cette fin.

Soit A_{NC} une matrice contenant la composition en atomes de carbone et d'azote des composés mesurés contenus dans le vecteur (P-Q). Dans une situation idéale où les mesures seraient parfaites, on aurait que :

$$A_{NC} \cdot (P - Q) = 0$$

En pratique toutefois, du fait de l'erreur expérimentale, ce produit n'est jamais nul et on obtient plutôt des résidus (ε):

$$\varepsilon = A_{NC} \cdot (P - Q)$$

Si les résidus sont « significativement différents de zéro », c'est qu'il y a présence d'une erreur grossière. Pour quantifier l'expression «significativement différent de zéro», on a recours à un test statistique faisant intervenir une fonction h, calculée suivant :

$$h = \varepsilon^T \varphi^{-1} \varepsilon$$

où φ est la matrice de covariance des résidus qui s'obtient à partir de la matrice de covariance des mesures selon :

$$\varphi = A_{NC}{}^{T} \psi A_{NC}$$

La fonction *h* suit une distribution χ^2 et le degré de liberté est déterminé par le nombre d'équations redondantes. Pour un système à deux équations (bilans sur C et N) et un intervalle de confiance de 90%, *h* doit être plus petit ou égal à 4.61. On peut dès lors conclure que la série de données testée ne contient pas d'erreur grossière.

Avec deux équations redondantes, lorsque la fonction *h* est supérieure à 4.61, on est même en mesure de localiser la source d'erreur par une méthode d'élimination séquentielle (Stephanopoulos et al. 1998). Si le retrait d'un composé se traduit par une baisse significative du critère *h*, cela signifie que c'est la mesure de ce composé qui est erronée.

CHAPITRE 6: L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES HEK-293 EN TANT QUE FACTEUR DÉTERMINANT POUR LA PRODUCTIVITÉ DE CULTURES INFECTÉES AVEC UN ADÉNOVIRUS

6.1 Présentation de l'article

Ce chapitre reprend l'article intitulé « ***HEK-293 cells physiological state as a determinant of adenoviral vector productivity in perfusion cultures*** ». Cet article a été soumis à la revue Biotechnology Progress. Dans le chapitre précédent, il a été démontré que la productivité des cellules est largement dictée par les conditions opératoires qui prévalent au cours de leur culture. Le but de cette étude est de mieux caractériser le métabolisme cellulaire sous ces différentes conditions opératoires afin d'élucider les facteurs déterminants pour la productivité d'une culture infectée. Cette section sert également de fondation pour les derniers chapitres de cette thèse en établissant quelles sont les variables critiques à considérer pour effectuer un suivi efficace du procédé.

Pour ce faire, la technique d'analyse des flux métaboliques a été employée à partir d'un modèle biochimique des cellules HEK-293, développé lors de travaux antérieurs. Ce modèle implique 46 composants et comporte 40 réactions, notamment le catabolisme du glucose et de 18 acides aminés, ainsi que les principaux taux biosynthétiques.

De l'analyse des résultats, il ressort que pour un même taux de perfusion, une culture infectée à plus faible densité cellulaire présente des flux glycolytiques et dans le cycle de Krebs plus élevés qu'une culture infectée à haute concentration cellulaire. En bout de ligne, ceci se traduit par une productivité accrue. On constate également que les infections présentant un bon rendement sont caractérisées par une augmentation significative du métabolisme oxydatif en post-infection. A l'inverse, une culture ayant une production spécifique faible présente une réduction de l'activité dans le cycle de Krebs.

Les résultats démontrent également qu'en ajustant le régime d'alimentation, des états physiologiques similaires peuvent être obtenus pour des concentrations cellulaires différentes, et conduire à des productivités spécifiques très semblables. Enfin, il est établi que le taux de production d'ATP s'avère un bon indicateur physiologique reflétant l'activité métabolique globale de la cellule. Ce

paramètre pourrait donc servir pour les fins de suivi et éventuellement de contrôle du bioprocédé.

6.2 HEK-293 cells Physiological state as a determinant of adenoviral vector productivity in perfusion cultures

O. Henry[1,2], M. Perrier[2], A. Kamen[1]

[1]Institut de Recherche en Biotechnologie, CNRC, 6100 avenue Royalmount, Montréal, Québec H4P 2R2, Canada;

[2]École Polytechnique de Montréal, Campus de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

6.2.1 Abstract

Recombinant adenovirus is one of the most common vectors used for the delivery of therapeutic genes. To meet increasing needs of adenovirus vectors for gene therapy programs, development of efficient and reproducible production processes are required. However, productions of adenovirus vectors that maintain a high specific productivity in batch operation are limited to low cell densities in the range of $5x10^5$ cells/mL. The use of perfusion cultures has been explored to increase volumetric productivities by eliminating at least in

part the limitations and allowing infection at greater cell concentrations. In an effort to elucidate the determining factors of a productive infection, experiments performed at different feed rates and cell densities were compared using metabolic flux analysis. The model used was composed of 40 fluxes that involve the main glycolytic, glutaminolytic, amino acids and biosynthetic pathways. The analysis revealed that productive infections are characterised by higher glycolytic and Krebs cycle fluxes at the time of infection. Moreover, following infection, a good productivity is characterised by an enhanced oxidative metabolism whereas, in contrast, a low yield production showed a reduction in TCA activity. Our findings demonstrate the importance of maintaining the cell in a desirable physiological state to ensure a productive infection. We also show the ability of an estimated ATP production rate to reflect the overall metabolic activity of the cells. Moreover, our results suggest that cultures infected at a higher cell density can be kept in a similar physiological state by manipulating the perfusion rate, and yield similar productivity.

6.2.2 Introduction

Adenovirus constitute important gene delivery vehicles in the field of gene therapy and are currently involved in one-third of the protocols, mainly for the treatment of cancer. To meet the increasing demand of clinical trials, the development of high-yield processes is necessary. One of the major challenge of adenoviral vector production lies in the fact that high cell specific productivities are only maintained for infection at low cell densities (typically under $1x10^6$ cells/mL) (Nadeau et Kamen 2003). Efforts to increase volumetric productivities have aimed at designing new feeding strategies to allow productive infection at higher cell concentrations. Substantial improvements were achieved with sequential batch (Frazzati-Gallina et al. 2001; Garnier et al. 1994; Iyer et al. 1999; Merten et al. 1999), fed-batch (Lee et al. 2003; Nadeau et al. 1996; Wong et al. 1999) and perfusion (Kallel et al. 2002; Perrin et al. 1995) strategies. This suggests that the decreased specific productivity at high cell concentrations is due to nutrient depletion or waste inhibition, though the exact nature of these limitations remains largely unknown.

The intrinsic transient nature of an infection in the context of batch, fed-batch and perfusion modes is a key aspect to consider. Cells are exposed to ever-changing environmental conditions (cell, nutrient, waste and product concentrations), which affect their metabolism. The timing for infecting a culture is thus of critical importance. Consequently, the design and operation of an efficient process must aim at maintaining or driving the cells towards a "favourable physiological state" before proceeding with the infection. The difficulty arises in establishing a quantitative description of this physiological status by a set of several process variables providing relevant information. In the past, the physiological state has been inferred indirectly, from external variables outside the cells. Cell concentration, viability, oxygen uptake rate, carbon evolution rate, glucose and amino acids uptake, lactate and ammonia production rates are commonly used to evaluate the metabolic activity of mammalian cells in culture. However useful, the information derived solely from extracellular variables is only a partial indication of the physiological state of the cells.

In the context of viral vector production, various on-line and off-line methods have been investigated to assess the status of an infection. Increased oxygen uptake rate during virus production have been reported (Garnier et al. 1994;

Kussow et al. 1995). A fluorescence probe allowed Gilbert *et al.* (2000) to determine the harvest time during an infection by an adenovirus containing the gene for GFP. Also, increased glucose uptake and lactate production rates were noted following infection (Garnier et al. 1994; Iyer et al. 1999; Nadeau et al. 2002; Xie et al. 2002a). All the aforementioned methods can give valuable information regarding the kinetics of infection but none of them can provide *a priori* indication on the productivity of the culture.

To take a step further, one needs to include information at the intracellular level that may unravel how metabolic pathways influence production. Knowledge of intracellular fluxes is crucial for the understanding of cell metabolism, but the challenge resides in the large number of biochemical reactions involved and the low concentrations of many intermediates. However, given metabolic network stoichiometry and provided that a sufficient number of accurate measurements is available, the intracellular fluxes can be evaluated using mass-balancing techniques. Analysing the flux distribution in the metabolic network can help to determine the important substrate requirements and identify the pathways that limit growth and production.

Metabolic flux analysis has been used to characterize the effect on cell metabolism of various environmental conditions: level of dissolved oxygen (Zupke et al. 1995), hydrolysate concentrations, (Bonarius et al. 1996; Nyberg et al. 1999), high osmotic pressure (Lin et al. 1999), ammonia additions (Bonarius et al. 1998), oxidative and reductive stress (Bonarius 2000), low-insulin concentrations (Chan et al. 2003) and glucose-deprived medium (Martinelle et al. 1998). The method was also employed to study the effect of dilution rates and investigate steady-state multiplicity in continuous culture of hybridoma cells. Interestingly, the antibody specific productivity was not found to be a function of the growth rate, suggesting that the cell metabolism may play a major role in IgG productivity (Follstad et al. 1999). Metabolic flux analysis was also applied in the particular case of infected culture for comparing different media and several fed-batch strategies (Nadeau et al. 2002; Nadeau et al. 2000b)

.

In this work, under the hypothesis that the cell metabolic activity may be governing the productivity, metabolic flux analysis was applied to characterise the metabolism of 293 cells grown and infected in perfusion cultures, and evaluate the effects of varying the perfusion rate and the cell density at infection. The intracellular fluxes prior to and after infection were estimated using a 40-flux metabolic network requiring 46 measurements. Observed

differences in maximum viral vector concentrations are analysed in relation with the metabolic flux profiles of each culture. Results demonstrate that the productivity of cells after infection is intimately linked with the flux distribution prior to and post-infection.

6.2.3 Material and Methods

Cell Line and Recombinant Viral Vector

The cell line used was the 293SF-3F6, derived from human kidney fibroblasts transformed with Ad5 DNA and expressing the E1A and E1B proteins constitutively (Graham et al. 1977). The 293SF-3F6 cells were obtained by adapting 293S cells in serum-free medium (Cote et al. 1998). Cells were maintained in 100 ml spinner flasks (Bellco, Vineland, NJ) and subcultured twice a week in NSFM13, a serum-free proprietary medium. After 3 months of sub-culturing, the cells are discarded and a new aliquot is thawed. The adenovirus used for infection, was an adenovirus type 5 containing the Green Fluorescence Protein (GFP), under the control of the CMV promoter (Ad5 GFPq). The viral stock titer was 1.7×10^{10} IVP/ml and stored at –80 °C.

Bioreactor Cultures

Perfusion cultures were carried out in a 3 L bioreactor (Chemap CF-3000, Mannedorf, Switzerland). Agitation by two marine impellers was set at 100 RPM. The pH (Ingold pH probe, Andover, MA) was maintained constant at 7.2

by the addition upon demand of a 1N NAOH solution or adjusting the fraction of CO_2 in the gas inlet. Oxygen was supplied via surface aeration to keep the dissolved oxygen at 40 % air saturation. A water jacket maintained the temperature constant at 37°C. Off-gas measurements were performed using a Servomex 1400 infrared analyser (Norwood, MA). The bioreactor was also equipped with dissolved CO_2 (YSI 8500 CO_2 monitor, Yellow Springs, OH) and biomass (Aber instruments Ltd., Aberystwyth, UK) probes. Process data were logged to a computer using the FIX software (Intellution, MA). Cells were retained in the bioreactor using an acoustic separator (BioSep 10L, Applikon Inc., Foster City, CA). Three pumps (Watson-Marlow Inc, Wilmington, MA) were used for medium feed, culture harvest and recirculation.

Reactor seed cultures were grown in spinner flasks (Bellco, vineland, NJ) and the seeding density was approximately 0.3×10^6 cells/mL in all experiments. Cells were initially allowed to grow in batch mode and the onset of perfusion was when the cell concentration was about 1×10^6 cells/mL. The feed rate was kept constant throughout growth and infection.

Analytical methods

Viability and total cell number were determined using a haemacytometer (Hausser Scientific, Horshaw, PA). Viability was assessed by dye exclusion method using erythrosine B. Samples taken from the reactor were frozen at –80°C until ready for analysis. DNA analysis and dry weight estimation have been previously described (Nadeau et al. 2002). Extracellular proteins were assayed using the Dc Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA) and total proteins were analysed using the BCA kit (Pierce, Rockford, IL) as described previously (Nadeau et al. 2002). The Biolyzer (Kodak, New Haven, Connecticut) was used for the analysis of glucose, lactate and ammonia. Amino acid concentrations were measured by HPLC (Kamen et al. 1991). The total virus particle titre was assayed by HPLC as described in Klyushnichenko et al. (2000).

Specific Consumption and production rates

The specific uptake and production rates were calculated using material balances based on viable cell concentrations. Nutrient balance around a perfusion bioreactor yield the following equations:

$$\frac{dS}{dt} = -q_S X + D(S_{in} - S)$$

$$\frac{dP}{dt} = -q_P X + DP$$

where D is the perfusion rate, q_S and q_P are the specific consumption and production rates, S is the nutrient concentration in the reactor, S_{in} is the nutrient concentration in the feed and P is the metabolite concentration in the reactor. The time derivatives were obtained from the slope of the tangent to the curve of concentration measurements.

Based on a mass balance in the liquid phase, the oxygen uptake rate was calculated as follows:

$$OUR = -V\left(\frac{dC_L}{dt}\right) + K_L a(C^* - C_L)V + D(C_{L0} - C_L)V$$

Where V is the culture volume, C_L the dissolved oxygen concentration in the reactor, C_{L0} the dissolved oxygen concentration in the feed, C* the oxygen concentration at equilibrium with the gas phase and K_La the mass transfer coefficient for oxygen.

The carbon dioxide evolution rate (CER) was evaluated according to the methods proposed by Bonarius *et al.* (1995) and Nyberg *et al.* (1999) for cells cultured in a bicarbonate-buffered medium.

$$CER = -\frac{\dot{n}_g}{V}\left(y^R{}_{CO_2} - y^F{}_{CO_2}\right) + D\left(C^R - C^F\right)$$

where n_g is the molar gas flow rate to the reactor, y^R is the mole fraction of CO_2 in the headspace, y^F is the mole fraction of CO_2 in the feed gas, C^R is the concentration of CO_2 and bicarbonate in the liquid phase and C^F is the concentration of CO_2 and bicarbonate in the medium feed.

Metabolic Flux Calculation

The simplified biochemical network employed is listed in Table 1 and was adapted from a previously established metabolic model for the HEK-293 cell line (Nadeau et al. 2002; Nadeau et al. 2000b). The model involves 40 fluxes, including the catabolism pathways of glucose, glutamine and 18 amino acids. Since pyruvate, glutamine, glutamate, aspartate, ∝-ketoglutarate and malate can be transported in and out of the mitonchondria, compartmentalization of these nutrients was also considered (reactions 33 to 40). Values for cellular composition in amino acids, lipids, DNA and RNA were determined previously for the HEK-293 cell line during both growth and infection (Nadeau et al. 2002). For flux calculations, membrane lipids are lumped into one fraction of oleic acid (Bonarius et al. 1996). The pentose-phosphate pathway was analysed based on ^{14}C experiments described in Nadeau et al. (2002). The amino acid requirements for protein synthesis were estimated based upon the average amino acid composition of proteins measured in HEK-293 cells.

A mass balance around a cell yields the following equation:

$$\frac{dS}{dt} = KF + DS - Q + P$$

where S is the intracellular nutrient concentration, K is the matrix of stoichiometric coefficients, F is the unknown vector of reaction fluxes, DS represents the dilution associated with cell volume variation, Q is the vector of nutrient consumption rates and P is the vector of metabolite production rates. The matrix K contains 46 components and 40 biochemical reactions and is full rank. The sensitivity and singularity tests were performed to ensure that the stoichiometric system developed is a well-posed system. The matrix has a condition number of 66. The pseudo-steady state assumption is invoked for the intracellular metabolites (Zupke et al. 1995) and equation 5 can be simplified to obtain:

$$KF - (Q + P) = 0$$

Evaluation of the metabolic flux vector F is performed using a weighted linear least-squares:

$$F = (K^T \psi^{-1} K) K^T \psi^{-1} (Q - P)$$

where ψ is the variance-covariance matrix associated with the measured rate vector (Q -P).

Table 6-1 Listing of biochemical reactions included in the metabolic network

1	Glc + ATP → Fruct6P
2	Fruct6P + ATP → 2 GAP
3	GAP → Pyr + 2 ATP + NADH + H^+
4	Pyr + NADH + H^+ → Lac
5	mPyr + CoA → ACCoA + NADH + CO_2 + H^+
6	Pyr + Glu → Ala + ∝KG
7	OAA + Glu → Asp + ∝KG
8	mGln + H_2O → mGlu + NH_3
9	2 Gln +5/4 Asp + Rib5P + ½ Gly + 27/4 ATP + 5/8 NADPH → ADN | ARN + ¾ NADH + ¾ Fum + 2 Glu
10	mMal + 2ATP → mPyr +CO_2 + NADPH + H^+
11	Asp + Gln + ATP → Asn + Glu
12	Glu + ATP + 2 NADPH +2 H^+→ Pro
13	2 Gly → Ser + NH_3
14	G6P + ATP → 1/3 Rib5P + 2/3 Xu5P + 2 NADPH + H^+ + CO_2
15	R5P + 2 Xu5P → 2 Fruct6P + GAP
16	2 (9 Cit + 17 ATP + 9 CoA + 16 NADPH) → AcOLE + 18 OAA
17	Extracellular Proteins → ΣAA
18	ΣAA→ Intracellular Proteins
19	Lys + 2 m∝KG + NADPH → 2 AcCoA + 2 CO_2 + 4 NADH + 3 H^+ + $FADH_2$ + 2 mGlu
20	Leu + m∝KG + ATP → 3 AcCoA + mGlu + CO_2 + NADH + H^+ + $FADH_2$
21	Ile + m∝KG + ATP → SuCoA + AcCoA + CO2 + 2 NADH + 2 H^+ + $FADH_2$ + mGlu
22	Thr → CO_2 + 2 NADH + 2 H^+ + $FADH_2$ + NH_3 + mPyr
23	Val + m∝KG + ATP → SuCoA + 3 NADH + H^+ + $FADH_2$ + 2CO_2 + mGlu
24	Met + Ser + 2 ATP → Cte + SucCoA + NADH + H^+ + CO_2 + NH_3
25	Phe + O_2 + NADPH + H^+ → Tyr
26	Tyr + m∝KG + 2O_2 → Fum + 2 AcCoA +m Glu
27	Arg + m∝KG → mGlu + NADH + H^+
28	His → mGlu + NH_3
29	mOAA + AcCoA → Cit
30	Cit → m∝KG + CO_2 + NAPH + H^+
31	m∝KG → SuCoA + NADH + H^+ + CO_2
32	SuCoA → Fum + ATP + $FADH_2$
33	Fum → mMal
34	mMal → mOAA + NADH + H^+
35	NADH + ½ O_2 → 3 ATP
36	Pyr → mPyr
37	Glu + mAsp → mGlu +Asp
38	Gln → mGln
39	mMal + ∝KG → Mal + m∝KG
40	mGlu + mOAA → mAsp + m∝KG

Data consistency

Two elemental balances on nitrogen and carbon were used as independent equations to check the overall consistency of the data, using a method described previously (Bonarius et al. 1999; Stephanopoulos et al. 1998). Briefly, a statistical function is used to assess if the residuals from the elemental balances are significantly different from their expected value of zero.

$$\varepsilon = A \cdot (P - Q)$$

where A is the matrix of redundant equations. The function h is equal to the sum of weighted squares of the residuals :

$$h = \varepsilon^T \varphi^{-1} \varepsilon$$

$$\varphi = A^T \psi A$$

where ψ is the variance-covariance matrix of the measurements contained in (*P*-*Q*). It was demonstrated that h follows a χ^2 distribution and the degree of freedom is determined by the number of redundant equations (Stephanopoulos et al. 1998). For 2 degrees of freedom, the value of the χ^2 distribution at a 90 %

confidence interval is 4.61. A lower calculated value of h indicates that, at a confidence greater than 90 %, there are no gross measurement errors.

6.2.4 Results and Discussion

HEK-293 cells were cultivated in a perfusion bioreactor at various flow rates and were infected at different cell concentrations to study the effects of these parameters on product yield.

Culture Productivity

Figure 6.1 presents the production results in terms of maximum volumetric and specific productivities. For the three experiments conducted with the same perfusion rate, a reduced cell specific productivity is observed at increasing infection cell densities. This "cell density effect" (Nadeau et Kamen 2003) is believed to be caused by factors such as nutrient limitation or the presence of metabolic waste inhibitors. This is further supported by the data from Figure 6.1; by increasing the perfusion rate from 0.5 to 1 vol/d, the cell concentration at infection can be doubled from $2x10^6$ to $4x10^6$ cells/mL without impairing the

cell specific productivity. In turn, this resulted in a two-fold increase in volumetric productivity. To determine how these results are related to the metabolism of the cells, the kinetics of nutrient consumption and metabolite production were evaluated for four experiments.

Specific Uptake/Production Rates

Table 6-2 and Table 6-3 show the specific consumption and production rates prior and post-infection, respectively. To account for possible measurements error (i.e. non representative sample), each value listed in the tables is the average of two or three measurements taken over a short period (< 12 h) prior to infection.

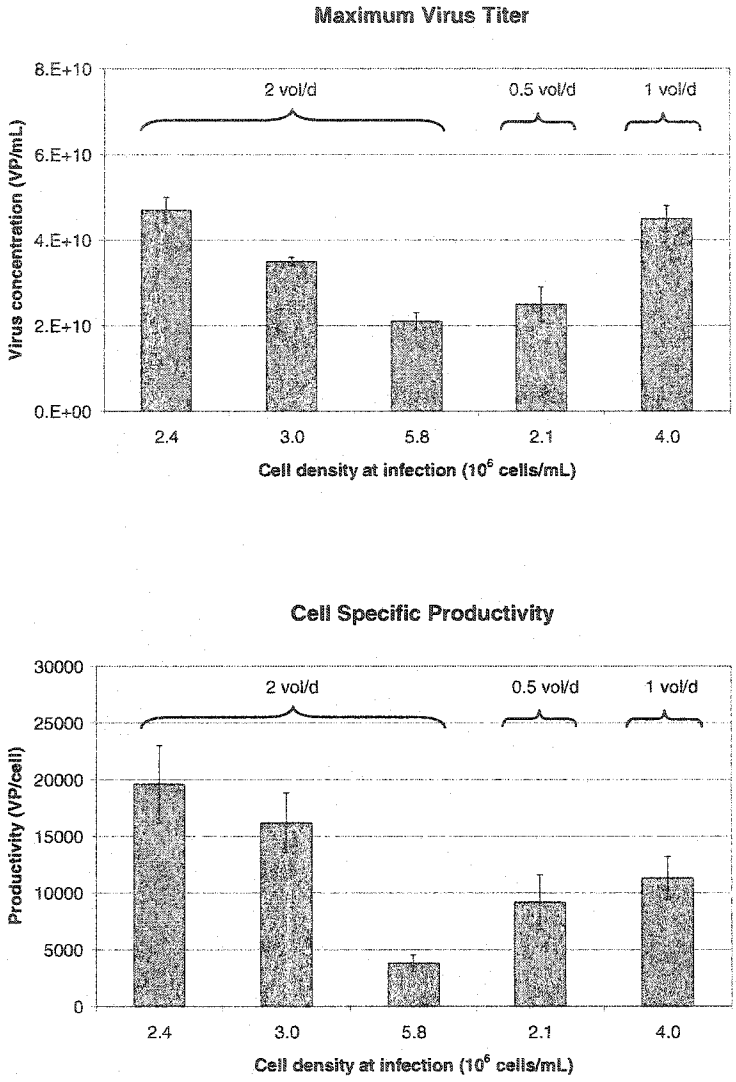


Figure 6.1 Adenovirus production in perfusion cultures.

Under a similar feeding regime, a reduction in cell specific productivity is observed for increasing cell density at infection. As seen from the last two experiments, increasing the perfusion rate allows to maintain the specific yield for an infection at a higher cell density.

During the course of a culture, the specific uptake rates were generally found to decrease with increasing cell densities (data not shown) and was correlated to reduced residual nutrient concentrations in the cultures. For hybridoma cells, it has been observed that the specific glucose consumption increases with higher residual concentrations (Portner et Schafer 1996). Portner *et al.* (1994) have established a relationship between viable cell concentration and the specific uptake rate. The decline of cell specific substrate uptake and metabolite production rate during exponential growth was hypothesised to be due to autocrine components. This is also seen when comparing the rates between experiment #1 and #2. Although they were run with a similar perfusion rate, in the latter the cells were infected at a higher cell density (5.8×10^6 cells/mL) and reduced uptake rates were observed for glucose, glutamine and most of the essential amino acids. The specific oxygen uptake rate was also significantly lower at the time of infection compared to experiment #1. On the other hand, experiments #3 and #4 present similar values for most of the kinetic rates even though the feed rates and cell density at infection were different.

The observed differences between the cultures are not reflected in the growth rate values (Table 6-3), which remained similar for all the cultures. However, the above results suggest that the cell specific productivity of a culture cell is

largely dictated by the metabolism of the cells at the time of infection. Moreover, cells infected at a higher concentration can be driven towards a similar metabolism by manipulating the perfusion rate so as to maintain similar uptake/production rates.

To better understand the effects of the different substrate consumption profiles (Table 6-2 and Table 6-3), we have employed metabolic flux analysis to assess any underlying changes in cell metabolism that may explain the observed differences in production yields. Intracellular flux analysis is useful for evaluating the effects on cell metabolism of environmental factors which are determined by the operating conditions. In turn, this may eventually help to choose an appropriate feeding regime and design a control strategy.

Table 6-2 Average measured production/uptake rates prior to infection for different operating conditions (values in mmol/10^{10} cells. h, negative rates signify consumption)

	Exp#1	Exp#2	Exp#3	Exp#4
Cell density	2.4x10^6 cells/mL	5.8x10^6 cells/mL	2.1x10^6 cells/mL	4x10^6 cells/mL
Perfusion rate	2 vol/d	2 vol/d	0.5 vol/d	1 vol/d
Growth rate	0.026 h^{-1}	0.025 h^{-1}	0.028 h^{-1}	0.028 h^{-1}
Glucose	-1.76 ± 0.35	-1.01 ± 0.21	-1.44 ± 0.41	-1.74 ± 0.17
Lactate	3.7 ± 1.2	1.48 ± 0.07	3.3 ± 1.5	2.61 ± 0.25
Serine	-0.15 ± 0.03	-0.072 ± 0.008	-0.120 ± 0.006	-0.12 ± 0.01
Glycine	0.06 ± 0.02	-0.0047 ± 0.0003	0.01 ± 0.01	0.033 ± 0.007
Alanine	0.13 ± 0.03	0.037 ± 0.007	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.01
Aspartate	-0.072 ± 0.008	-0.040 ± 0.001	-0.068 ± 0.003	-0.080 ± 0.009
Asparagine	-0.003 ± 3e-4	-0.002 ± 0.001	-0.002 ± 0.002	-0.003 ± 0.000
Glutamine	-0.29 ± 0.09	-0.19 ± 0.04	-0.30 ± 0.03	-0.34 ± 0.04
Glutamate	0.07 ± 0.03	0.022 ± 0.006	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01
Thréonine*	-0.017 ± 0.009	-0.02 ± 0.01	-0.020 ± 0.004	-0.03 ± 0.003
Phénylalaline	-0.014 ± 0.004	-0.016 ± 0.005	-0.024 ± 0.002	-0.021 ± 0.002
Tyrosine	-0.009 ± 0.002	-0.013 ± 0.005	-0.019 ± 0.001	-0.018 ± 0.002
Valine*	-0.05 ± 0.01	-0.040 ± 0.008	-0.059 ± 0.002	-0.061 ± 0.007
Méthionine	-0.017 ± 0.003	-0.013 ± 0.001	-0.044 ± 0.004	-0.017 ± 0.001
Arginine	-0.08 ± 0.02	-0.050 ± 0.006	-0.063 ± 0.002	-0.058 ± 0.006
Histidine*	-0.008 ± 0.002	-0.009 ± 0.002	-0.012 ± 0.001	-0.012 ± 0.001
Lysine*	-0.044 ± 0.008	-0.035 ± 0.005	-0.053 ± 0.004	-0.047 ± 0.004
Leucine*	-0.06 ± 0.01	-0.035 ± 0.006	-0.067 ± 0.006	-0.067 ± 0.006
Isoleucine*	-0.07 ± 0.02	-0.043 ± 0.009	-0.065 ± 0.006	-0.072 ± 0.009
Proline	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.045 ± 0.008	0.0430 ± 0.0001
NH3	0.25 ± 0.10	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.16 ± 0.03
O2	-2.14 ± 0.37	-1.64 ± 0.04	-1.87 ± 0.03	-1.73 ± 0.08

Table 6-3 Average measured production/uptake rates post-infection for different operating conditions (values in mmol/10^{10} cells. h, negative rates signify consumption)

	Exp#1	Exp#2	Exp#3	Exp#4
Cell density	2.4x10^6 cells/mL	5.8x10^6 cells/mL	2.1x10^6 cells/mL	4x10^6 cells/mL
Perfusion rate	2 vol/d	2 vol/d	0.5 vol/d	1 vol/d
Glucose	-2.92 ± 0.75	-1.6 ± 0.6	-2.86 ± 0.15	-2.48 ± 0.4
Lactate	3.6 ± 0.3	1.96 ± 0.6	5.4 ± 0.9	4.3 ± 1.6
Serine	-0.16 ± 0.01	-0.08 ± 0.01	-0.118 ± 0.008	-0.10 ± 0.01
Glycine	0.039 ± 0.003	-0.005 ± 0.006	0.02 ± 0.03	0.012 ± 0.0001
Alanine	0.146 ± 0.006	0.08 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.13 ± 0.03
Aspartate	-0.084 ± 0.006	-0.050 ± 0.006	-0.086 ± 0.001	-0.067 ± 0.009
Asparagine	-0.004 ± 0.003	-0.001 ± 0.0004	0.001 ± 0.006	-0.0015 ± 5E-05
Glutamine	-0.391 ± 0.015	-0.28 ± 0.08	-0.36 ± 0.15	-0.38 ± 0.05
Glutamate	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.073 ± 0.006
Thréonine*	-0.030 ± 0.001	-0.039 ± 0.015	-0.03 ± 0.03	-0.028 ± 0.001
Phénylalaline	-0.022 ± 0.0002	-0.024 ± 0.007	-0.02 ± 0.01	-0.024 ± 0.005
Tyrosine	-0.019 ± 0.001	-0.021 ± 0.007	-0.02 ± 0.01	-0.019 ± 0.001
Valine*	-0.063 ± 0.007	-0.05 ± 0.01	-0.06 ± 0.02	-0.057 ± 0.008
Méthionine	-0.022 ± 0.001	-0.015 ± 0.002	-0.021 ± 0.002	-0.018 ± 0.002
Arginine	-0.094 ± 0.008	-0.064 ± 0.015	-0.08 ± 0.02	-0.063 ± 0.004
Histidine*	-0.014 ± 0.001	-0.013 ± 0.004	-0.013 ± 0.007	-0.015 ± 0.005
Lysine*	-0.050 ± 0.007	-0.042 ± 0.007	-0.05 ± 0.01	-0.045 ± 0.009
Leucine*	-0.073 ± 0.006	-0.04 ± 0.01	-0.07 ± 0.02	-0.064 ± 0.009
Isoleucine*	-0.071 ± 0.008	-0.05 ± 0.01	-0.06 ± 0.02	-0.059 ± 0.007
Proline	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.05	0.067 ± 0.001
NH3	0.27 ± 0.02	0.20 ± 0.06	0.22 ± 0.04	0.28 ± 0.09
O2	-2.8 ± 0.2	-1.2 ± 0.3	-2.32 ± 0.18	-2.08 ± 0.05

Data consistency

Each data set used for flux analysis was tested using the consistency test function as described in the materials and methods. Consistency indices (h) were calculated using elemental balances on carbon and nitrogen and the values obtained are reported in Table 6-4. At a confidence level of 90 %, the test function h is always lower than the χ^2 distribution. Therefore, we can conclude that all the data sets are consistent with the presumed biochemistry and unlikely to contain gross measurement errors. The residuals from the carbon and nitrogen balances are also reported in Table 6-4. Though relatively small, we note that the residuals of the nitrogen balance are always positively biased post infection. Thus, the consumption of one or some N-containing metabolites is underestimated or the production rate of some metabolites is overestimated. From Table 6-4, we also observed higher residuals for the carbon balances because C-containing metabolites, such as glucose, CO_2 and lactate, account for the largest consumption/production rates.

Table 6-4 Calculated consistency index values. Values lower than the χ^2 distribution value (90 % confidence interval, 2 degrees of freedom) indicate that the data set was consistent.

		Consistency index (h)	χ^2	N residual	C residual	Conclusion
Exp #1	Growth	0.26	4.61	-0.014	-0.23	Pass
	Infection	2.7	4.61	0.07	0.63	Pass
Exp #2	Growth	0.16	4.61	-0.009	0.03	Pass
	Infection	1.9	4.61	0.06	0.48	Pass
Exp #3	Growth	0.22	4.61	-0.01	-0.25	Pass
	Infection	2.4	4.61	0.1	0.18	Pass
Exp #4	Growth	1.95	4.61	-0.007	0.16	Pass
	Infection	2.7	4.61	0.09	0.32	Pass

Metabolic flux analysis

The intracellular fluxes were evaluated from the measured rates for each experiment (Table 6-2 and Table 6-3). The results are summarised in Table 6-5. The relative errors of the computed flux were generally similar to the measurements errors.

Glycolysis

The main glycolytic fluxes are presented in Figure 6.2. The conversion of glucose to pyruvate is essentially a function of the residual glucose

concentrations. As a result, the experiment with the lowest cell concentration and the highest perfusion rate had a glucose concentration of 20 mM and exhibits the largest glycolytic flux. Conversely, the concentration of glucose in the second experiment dropped to 14 mM at the time of infection and the flux from glucose to pyruvate was the lowest. From Figure 6.2, we also observe that the fraction of pyruvate converted into lactate seems to decrease as the cell concentration increases (Experiments #2 and #4). A reduction in the molar ratio of lactate/glucose has been reported previously for the same cell line in batch and fed-batch cultures using different media (Nadeau et al. 2002; Siegwart et al. 1999) and for several hybridoma cells (Portner et Schafer 1996). Such variations in the yield coefficient of lactate from glucose were linked to glucose and/or glutamine concentrations. Taken together, these results indicate that at higher cell concentrations, cells present a more efficient metabolism.

Only a relatively small portion of the pyruvate pool is oxidized in the TCA cycle. Interestingly, the flux of pyruvate entering the TCA cycle remains relatively unchanged despite the different culture and experimental conditions and the resulting distinct production yields.

Table 6-5 Calculated intracellular fluxes prior to infection (mmol/10^{10} cells.h).

Reaction	Exp#1	Exp#2	Exp#3	Exp#4
1	1.86 ± 0.31	1.04 ± 0.05	1.54 ± 0.36	1.71 ± 0.10
2	1.91 ± 0.31	1.03 ± 0.05	1.59 ± 0.36	1.67 ± 0.10
3	3.84 ± 0.61	2.06 ± 0.10	3.20 ± 0.72	3.33 ± 0.21
4	3.31 ± 0.62	1.47 ± 0.07	2.77 ± 0.72	2.65 ± 0.20
5	0.83 ± 0.17	0.69 ± 0.05	0.66 ± 0.05	0.71 ± 0.06
6	0.070 ± 0.018	0.024 ± 0.01	0.068 ± 0.016	0.072 ± 0.011
7	-0.027 ± 0.017	-0.006 ± 0.01	-0.026 ± 0.016	-0.019 ± 0.014
8	0.077 ± 0.061	0.043 ± 0.031	0.031 ± 0.028	0.092 ± 0.029
9	0.057 ± 0.01	0.039 ± 0.009	0.065 ± 0.009	0.061 ± 0.009
10	0.175 ± 0.052	0.045 ± 0.040	0.207 ± 0.039	0.032 ± 0.039
11	0.033 ± 0.010	0.018 ± 0.010	0.046 ± 0.010	0.036 ± 0.010
12	0.032 ± 0.014	0.042 ± 0.016	0.022 ± 0.012	0.034 ± 0.009
13	-0.046 ± 0.014	-0.015 ± 0.007	-0.041 ± 0.009	-0.047 ± 0.007
14	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.01
15	0.008 ± 0.006	-0.006 ± 0.006	0.007 ± 0.006	-0.014 ± 0.006
16	0.000 ± 0.015	0.004 ± 0.013	0.000 ± 0.015	0.006 ± 0.013
17	0.33 ± 0.12	0.248 ± 0.078	0.444 ± 0.08	0.425 ± 0.072
18	0.107 ± 0.039	0.045 ± 0.019	0.027 ± 0.019	0.048 ± 0.019
19	0.000 ± 0.016	0.000 ± 0.011	0.000 ± 0.011	0.000 ± 0.011
20	0.001 ± 0.018	0.000 ± 0.012	0.005 ± 0.012	0.000 ± 0.012
21	0.03 ± 0.02	0.010 ± 0.013	0.033 ± 0.011	0.008 ± 0.013
22	0.057 ± 0.015	0.028 ± 0.016	0.036 ± 0.011	0.027 ± 0.011
23	0.001 ± 0.015	0.004 ± 0.013	0.016 ± 0.010	0.000 ± 0.012
24	0.020 ± 0.010	0.011 ± 0.010	0.047 ± 0.011	0.012 ± 0.01
25	0.001 ± 0.011	0.000 ± 0.011	0.003 ± 0.010	0.000 ± 0.01
26	0.000 ± 0.015	0.000 ± 0.015	0.006 ± 0.014	0.000 ± 0.014
27	0.000 ± 0.019	0.000 ± 0.011	0.000 ± 0.009	0.000 ± 0.01
28	0.000 ± 0.01	0.000 ± 0.01	0.000 ± 0.01	0.000 ± 0.01
29	0.87 ± 0.16	0.697 ± 0.035	0.727 ± 0.030	0.718 ± 0.043
30	0.90 ± 0.16	0.695 ± 0.032	0.752 ± 0.025	0.708 ± 0.041
31	0.99 ± 0.17	0.739 ± 0.039	0.851 ± 0.034	0.802 ± 0.047
32	1.06 ± 0.16	0.765 ± 0.036	0.967 ± 0.032	0.818 ± 0.045
33	1.12 ± 0.16	0.796 ± 0.039	1.040 ± 0.035	0.861 ± 0.047
34	0.94 ± 0.16	0.743 ± 0.034	0.829 ± 0.029	0.800 ± 0.044
35	4.24 ± 0.74	3.28 ± 0.12	3.69 ± 0.09	3.46 ± 0.17
36	0.58 ± 0.18	0.613 ± 0.066	0.399 ± 0.064	0.655 ± 0.069
37	0.026 ± 0.026	0.019 ± 0.022	0.067 ± 0.023	0.030 ± 0.023
38	0.097 ± 0.061	0.056 ± 0.031	0.060 ± 0.028	0.120 ± 0.028
39	0.023 ± 0.01	0.009 ± 0.009	0.022 ± 0.01	0.026 ± 0.009
40	0.084 ± 0.027	0.047 ± 0.024	0.116 ± 0.025	0.079 ± 0.025

The fraction of consumed glucose entering the Krebs cycle increased in experiment #2. This apparent shift to a more efficient metabolism may serve to compensate for the reduction in glucose uptake (Xie et Wang 1996a). In the literature, variations in this flux were sometimes associated with observed differences in growth rates. By investigating steady-state multiplicity in continuous culture of hybridoma cells, (Follstad et al. 1999) have shown that, as the growth rate decreases, more pyruvate flows into the Krebs cycle leading to an increase of 10 to 30 % in the TCA cycle activity. In studies on the same hybridoma cell line, the flux of pyruvate in the Krebs cycle was found to drop to zero under oxygen-limited conditions (Zupke et al. 1995). However, from Table 6-2, we can see that the growth rates remained fairly similar in all four experiments. It has been reported that cells can proliferate at the same growth rate under different metabolic states (reduced lactate/glucose molar ratios) (Europa et al. 2000).

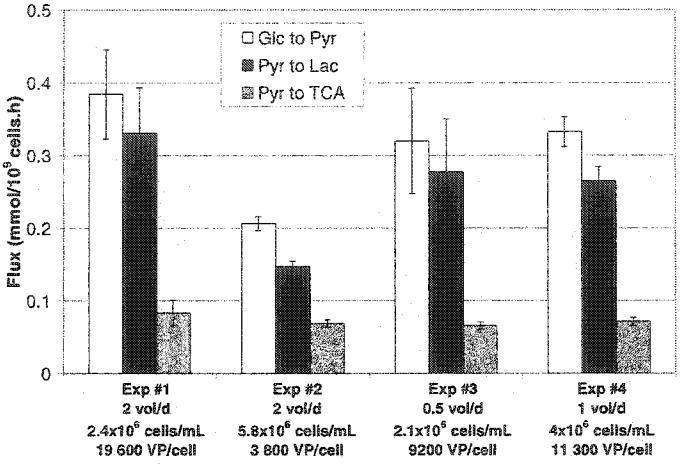


Figure 6.2 Glycolytic fluxes.

Fluxes from glucose to pyruvate, pyruvate to lactate and pyruvate to acetyl-CoA before infection are shown. The perfusion rate, cell density at infection and specific productivity are also indicated.

Glutaminolysis and amino acids utilisation

As a nitrogen and carbon source, glutamine is implicated in a number of biosynthesis reactions. It can also contribute to maintain the carbon flux in the TCA cycle and serve as an energy substrate. The majority of the glutamine carbon skeleton enters the TCA cycle following conversion into ∝-ketoglutarate by glutamate dehydrogenase or aminotransferase. The relative contribution of

glutamine to cellular energy has been reported to be between 30 and 98 % depending on the cell line and substrate concentrations (Fitzpatrick, 1993).

As for glucose, glutamine uptake rates also correlated with its residual concentrations in the bioreactor. Moreover, all the glutamine transformed into glutamate is further converted to α-ketoglutarate as shown in Figure 6.3. Considering the relative errors involved, the glutaminolytic fluxes were fairly similar for the three productive infections. Experiment #2, which had low yield, exhibited a reduced conversion of glutamate into the TCA cycle.

Hybridoma cells with an excess of glucose and glutamine mainly metabolize glutamine via the transamination pathway. Previous studies have demonstrated that the flux through glutamate dehydrogenase is negligible or even slightly reversed to prevent the accumulation of ammonia in cultures operated at low dissolved oxygen (Zupke et al. 1995) and ammonia-stressed cultures (Bonarius 2000; Bonarius et al. 1996; Bonarius et al. 1998; Jenkins et al. 1992). Only cultures deprived of glucose showed increased glutaminase and glutamate dehydrogenase activity (Martinelle et al. 1998). The glutamate dehydrogenase pathway was not considered in the model and the flux shown in Figure 6.3

corresponds to the conversion of glutamate via alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase.

In animal cells, amino acids are both used for energy generation and biosynthesis. Others such as alanine, glycine and proline are normally produced by the cells. As a result of the low measured rates (Table 6-2), calculated fluxes of amino acids degradation and production were generally relatively small (Table 6-5).). It appears that some amino acids like threonine, phenylalanine, lysine, arginine and histidine were almost exclusively used for protein synthesis.

Essential amino acids are also mainly used for protein synthesis, but some can participate in energy production when excess amounts are present in the culture (Xie et Wang 1996a). The sum of all essential amino acid fluxes are presented in Figure 6.3 A slight reduction is observed for the experiments at high cell density (experiments #2 and #4), likely due to lower concentrations in the culture.

Alanine constitutes one of the main overflow metabolites of glutaminolysis and glycolysis. Increased secretion rates (Table 6-5, reaction 6) were measured for the three productive experiments in comparison to the second run.

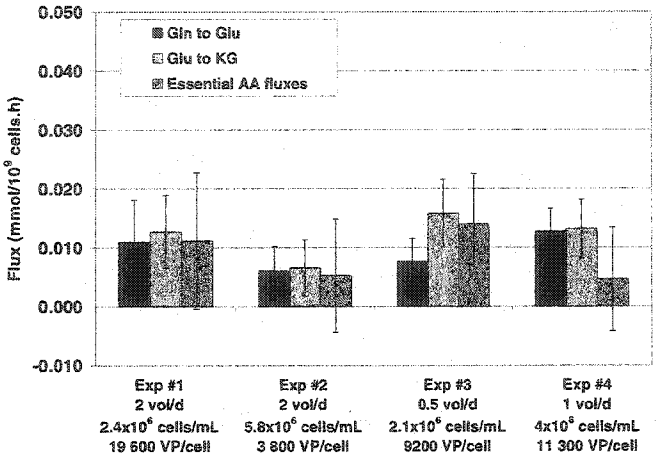


Figure 6.3 Glutaminolytic fluxes.

The net conversion from glutamine to glutamate, glutamate to α-ketoglutarate and the fluxes of essential amino acids are shown.

TCA activity

Figure 6.4 shows the average TCA cycle fluxes (reactions 29 to 34). As expected, the rates of pyruvate entering the Krebs cycle were quite similar with only small differences observed in TCA activity. The differences are due to the minor contribution of glutamine and other amino acids, which were greater in the first experiment and less in the second. Flux analysis on hybridoma cells have revealed notable increase in TCA cycle activity when the growth rate is significantly decreased (Follstad et al. 1999). Similarly, by controlling glucose at low levels, Europa *et al.* (2000) have reported a 90 % reduction in Krebs cycle

fluxes for hybridoma cells with an altered metabolism resulting in increased antibody production. However, a similar approach tested on HEK-293 cells have not led to significant differences in terms of growth rate and respiration (Siegwart et al. 1999). In our experiments, the growth rates were similar and the concentrations of glucose in the culture were never limiting. Despite the changes in consumption rates in relation with nutrient availability , the oxidative capacity appears saturated or well-regulated and any excess in substrate is diverted to waste production (ammonia, alanine, lactate, etc...)

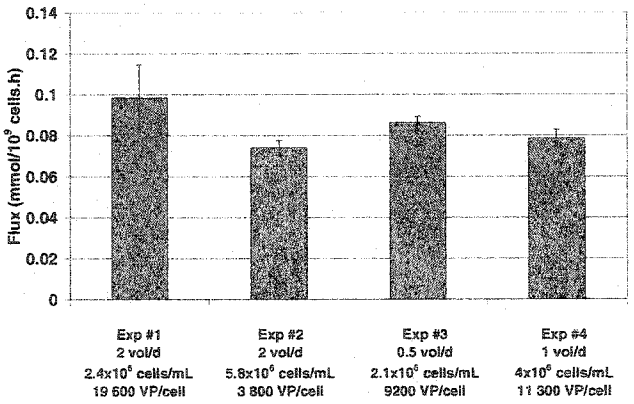


Figure 6.4. Krebs cycle fluxes.

The values shown correspond to an average of the calculated fluxes of reaction 30 to 35 in table I.

ATP production rate estimation

ATP is the driving force for the majority of biochemical reactions. Energy is needed for protein, lipid, RNA, DNA and polysaccharide synthesis and transport gradient processes. It is simultaneously consumed and produced by several pathways which makes the determination of the rate of ATP production very challenging. Estimation of ATP production has mostly been based on lactate production and oxygen consumption rates (Xie et Wang 1996b). Here, an estimate of the ATP production rate is obtained based on a comprehensive metabolic model (Figure 6.5). The ATP produced from glycolysis and TCA cycle were computed from flux estimates, assuming that $FADH_2$ oxidation produces 2 ATP while NADH/NADPH produces 3 ATP.

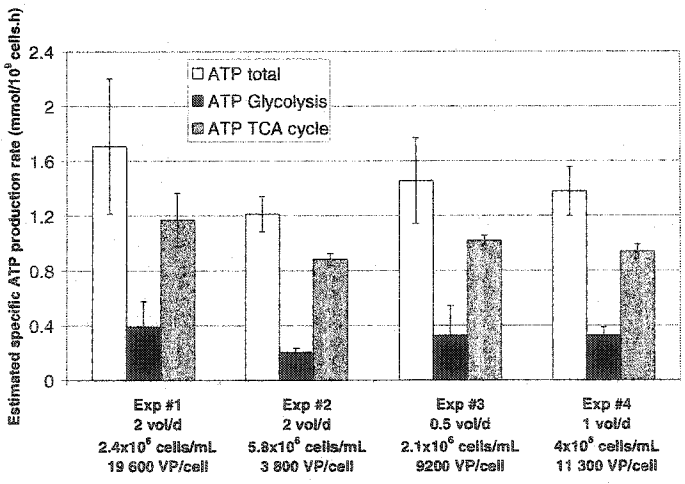


Figure 6.5 Estimated ATP production rate.

In all cases, the TCA cycle provided the majority of the energy (70 %). The glycolytic pathway contributed to 20 % of the total amount produced and the catabolism of amino acids accounted for about 10 %. This concurs with the work of Xie and Wang (Xie et Wang 1996b) on a hybridoma cell line. Using a stoichiometric network, they estimated that the TCA cycle contributed to the majority of ATP production (60 %), while the amount formed by amino acids accounted for less than 10 %.

The experiment performed at low cell density and high media renewal rate was characterized by greater glycolytic fluxes and a slightly higher TCA activity. This translated into a more elevated ATP production compared to the experiment performed at high cell density. Experiments #3 and #4 had similar rates, which shows that cultures operated at different cell concentrations can present similar physiological state when the feed rate is adjusted so as to maintain the same availability of nutrients and removal of waste. Because ATP is the primary energy source in the cell, it is reasonable to assume that fluctuations in the estimated ATP rate will affect the behaviour of the cell's metabolism. Higher specific ATP production have been linked to increased antibody production by hybridoma cells under high osmotic pressure (Lin et al. 1999). Enhanced productivities were also noted for cells exposed to 100 nM

rapamycin and this was correlated with increased glucose uptake rate, carbon flux through the TCA cycle and increased production of ATP (Balcarcel et Clark 2003). In studying the effect of different media on the production of viral vectors, Nadeau et al. (2002) have noted increased production correlated with higher ATP fluxes. Although the observed differences are relatively small between the experiments, the same trend is apparent in our data and is intimately linked to the changes in nutrient uptake.

These results tend to suggest that the cell physiological state at the time of infection dictate, at least in part, the productivity of a culture. In the next section, we extend our analysis by examining the data gathered from the same experiments post-infection.

Metabolic fluxes analysis post-infection

Upon infection, several important physiological changes will occur. Among the most important ones, increase in cell mass and size, as well as an increase in protein and DNA contents are noted. These modifications were included in the modeling framework developed by Nadeau et al. (2000a) to characterize the

metabolism of cells grown and infected in different medium or with different fed-batch strategies (Nadeau et al. 2002; Nadeau et al. 2000b). Following the same methodology, we evaluate here the potential of flux analysis to highlight the metabolic changes indicative of a productive infection.

For each experiment, the fluxes were evaluated when the maximum oxygen uptake rate was achieved (at circa 20 to 30 hours post-infection) and the results are presented in Table 6-6

Elevated glucose uptake rate and concomitant higher lactate production rates have been commonly reported following infection (Garnier et al. 1994; Iyer et al. 1999; Nadeau et al. 2002; Singhvi et al. 1996; Xie et al. 2002a). A significant increase in glycolytic fluxes was observed in all four experiments. As such, this provides an indication that the infection is occurring, but can not be correlated with the final product yield. However, all the productive infections showed an increase in the pyruvate flux entering the TCA cycle, whereas this flux was reduced in the second experiment, which was characterized by low productivities (Figure 6.6). This point will be further discussed later.

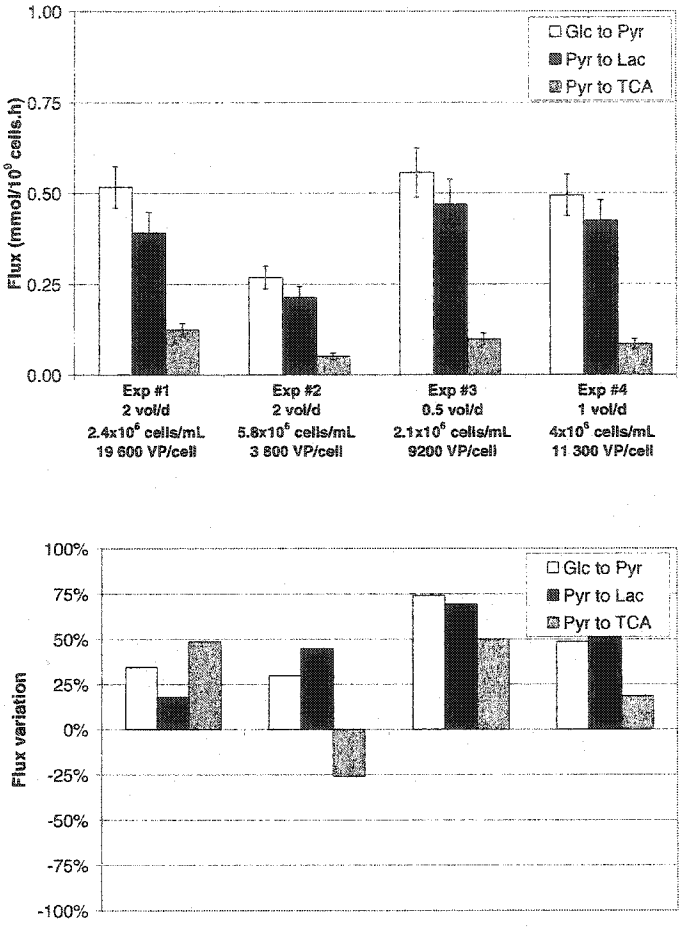


Figure 6.6 Glycolytic fluxes post-infection and their percentage of variation compared with the values obtained prior to infection.

Table 6-6 Calculated intracellular fluxes post-infection (mmol/10^{10} cells.h)

Reaction	Exp#1	Exp#2	Exp#3	Exp#4
1	2.71 ± 0.29	1.43 ± 0.15	2.79 ± 0.34	2.49 ± 0.28
2	2.61 ± 0.29	1.36 ± 0.15	2.79 ± 0.34	2.48 ± 0.28
3	5.17 ± 0.57	2.68 ± 0.31	5.57 ± 0.68	4.94 ± 0.57
4	3.91 ± 0.57	2.13 ± 0.30	4.70 ± 0.68	4.24 ± 0.57
5	1.23 ± 0.18	0.51 ± 0.09	0.98 ± 0.16	0.84 ± 0.14
6	0.086 ± 0.013	0.052 ± 0.010	0.099 ± 0.014	0.073 ± 0.013
7	-0.018 ± 0.014	-0.007 ± 0.013	-0.034 ± 0.015	-0.025 ± 0.014
8	0.124 ± 0.036	0.087 ± 0.028	0.049 ± 0.033	0.119 ± 0.034
9	0.076 ± 0.009	0.052 ± 0.009	0.061 ± 0.009	0.068 ± 0.009
10	-0.055 ± 0.041	-0.051 ± 0.038	0.075 ± 0.040	0.078 ± 0.041
11	0.030 ± 0.010	0.024 ± 0.010	0.028 ± 0.010	0.040 ± 0.010
12	0.058 ± 0.014	0.037 ± 0.010	0.067 ± 0.014	0.035 ± 0.012
13	-0.037 ± 0.008	-0.013 ± 0.007	-0.024 ± 0.007	-0.014 ± 0.007
14	0.07 ± 0.02	0.04 ± 0.04	0.07 ± 0.004	0.06 ± 0.010
15	-0.033 ± 0.006	-0.024 ± 0.006	-0.007 ± 0.006	-0.011 ± 0.006
16	0.011 ± 0.014	0.011 ± 0.013	0.000 ± 0.014	0.000 ± 0.013
17	0.169 ± 0.089	0.155 ± 0.070	-0.001 ± 0.086	0.021 ± 0.083
18	0.111 ± 0.025	0.058 ± 0.019	0.094 ± 0.022	0.086 ± 0.021
19	0.000 ± 0.012	0.000 ± 0.011	0.000 ± 0.012	0.000 ± 0.012
20	0.000 ± 0.014	0.000 ± 0.012	0.023 ± 0.014	0.004 ± 0.013
21	0.000 ± 0.013	0.000 ± 0.012	0.010 ± 0.012	0.000 ± 0.012
22	0.028 ± 0.011	0.033 ± 0.011	0.032 ± 0.011	0.050 ± 0.011
23	0.000 ± 0.012	0.000 ± 0.012	0.004 ± 0.012	0.000 ± 0.012
24	0.014 ± 0.010	0.009 ± 0.010	0.021 ± 0.010	0.018 ± 0.010
25	0.000 ± 0.010	0.000 ± 0.010	0.003 ± 0.010	0.002 ± 0.010
26	0.000 ± 0.014	0.000 ± 0.014	0.000 ± 0.014	0.000 ± 0.014
27	0.000 ± 0.013	0.000 ± 0.011	0.000 ± 0.012	0.000 ± 0.011
28	0.000 ± 0.010	0.000 ± 0.010	0.000 ± 0.010	0.000 ± 0.010
29	1.22 ± 0.18	0.501 ± 0.079	1.06 ± 0.15	0.86 ± 0.14
30	1.19 ± 0.18	0.472 ± 0.078	1.07 ± 0.15	0.86 ± 0.14
31	1.27 ± 0.181	0.545 ± 0.081	1.12 ± 0.15	0.99 ± 0.14
32	1.26 ± 0.18	0.538 ± 0.080	1.16 ± 0.15	1.02 ± 0.14
33	1.30 ± 0.18	0.563 ± 0.082	1.21 ± 0.15	1.07 ± 0.14
34	1.30 ± 0.18	0.580 ± 0.079	1.10 ± 0.15	0.97 ± 0.14
35	5.65 ± 0.83	2.37 ± 0.36	4.87 ± 0.70	4.15 ± 0.63
36	1.27 ± 0.19	0.539 ± 0.095	0.87 ± 0.16	0.72 ± 0.15
37	0.006 ± 0.024	0.026 ± 0.022	0.000 ± 0.024	0.051 ± 0.023
38	0.160 ± 0.036	0.113 ± 0.027	0.074 ± 0.033	0.160 ± 0.034
39	0.033 ± 0.009	0.021 ± 0.009	0.033 ± 0.009	0.024 ± 0.009
40	0.065 ± 0.026	0.068 ± 0.024	0.044 ± 0.026	0.113 ± 0.025

No significant differences can be discerned for glutamine or other amino acids utilisation between the four experiments (Figure 6.7). The calculated fluxes remained relatively low and the variations between pre- and post-infection values were within the range of error. This is in agreement with previous work on the same cell line (Nadeau et al. 2002) and is also similar to the kinetics obtained on infected PERC.6 cells (Xie et al. 2002a), another human cell line used for production of adenoviral vectors.

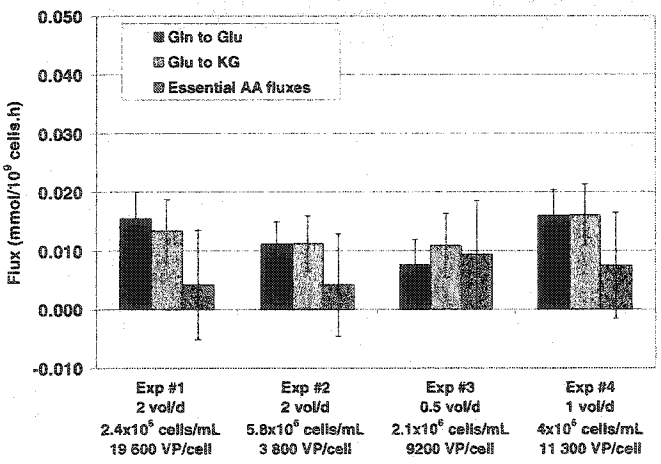


Figure 6.7 Glutaminolytic and amino acids fluxes post-infection

As shown in Figure 6.8, TCA activity was greatly enhanced in the three productive infections. Higher fluxes in the Krebs cycle are consistent with the commonly reported increase in specific oxygen uptake rate following infection

(Garnier et al. 1994; Kussow et al. 1995). Such an increase can be related in part to the augmentation in cell size and mass, but may also serve to fulfill the increase energy requirements of the infectious process. In contrast, the TCA activity was not maintained in the second experiment and a poor specific productivity was achieved. These results suggest that, to assess the success of an infection, respiration may be the most critical process variable to monitor.

The aforementioned points are further illustrated in Figure 6.9 showing the predicted ATP production rate post-infection. In all but the second experiment, the total ATP flux is increased. As such, the estimated ATP production rate provides a good indication of the overall metabolic activity of the cells.

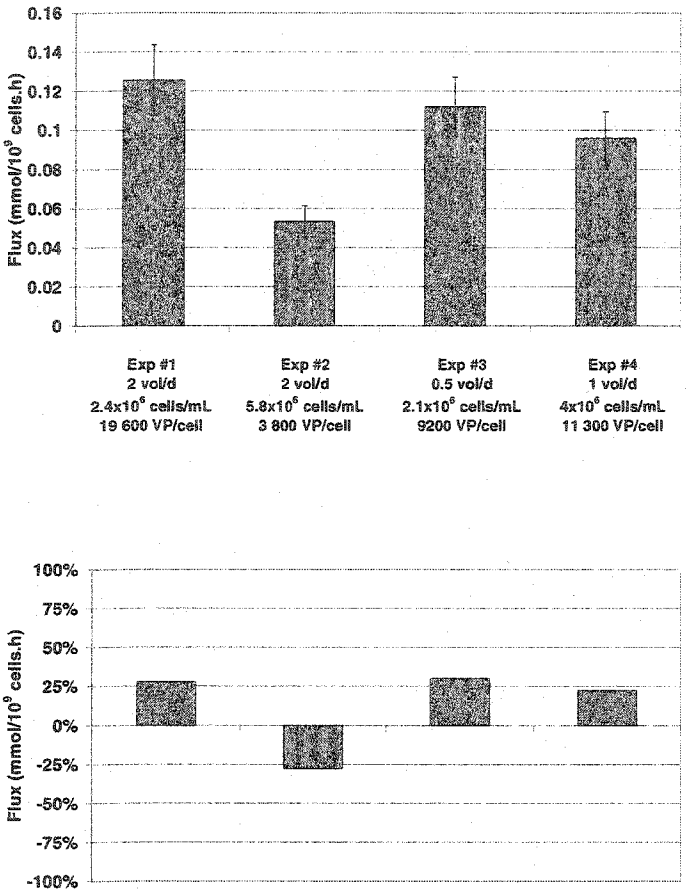


Figure 6.8 Krebs cycle fluxes post-infection and their percentage of variation compared with the values obtained prior to infection.

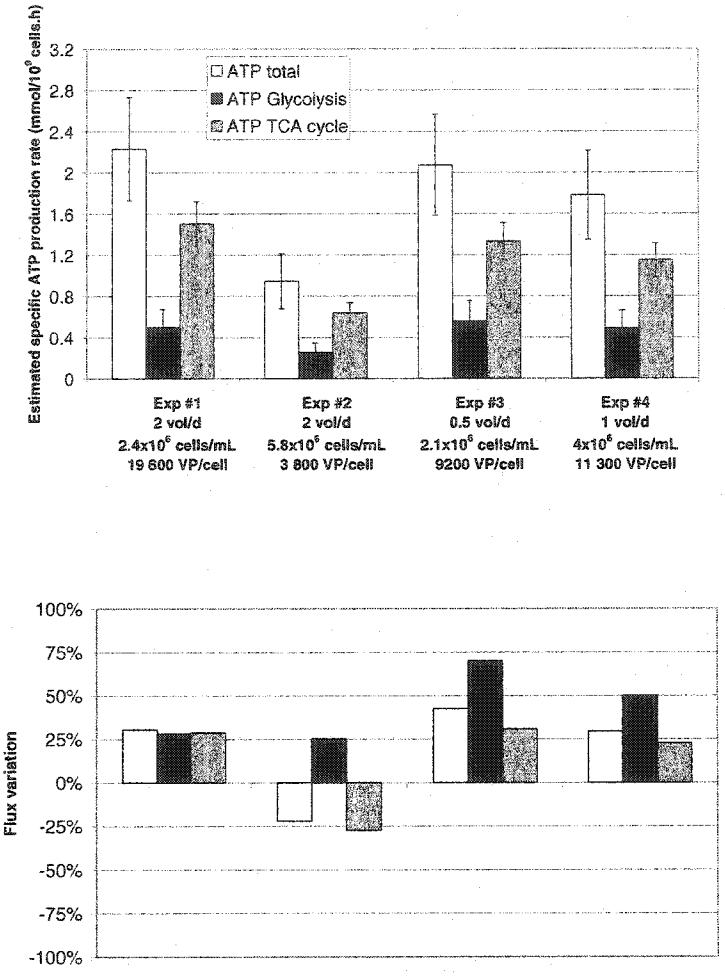


Figure 6.9 Predicted ATP flux during infection and percentage of variation compared to the values estimated prior to infection.

6.2.5 Conclusion

The factors limiting the productivity of cultures infected at high cell densities have not been elucidated to date. Therefore, it is of critical importance to maintain the cells in a desirable state before proceeding with an infection to ensure a good productivity. Using metabolic flux analysis to obtain the distribution of intracellular rates, we have established that productive infections are obtained when cells are infected in a state characterized by elevated glycolytic and TCA fluxes. We have also shown that the estimated ATP production rate constituted a good indicator reflecting the general metabolic activity of the cells. High yield cultures also showed increased Krebs cycle fluxes post-infection, which confirms the importance of monitoring the oxygen uptake rate to assess the quality of an infection. Taken together, the results demonstrate that the cell physiological state dictate, at least in part, the productivity of an infected culture. Our results also suggest that cultures operated at different cell densities can be kept in a desirable state by adjusting the feed rate to maintain similar levels of nutrient and waste metabolites inside the bioreactor. This may serve as a basis for the design of a robust and efficient

process control strategy; on-line physiological state estimation would greatly ease the determination of an appropriate time for cell infection so as to maximise the volumetric productivity.

Acknowledgements

The authors thank Alice Bernier and Louis Bisson for their contribution to this work. Financial support from the National Science and Engineering the Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds Québécois d'Aide à la Recherche (FCAR) is gratefully acknowledged.

6.2.6 References

Balcarcel RR, Clark LM. 2003. «Metabolic screening of mammalian cell cultures using well-plates». *Biotechnol. Prog.* 19:98-108.

Bonarius H, Houtman, J.H.M., Schmid, G., de Gooijer, C.D., Tramper, J. 2000. «Metabolic-Flux Analysis of Hybridoma Cells under Oxidative and Reductive Stress using Mass Balances». *Cytotechnol* 32:97-107.

Bonarius HPJ, de Gooijer CD, Tramper J, Schmid G. 1995. «Determination of the respiration quotient in mammalian cell culture in bicarbonate buffered media». *Biotechnol. Bioeng.* 45:524-535.

Bonarius HPJ, Hatzimanikatis V, Meesters KPH, de Gooijer CD, Schmid G, Tramper J. 1996. «Metabolic FLux Analysis of Hybridoma Cells in Different Culture Media Using Mass Balances». *Biotechnol. Bioeng.* 50:299-318.

Bonarius HPJ, Houtman JHM, de Gooijer CD, Tramper J, Schmid G. 1998. «Activity of Glutamate Dehydrogenase is increased in ammonia-stressed hybridoma cells». *Biotechnol. Bioeng.* 57:447-453.

Bonarius HPJ, Houtman JHM, Schmid G, de Gooijer CD, Tramper J. 1999. «Error analysis of metabolic-rate measurements in mamalian-cell culture by carbon and nitrogen balances». *Cytoechnol.* 29:167-175.

Chan C, Berthiaume F, Lee K, Yarmush ML. 2003. «Metabolic flux analysis of cultured hepatocytes exposed to plasma». *Biotechnol. Bioeng.* 81:33-49.

Cote J, Garnier A, Massie B, Kamen A. 1998. «Serum-free froduction of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells». *Biotechnol. Bioeng.* 59:567-575.

Europa AF, Gambhir A, Fu P-C, Hu W-S. 2000. «Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells». *Biotechnol. Bioeng.* 67:25-34.

Follstad BD, Balcarcel RR, Stephanopoulos G, Wang DIC. 1999. «Metabolic Flux Analysis of Hybridoma Continuous Culture Steady State Multiplicity». *Biotechnol. Bioeng.* 63:675-683.

Frazzati-Gallina NM, Paoli RL, Mourao-fuches RM, Jorge SAC, Pereira CA. 2001. «Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers». *J. of Biotechnol.* 92:67-72.

Garnier A, Cote J, Nadeau I, Kamen A, Massie B. 1994. «Scale-Up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells». *Cytotechnol.* 15:145-155.

Gilbert P-A, Garnier A, Jacob D, Kamen A. 2000. «On-line measurement of Green Fluorescent Protein (GFP) Fluorescence for the Monitoring of Recombinant Adenovirus Production». *Biotechnol. Lett.* 22:561-567.

Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn MR. 1977. «Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5». *J. Gen. Virol.* 36:59-72.

Henry O, Dormond E, Perrier M, Kamen A. 2004. «Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures». *Biotechnol. Bioeng.* in press.

Iyer P, Ostrove JM, Vacante D. 1999. «Comparison of manufacturing techniques for adenovirus production». *Cytotechnol.* 30:169-172.

Jenkins HA, Butler M, Dickson AJ. 1992. «Characterization of glutamine metabolism in two related murine hybridomas». *J. biotechnol.* 23:167-182.

Kallel H, Jouini A, Majoul S, Rourou S. 2002. «Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells». *J. of biotechnol.* 95:195-204.

Kamen A, Tom R, Caron AW, Chavarie C, Massie B, Archambault J. 1991. «Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor». *Biotechnol. Bioeng.* 38:619-628.

Klyushnichenko V, Bernier A, Kamen A, Harmsen E. 2000. «Improved HPLC method in the analysis of adenovirus particles». *J. of Chromatogr B.* 755:27-36.

Kussow CM, Weichang Z, Gryte DM, Hu W-S. 1995. «Monitoring of mammalian cell growth and virus production process using on-line oxygen uptake rate measurement». *Enzyme Microb. Technol.* 17:779-783.

Lee YY, Yap MGS, Hu WS, Wong KTK. 2003. «Low-glutamine fed-batch cultures of 293-HEK serum-free suspension cells for adenovirus production». *Biotechnol. Prog.* 19:501-509.

Lin J, Takagi M, Qu Y, Gao Y, Yoshida T. 1999. «Metabolic flux change in hybridoma cells under high osmotic pressure». *J. Biosci. Bioeng.* 87:255-257.

Martinelle K, Doverskog M, Jacobsson U, Chapman BE, Kuchel PW. 1998. «Elevated glutamate dehydrogenase flux in glucose-deprived hybridoma and myeloma cells: evidence from 1H/15N NMR». *Biotechnol. Bioeng.* 60:508-517.

Merten OW, Manuguerra JC, Hannoun C, van der Welf S. 1999. «Production of influenza virus in serum-free mammalian cell cultures».*Inactivated influenza*

vaccines prepared in cell cultures. Brown F, Robertson JS, Schild GC, Wood JM. Basel: Karger. p 23-27.

Monica TJ, Montgomery T, Ayala JL, Schoofs GM, Whiteley EM, Roth G, Garbutt JJ, Harvey S, Castillo FJ. 2000. «Monitoring Adenovirus Infection with On-line and Off-line Methods». *Biotech. Progr.* 16(5):866-871.

Nadeau I, Garnier A, Cote J, Massie B, Chavarie C, Kamen A. 1996. «Production with the human adenovirus/293S expression system using fed-batch strategies». *Biotechnol. Bioeng.* 51:613-623.

Nadeau I, Gilbert PA, Jacob D, Perrier M, Kamen A. 2002. «Low-protein medium affects the 293SF central metabolism during growth and infection with adenovirus». *Biotechnol. Bioeng.* 77:91-104.

Nadeau I, Jacob D, Perrier M, Kamen A. 2000a. «293 SF Metabolic Flux Analysis during Cell Growth and Infection with an Adenoviral Vector».

Nadeau I, Kamen A. 2003. «Production of adenovirus vector for gene therapy». *Biotechnol. Adv.* 20:475-489.

Nadeau I, Sabatie J, Koehl M, Perrier M, Kamen A. 2000b. «Human 293 Cell Metabolism in Low Glutamine-supplied Culture: Interpretation of Metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis». *Metab. Eng.* 2:277-292.

Nyberg GB, Balcarcel RR, Follstad BD, Stephanopoulos G, Wang DIC. 1999. «Metabolism of Peptide amino Acids by chinese Hamster Ovary Cells Grown in a Complex Medium». *Biotechnol. Bioeng.* 62:324-335.

Perrin P, Madhusudana S, Gontier-Jallet C, Petres S, Tordo N, Merten O-W. 1995. «An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 cell suspension culture process: use of serum-free medium and perfusion-reactor system». *Vaccine* 13(13):1244-1250.

Portner r, Bohmann A, Ludemann I, Markl H. 1994. «Estimation of specific glucose uptake rates in cultures of hybridoma cells». *J. of. Biotechnol.* 34:237-246.

Portner R, Schafer T. 1996. «Modelling Hybridoma Cell Growth and Metabolism - a Comparison of Selected Models and Data». *J. of Biotechnol.* 49:119-135.

Siegwart P, Cote J, Male K, Luong JHT, Perrier M, Kamen A. 1999. «Adaptive control at low glucose concentration of HEK-293 cell serum-free cultures». *Biotechnol. Prog.* 15:608-616.

Singhvi R, Markusen JF, Ky B, Horvath BJ, Aunins JG. 1996. «Assessment of virus infection in cultured cells using metabolic monitoring». *Cytotechnol* 22:79-85.

Stephanopoulos G, Nielsen J, Aristidou A. 1998. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. San Diego: Academic Press.

Wong K, Guardia MJ, Lee S, Hu WS. 1999. «Adenovirus vector production in 293 fed-batch cultures».*Animal cell technology: products from cells, cells as products*. Bernard A, Griffiths B, Noé W, Wurm F. Dordrecht: Kluwer Academic. p 367-369.

Xie L, Pilbrough W, Metallo C, Zhong T, Pikus L, Leung J, Aunins JG, Zhou W. 2002. «Serum-free suspension cultivation of PER.C6 cells and recombinant adenovirus production under different pH conditions». *Biotechnol. Bioeng.* 80:569-579.

Xie L, Wang D. 1996a. «Material balance studies on animal cell metabolism using a stoechiometrically based reaction network». *Biotechnol. Bioeng.* 52:579-590.

Xie L, Wang DIC. 1996b. «Energy Metabolism and ATP Balance in Animal Cell Cultivation Using a Stoichiometrically Based Reaction Network». *Biotechnol. Bioeng.* 52:591-601.

Zupke C, Sinskey AJ, Stephanopoulos G. 1995. «Intracellular Flux Analysis Applied to the Effect of Dissolved Oxygen on Hybridomas». *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:27-36.

6.3 Résultats complémentaires

Dans cette section, on rapporte les résultats de l'analyse des flux métaboliques de cultures qui n'ont pas été présentés dans l'article « HEK-293 cells Physiological state as a determinant of adenoviral vector productivity in perfusion cultures » (Chapitre 6:). Le

Tableau 6-7 résume les principales conditions opératoires des différentes expériences ainsi que la productivité atteinte par ces cultures.

Tableau 6-7 Expériences supplémentaires

Expérience	Densité à L'infection (cellules/mL)	Taux de perfusion (vol/j)	Taux de croissance (h^{-1})	Productivité (VP/cell)
#1	$2.6x10^6$	3	0.028	15 900
#2	$4x10^6$	0.5	0.03	3 000
#3	$4x10^6$	2	0.02	6 800

L'expérience #1 a été effectuée avec un taux de perfusion élevé et une densité cellulaire à l'infection relativement faible. En revanche, l'expérience 2 était en situation de limitation puisqu'infectée à haute densité et opérée à un faible taux de perfusion. Pour l'expérience #3, la même concentration à l'infection a été fixée, mais le taux de perfusion a été augmenté de façon à surmonter les limitations nutritionnelles. Toutefois, pour une raison inconnue, les cellules ont présenté un taux de croissance significativement réduit au cours de cette expérience.

A la lumière des figures présentées dans les pages suivantes, on constate que les tendances évoquées dans les chapitres précédents se confirment. A haute densité cellulaire (expérience #2), les flux sont généralement plus faibles et n'augmentent pas ou peu durant l'infection, ce qui se traduit par une productivité spécifique très faible. Fait à noter, les flux calculés pour l'expérience #1 sont généralement moins précis du fait du taux de perfusion élevé qui augmente l'incertitude de mesure, particulièrement pour la détermination du taux de consommation d'oxygène. Finalement, la baisse marquée du taux de croissance au cours de l'expérience #3 se traduit par une réduction significative de l'activité métabolique des cellules durant la croissance. Ainsi, les flux glycolytiques et dans le cycle de Krebs étaient relativement faibles au moment de l'infection. Cependant, du fait du taux de perfusion plus élevé, cela donne quand même lieu à une meilleure production que pour l'expérience #2.

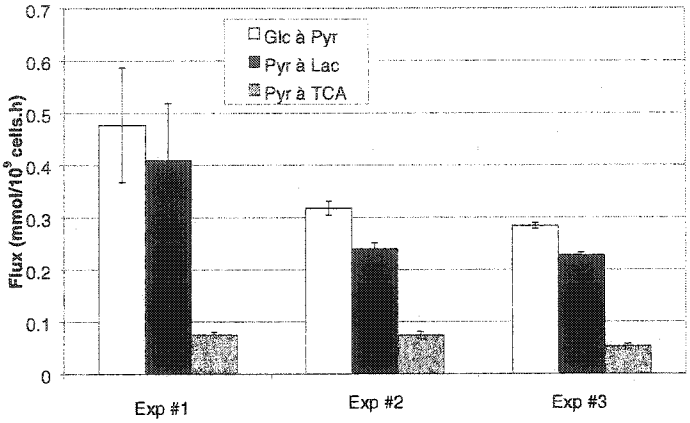


Figure 6.10 Flux Glycolytiques durant la croissance

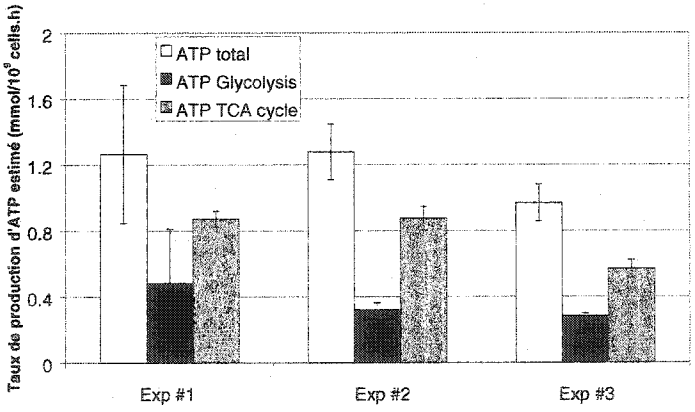


Figure 6.11 Flux d'ATP durant la croissance

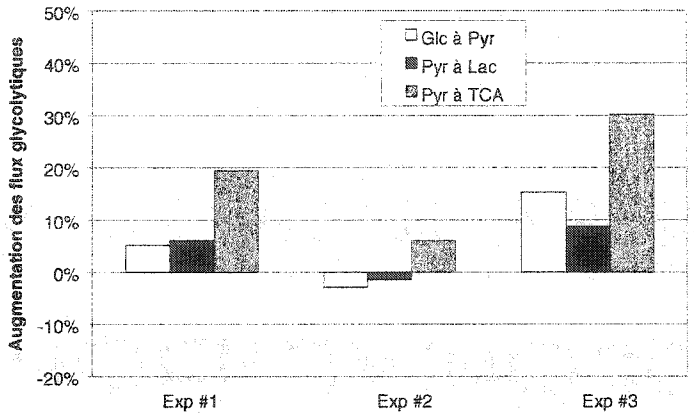


Figure 6.12 Pourcentage d'augmentation des flux glycolytiques durant l'infection

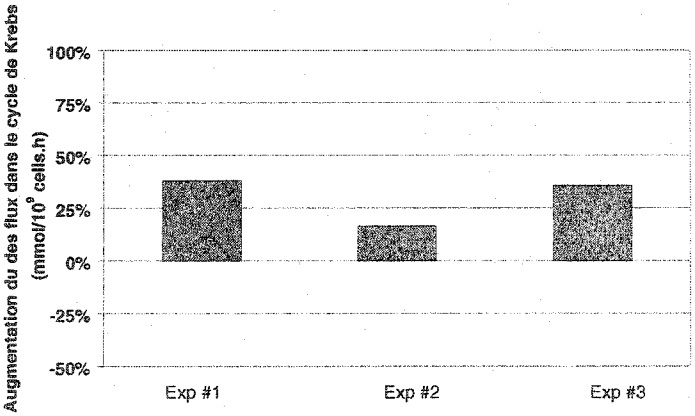


Figure 6.13 Pourcentage d'augmentation des flux dans le cycle de Krebs durant l'infection

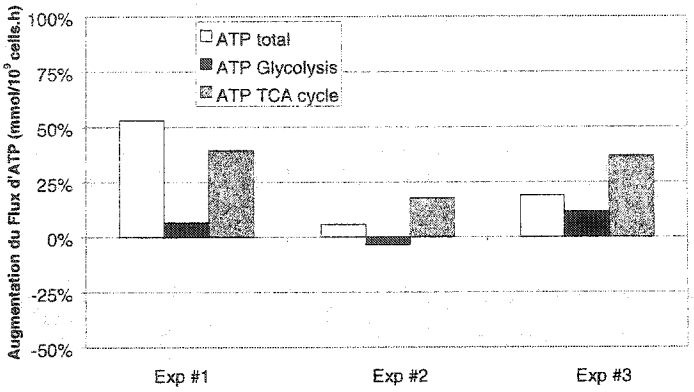


Figure 6.14 Pourcentage d'augmentation du flux d'ATP durant l'infection

CHAPITRE 7: ESTIMATION DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES EN TEMPS RÉEL

Les résultats présentés dans les chapitres précédents ont permis d'établir que la performance des cultures est fortement tributaire de l'état physiologique des cellules. Il a également été démontré qu'on peut caractériser cet état par le biais du calcul des flux métaboliques. Cependant, ce type d'analyse est presque toujours employé *a posteriori* pour étudier les effets des conditions opératoires sur le métabolisme des cellules. Dans le but de permettre une optimisation rapide et éventuellement un meilleur contrôle des cultures, ce chapitre présente une approche permettant d'estimer en-ligne l'état physiologique des cellules.

7.1 Estimation en-ligne des flux métaboliques

L'analyse des flux métaboliques repose essentiellement sur le modèle métabolique et sur les taux spécifiques de consommation et de production. Ces derniers sont évalués à partir des mesures de concentrations des nutriments ou des métabolites effectuées à chaque prise d'échantillon. L'erreur sur les flux

intracellulaires calculés étant directement liée à l'erreur sur les taux de consommation et de production, il est donc primordial d'obtenir de bons estimés pour ces taux. Cette tâche est compliquée pour plusieurs raisons :

- Les données disponibles en ligne sont généralement peu nombreuses.
- Les mesures sont bruitées, une caractéristique inhérente aux systèmes biologiques
- Les paramètres à estimer fluctuent dans le temps, en fonction des conditions environnementales dans le bioréacteur

La stratégie illustrée dans la Figure 7.1 a été employée.

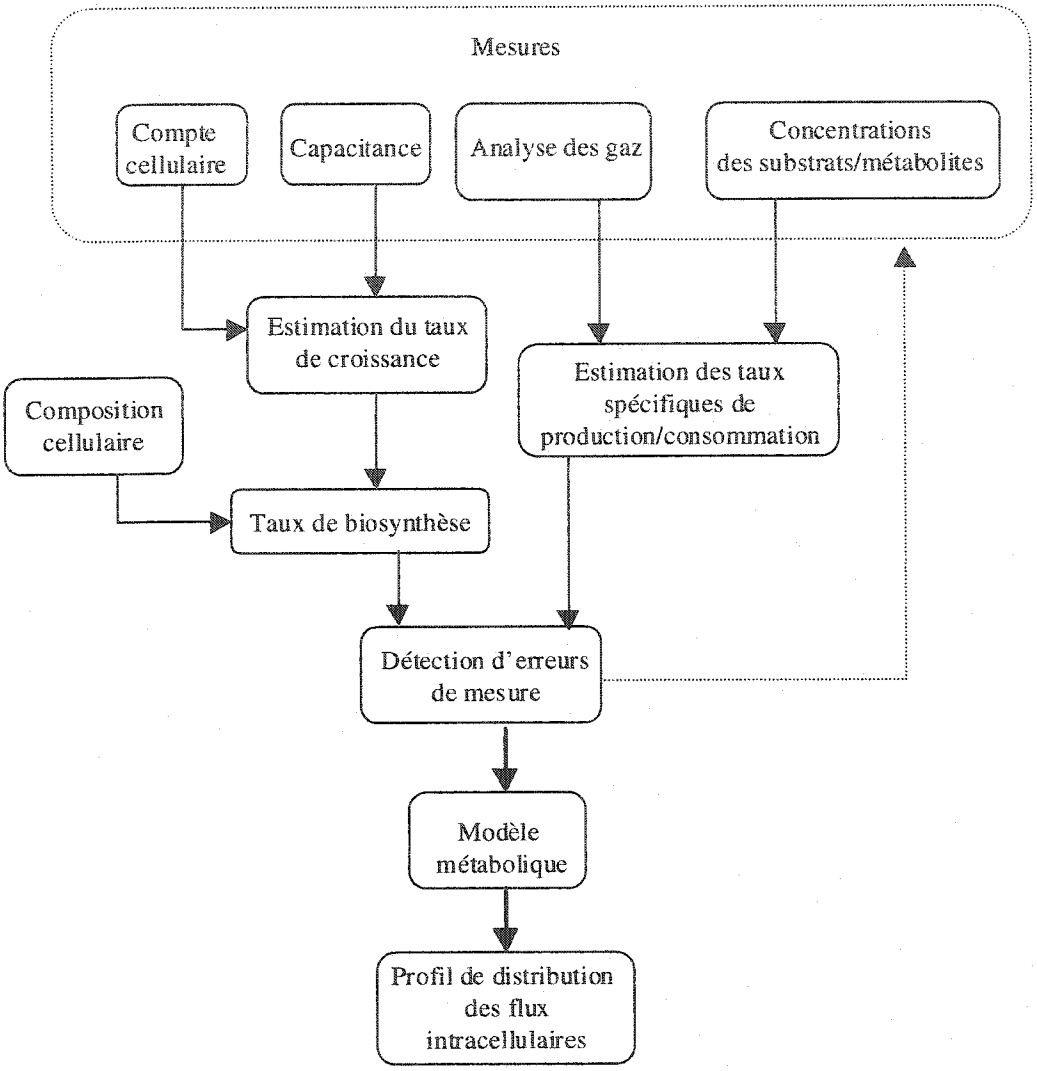


Figure 7.1 Approche pour l'estimation en ligne des flux métaboliques

Les taux spécifiques de consommation de nutriments ou de production de métabolites sont estimés à partir de mesures de concentrations journalières. Les taux biosynthétiques sont évalués en assumant une composition cellulaire fixe

et à partir d'un estimé du taux de croissance. Ce dernier est obtenu à partir d'une mesure en ligne de la capacitance et de comptes cellulaires au microscope. Les taux spécifiques ainsi générés sont préalablement testés pour la présence d'erreur grossière de mesure avant d'être utilisés en conjonction avec le modèle métabolique pour le calcul des flux intracellulaires. Les algorithmes utilisés pour les procédures d'estimation sont détaillés dans les sections suivantes.

7.2 Estimation des taux spécifiques de consommation et de production

Dans cette section, trois techniques d'estimation des taux spécifiques sont présentées : une méthode utilisant un estimateur-observateur, une méthode de moindres carrés récursifs et, enfin, la version « continue-discrète» du filtre étendu de Kalman. Après développement des algorithmes de calcul, leurs performances sont comparées sur des données simulées, puis sur des données expérimentales.

Tel qu'évoqué dans la revue de la littérature, il n'existe pas de modèle suffisamment général pour décrire les taux de consommation ou de production

en fonction de variables simples telles les concentrations ou le taux de croissance. Pour cette raison, dans ce travail aucune relation fonctionnelle n'est assumée, c'est à dire que les taux cinétiques sont uniquement basés sur les équations de bilan de matière spécifique à un bioréacteur opérant en mode perfusion.

7.2.1 Estimateur-observateur

Suivant la démarche décrite dans Bastin et Dochain (1990), un estimateur-observateur pour le taux spécifique de consommation à partir d'une mesure de la concentration du nutriment peut s'écrire :

$$\frac{d\hat{S}}{dt} = \hat{q}X + D(S_{in} - S) - \omega\left(S - \hat{S}\right)$$

$$\frac{d\hat{q}}{dt} = -X\gamma\left(S - \hat{S}\right)$$

La première équation de l'estimateur correspond au bilan de matière sur un nutriment auquel est greffé un terme de correction, proportionnel à l'écart entre les concentrations mesurées et prédites. La seconde équation permet de mettre à jour l'estimé du taux spécifique et comporte l'erreur d'observation multipliée par un paramètre de réglage et un régresseur.

Pour cet estimateur, les dynamiques de l'erreur satisfont les relations suivantes :

$$\frac{d}{dt}\begin{bmatrix}\left(S-\hat{S}\right)\\(q-\hat{q})\end{bmatrix}=\frac{d}{dt}\begin{bmatrix}e\\\rho\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}\omega & X\\\gamma X & 0\end{bmatrix}\begin{bmatrix}e\\\rho\end{bmatrix}+\begin{bmatrix}0\\\frac{dq}{dt}\end{bmatrix}$$

Les fonctions ω et γ peuvent être obtenues à partir des valeurs propres du système. Pour garantir la stabilité du système, les valeurs propres doivent être négatives. En outre, si on choisit des valeurs propres identiques, on obtient les relations suivantes :

$$w=2\lambda$$
$$\gamma=\frac{\lambda^2}{X^2}$$

Le choix de valeurs propres identiques procure un double avantage : d'une part, cela simplifie le calcul des fonctions ω et γ, d'autre part, le réglage de l'observateur se réduit à l'ajustement d'un seul paramètre.

Pour l'implantation, la version discrétisée du système est employée. En appliquant une approximation d'Euler (1er ordre), on obtient :

$$\hat{S}_{t+1} = \hat{S}_t + \Delta t\left[\hat{q}_t X_t + D_t\left(Sin - S_t\right) - \omega_t\left(S_t - \hat{S}_t\right)\right]$$

$$\hat{q}_{t+1} = \hat{q}_t + \Delta t\left[X_t \gamma_t\left(S_t - \hat{S}_t\right)\right]$$

$$\omega_t = 2\lambda \qquad \gamma_t = \frac{\lambda^2}{X_t^{\,2}}$$

où Δt est la période d'échantillonnage.

Pour la forme discrétisée, il importe de déterminer l'intervalle de stabilité. L'erreur est donnée par :

$$\begin{bmatrix} e_{t+1} \\ \rho_{t+1} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1+\omega_t\Delta t & X_t\Delta t \\ \gamma_t X_t \Delta t & 1 \end{bmatrix}\begin{bmatrix} e_t \\ \rho_t \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ q_{t+1} - q_t \end{bmatrix}$$

Les valeurs propres du système discret sont alors données par:

$$\lambda_{1,2} = 1 + \lambda \Delta t$$

L'observateur est stable si les valeurs propres sont contenues dans le cercle unitaire. Les conditions de stabilité sont donc :

$$|1 + \lambda \Delta t| < 1 \quad \Rightarrow \quad \frac{-2}{\Delta t} < \lambda < 0$$

Le choix d'une valeur appropriée pour le paramètre de réglage λ est un compromis entre la vitesse de convergence et la sensibilité au bruit de mesure.

7.2.2 Estimation par un algorithme de moindres carrés récursifs

À partir de l'équation de bilan sur le substrat, il est possible d'estimer le taux de consommation par une méthode de moindres carrés récursifs (RLS) (Hsia 1977).

L'algorithme est donné par les équations suivantes :

$$\hat{q}_t = \hat{q}_{t-1} + \Delta t \phi_t X_{t-1} \left[S_t - S_{t-1} - \Delta t D_t \left(S_{in} - S_t \right) + \Delta t \hat{q}_{t-1} X_{t-1} \right]$$

$$\phi_t = \frac{\phi_{t-1}}{\lambda_f + \Delta t^2 X_{t-1}^{\ 2} \phi_{t-1}}$$

où λ_f est un facteur d'oubli et le paramètre ϕ est la covariance de l'estimation. Le facteur d'oubli a pour effet de donner plus d'importance aux données récentes. Habituellement, ce facteur prend des valeurs très proches, mais inférieures à 1.

7.2.3 Filtre étendu de Kalman

Dans la forme « continue-discrète » du filtre de Kalman, l'algorithme comporte deux étapes. Tout d'abord, il y a une étape de prédiction pendant l'intervalle de temps entre deux mesures expérimentales. Au cours de cette étape, l'incertitude sur les estimés augmente avec le temps. La seconde étape en est une de correction et est effectuée au moment de chaque nouvelle mesure.

Étape de prédiction:

$$\left.\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= qX + D(S_{in} - S) \\ \frac{dq}{dt} &= 0 \\ \frac{dP}{dt} &= AP + PA^T + Q \end{aligned}\right\} \; t_k \le t \le t_{k+1}$$

où P est la matrice de covariance de l'erreur d'estimation et Q la covariance du bruit du système. Lorsqu'une nouvelle mesure est disponible, le taux prédit est corrigé par un terme proportionnel à la différence entre les concentrations mesurée (S_M) et prédite ($\hat{S}$).

Étape de correction:

$$\begin{bmatrix} S \\ q \end{bmatrix}_F = \begin{bmatrix} S_M \\ q \end{bmatrix} + K(t)\left[S_M - \hat{S}\right]$$

et où K est le gain du filtre optimisé à chaque mesure selon :

$$K = P(t)H^T(t)\left[H(t)P(t)H^T(t) + R\right]^{-1}$$

avec R, la matrice de covariance du bruit de mesure, rendant compte de la confiance accordée à la mesure.

La matrice H est donnée par le vecteur [1 0] correspondant au Jacobien de la fonction h dans :

$$S_M(t) = h\big(S(t)\big) + e_M = S(t) + e_M$$

où e_M est le bruit de mesure. Cette matrice fait tout simplement le lien entre les paramètres du système et les mesures.

La covariance de l'erreur est également mise à jour à l'étape de correction selon :

$$P_F(t) = \big[I - K(t)H(t)\big]P(t)$$

On note que le gain du filtre de Kalman (K) est proportionnel à la variance de l'erreur d'estimation et inversement proportionnel à l'intensité du bruit de mesure. Le compromis entre la confiance dans le modèle et la confiance dans les mesures est déterminé par les matrices de covariance R et Q, qui constituent les paramètres de réglage.

7.3 Simulations des algorithmes

7.3.1 Génération de données

Afin de déterminer les paramètres de réglage et d'évaluer la performance des divers algorithmes d'estimation, des données ont été générées en simulant le fonctionnement d'un réacteur opéré en mode perfusion. Les paramètres utilisés pour les simulations correspondent à des valeurs moyennes obtenues expérimentalement et sont rapportés dans le Tableau 7-1.

Tableau 7-1 Valeur des paramètres utilisés pour les simulations

Taux de perfusion (D)	$\begin{cases} 0 & t < 50\,h \\ 0.042\ \text{h}^{-1} & t \geq 50\,h \end{cases}$
Taux de croissance (μ)	0.028 h^{-1}
Efficacité de la rétention cellulaire $\left(1-\frac{X_H}{X}\right)$	95 %
Concentration de substrat dans le milieu (S_{in})	28 mM
Taux spécifique de consommation (qs)	$2\text{x}10^{-10}$ mmol/cell.h ou $2\text{x}10^{-10}\left(\frac{4x10^5}{X}+1\right)$

Afin de reproduire le mieux possible les conditions expérimentales, une période de 50 heures est allouée pour la croissance en mode batch, puis l'alimentation est débutée et maintenue constante à un taux de perfusion correspondant à 1 volume/jour.

Pour le taux spécifique de consommation, deux cas ont été considérés. Un taux avec une valeur constante a d'abord été assumé, ce qui correspond à la situation dans laquelle on aurait un coefficient de rendement ($Y_{X/S}$) constant. En réalité, les données expérimentales révèlent plutôt que les taux de consommation semblent décroître dans le temps, probablement en fonction de la diminution de la concentration du substrat ou l'augmentation de la concentration cellulaire (Portner et Schafer 1996). Pour évaluer l'habilité des différentes méthodes à estimer un paramètre variable dans le temps, un profil a été imposé dans lequel le taux de consommation est proportionnel à l'inverse de la concentration cellulaire. Il a été rapporté que ce type de relation permettait de décrire les données obtenues pour plusieurs lignées cellulaires (Portner et al. 1994).

Le nombre de points expérimentaux obtenus en cours de culture étant limité, un intervalle d'échantillonnage de 10 heures a été assumé. Les valeurs utilisées pour le calcul des taux ont donc été extraites des données générées par simulation, auquelles a été greffé un bruit de mesure (typiquement, de 3 à 10 %

pour la concentration de substrat et de 10 à 20 % pour la concentration cellulaire).

Des exemples de profils générés sont montrés pour un taux de consommation constant (Figure 7.2) et pour un taux de consommation variable (Figure 7.3) dans les pages suivantes.

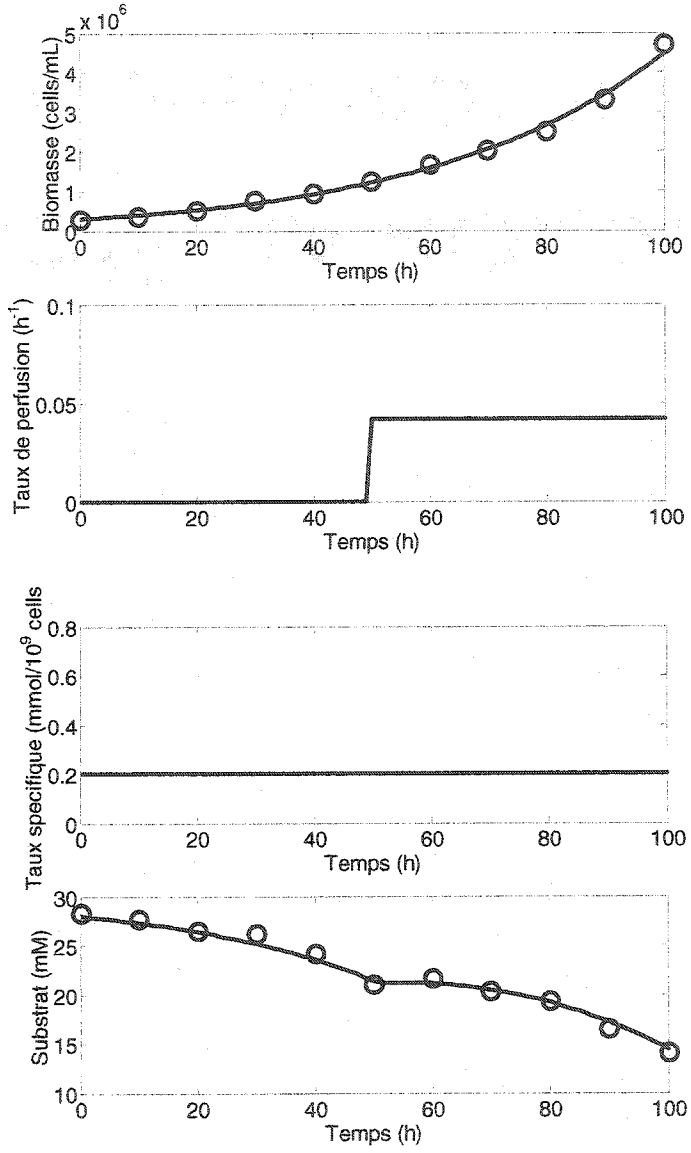


Figure 7.2 Profils simulés de la croissance cellulaire et de la concentration de substrat pour un taux de consommation constant.

Des erreurs relatives de mesure de 5 % sur la concentration de substrat et de 10 % sur la concentration cellulaire ont été assumées pour simuler des données expérimentales (cercles).

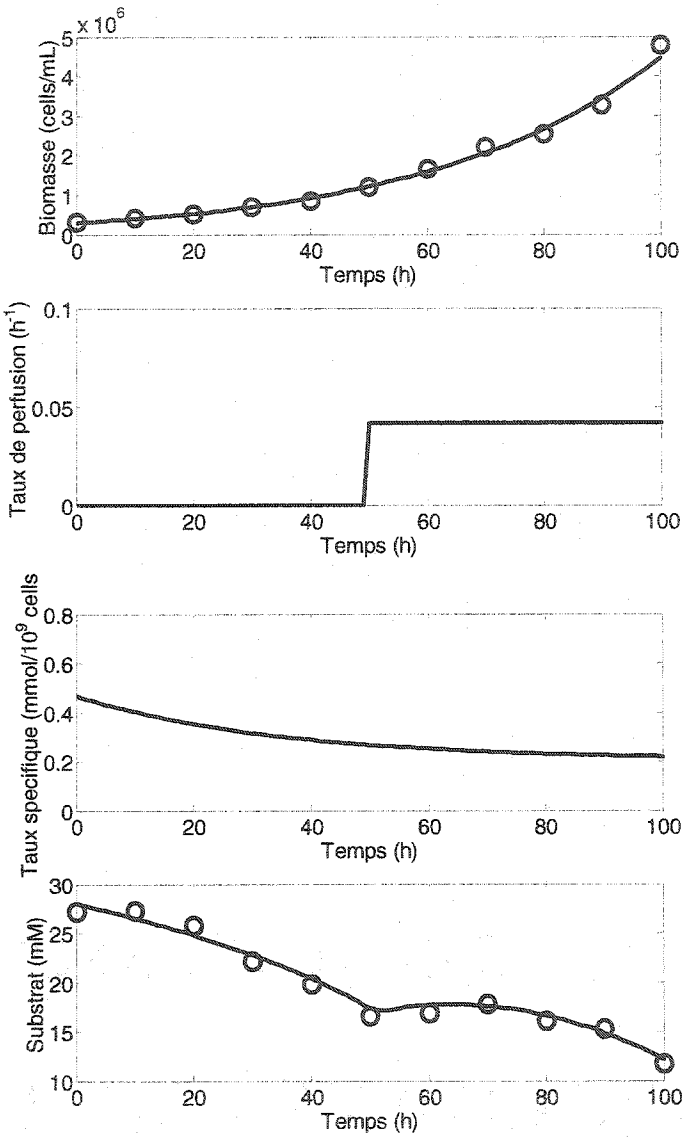


Figure 7.3 Profils simulés de la croissance cellulaire et de la concentration de substrat pour un taux de consommation variable.

Des erreurs relatives de mesure de 5 % sur la concentration de substrat et de 10 % sur la concentration cellulaire ont été assumées pour simuler des données expérimentales (cercles).

7.3.2 Réglage des algorithmes d'estimation

Les différents algorithmes d'estimation ont été réglés à partir de données générées par simulation. Le choix des paramètres est discuté dans les sections qui suivent.

7.3.2.1 Observateur-estimateur

Le réglage de cet estimateur se limite au choix de la valeur propre (λ). Ce choix doit être un compromis entre la vitesse de convergence et la sensibilité au bruit de mesure. Une valeur équivalente à $\frac{-1}{\Delta t}$ a été employée, où Δt est l'intervalle de temps entre chaque échantillon.

7.3.2.2 Estimateur RLS

Cet algorithme comporte essentiellement deux paramètres à régler. Lorsque l'erreur d'estimation est grande, la sensibilité de l'estimateur peut être accrue en choisissant une valeur plus faible pour le facteur d'oubli (λ_f). Les simulations ont permis d'établir qu'une valeur d'au moins 0.95 était requise, sinon la

sensibilité trop grande de l'estimateur conduit à des fluctuations importantes. L'autre paramètre à fixer est la covariance initiale (γ_0). Elle peut être choisie approximativement égale au carré de l'erreur associée à la valeur initiale du taux. Cette valeur initiale et l'erreur qui s'y rattache sont estimées à partir des 2 premiers points expérimentaux disponibles.

7.3.2.3 Filtre de Kalman étendu

La matrice de covariance initiale (P_0) est assumée diagonale et les variances sont déterminées à partir des valeurs initiales, comme dans le cas de l'estimateur RLS. À partir de données expérimentales, on peut également évaluer la covariance de l'erreur de mesure (R).

Le principal paramètre de réglage est donc la matrice de covariance du bruit du système (Q). Le choix de Q est fait en fonction de la matrice R, selon la confiance qu'on donne à la prédiction du modèle versus la confiance qu'on attache aux mesures. Ainsi, une valeur de Q beaucoup plus grande que R indique que les mesures sont plus fiables que la prédiction du modèle, et donc plus de poids sera conféré aux mesures dans l'estimation des paramètres. L'inverse est vrai

également pour une matrice Q plus faible que R. À partir des simulations, les éléments de la diagonale de Q ont été fixés à 0.001 mM^2 et 0.0005 h^{-4} et les autres éléments de la matrice à zéro.

7.3.3 Comparaison des méthodes d'estimation

Les méthodes d'estimation ont été comparées entre elles, mais aussi avec deux autres approches : le calcul direct et une méthode basée sur une interpolation par des splines cubiques.

Pour le calcul direct des taux de consommation, une approximation par différence finie est employée entre le point actuel et le point précédent selon l'équation suivante:

$$q_s = -\frac{1}{x}\cdot\left[\frac{ds}{dt} - D\cdot(s_{in}-s)\right] \cong -\left(\frac{2}{x_t + x_{t-1}}\right)\cdot\left[\left(\frac{s_t - s_{t-1}}{t_t - t_{t-1}}\right) - D\cdot(s_{in}-s_t)\right]$$

Le taux est assumé constant entre chaque prise d'échantillon.

La deuxième méthode consiste à effectuer une interpolation des données de concentrations au moyen de splines cubiques. Contrairement à la méthode directe, cette approche permet de calculer les taux à tout moment, grâce aux points générés entre chaque mesure expérimentale. Toutefois, la validité des résultats est tributaire de la justesse de l'interpolation.

La Figure 7.4 présente les résultats obtenus par les différentes méthodes sur une même série de données. Dans chaque sous-figure, les valeurs estimées sont comparées à la valeur théorique (ligne pointillée) et aux valeurs obtenues par calcul direct par différence finie. La Figure 7.5 est similaire mais correspond à une série de données générées en assumant un bruit de mesure d'une plus grande amplitude.

On constate que le calcul direct peut conduire à de larges fluctuations. Ceci est principalement attribuable au fait que l'effet du bruit de mesure est amplifié par le calcul approximatif de la dérivée première pour obtenir le taux de consommation. L'utilisation d'algorithme d'estimation permet de réduire ces fluctuations et les prédictions s'approchent davantage de la valeur théorique. Ces figures révèlent également que la technique basée sur une interpolation s'avère généralement peu exacte et introduit des dynamiques qui sont le

résultat d'artifices de calcul pour lisser les données (Figure 7.5). Il est possible que de meilleurs résultats puissent être obtenus par interpolation, par exemple en imposant des conditions de continuité permettant d'éviter de telles fluctuations, mais ces méthodes n'ont pas été explorées dans le cadre de cette thèse.

Afin d'évaluer la performance des différents algorithmes d'estimation, le critère d'erreur suivant a été utilisé :

$$Erreur = \sum_{20}^{100} (\hat{q} - q)^2$$

Plusieurs simulations à différents niveaux de bruits de mesures ont été réalisées et les résultats sont présentés dans le Tableau 7-2.

Tableau 7-2 Comparaison des méthodes pour l'estimation d'un taux constant

% Erreur sur S	% Erreur sur X	Erreur				
		Obs	RLS	EKF	Spline	Calcul direct
3	10	0.08	0.07	0.05	0.31	0.22
3	10	0.35	0.13	0.04	0.18	0.28
5	15	0.44	0.23	0.22	0.97	0.75
5	15	0.17	0.34	0.08	1.09	0.85
10	20	0.58	0.37	0.29	2.45	1.21
10	20	0.86	0.73	0.26	3.07	3.18

RLS : moindres carrés récursifs
EKF : Filtre de Kalman
Obs : Observateur-estimateur

À la lumière des résultats du Tableau 7-2 on constate que les estimations par le filtre de Kalman et la méthode de moindres carrés récursifs sont généralement meilleures que celles obtenues par les autres approches. Le gain est particulièrement appréciable à mesure que les erreurs sont grandes. On constate également que l'interpolation n'améliore pas significativement les résultats obtenus par calcul direct.

Les algorithmes ont ensuite été testés dans la situation plus réaliste où le taux de consommation à estimer varie dans le temps. Les profils obtenus sont montrés à la Figure 7.6 et à la Figure 7.7 pour des niveaux de bruit différents.

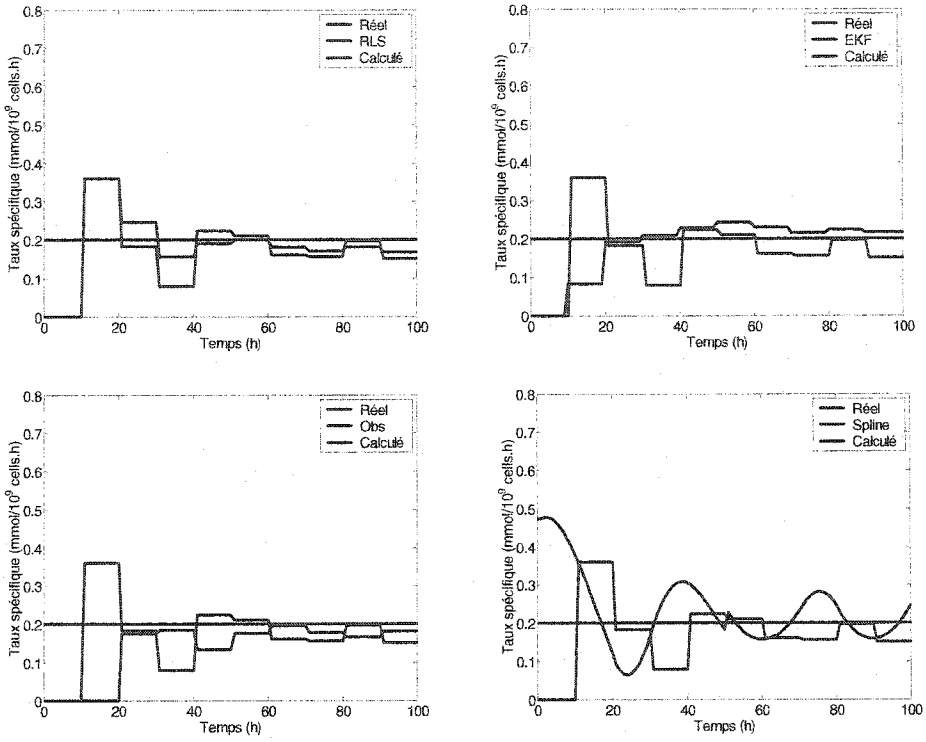


Figure 7.4 Estimation d'un taux de consommation constant avec une erreur relative de 10 % sur la concentration cellulaire et de 3 % sur la concentration de substrat.

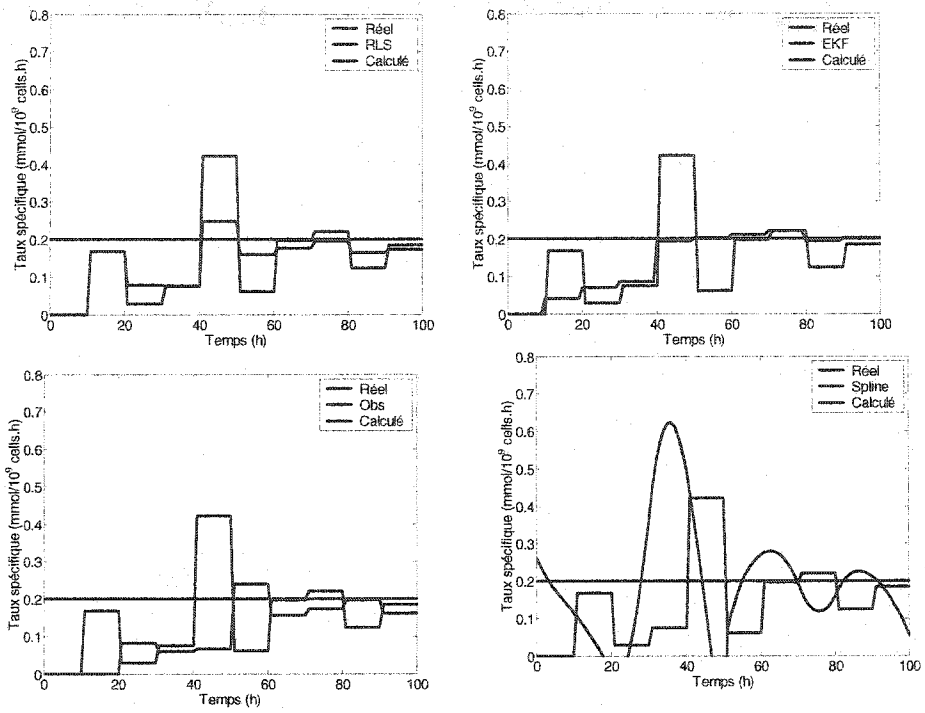


Figure 7.5 Estimation d'un taux de consommation constant avec une erreur relative de 20 % sur la concentration cellulaire et de 10 % sur la concentration de substrat.

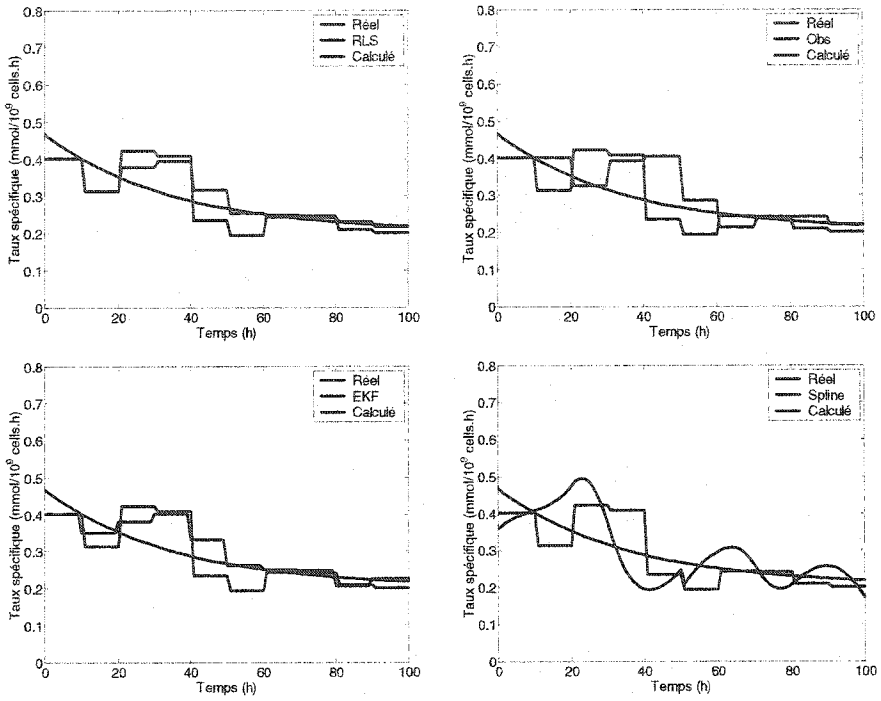


Figure 7.6 Estimation d'un taux de consommation variable avec une erreur relative de 10 % sur la concentration cellulaire et de 3 % sur la concentration de substrat.

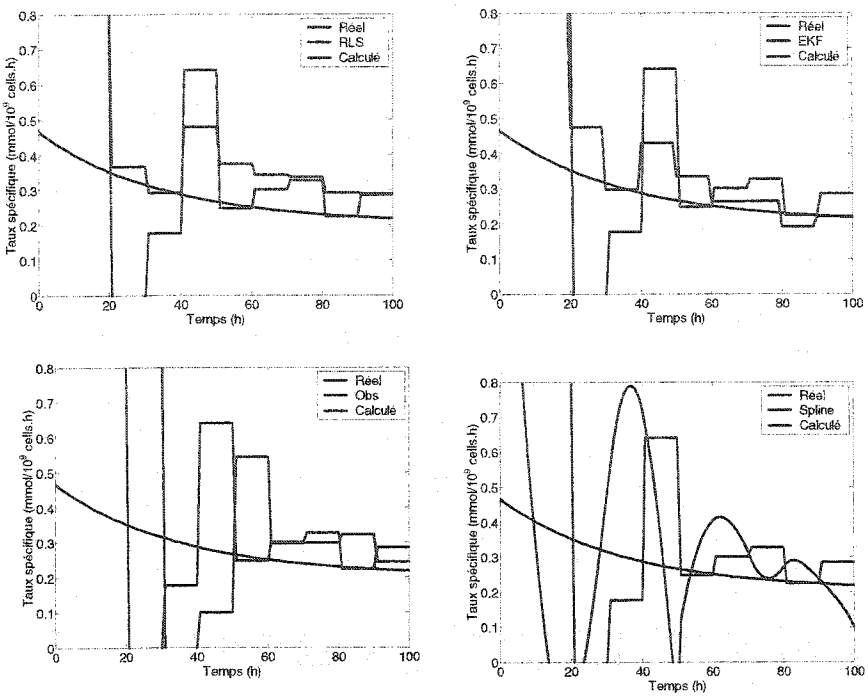


Figure 7.7 Estimation d'un taux de consommation variable avec une erreur relative de 20 % sur la concentration cellulaire et de 10 % sur la concentration de substrat.

Avec un taux de consommation variable, les algorithmes parviennent à estimer raisonnablement le profil théorique lorsque le bruit de mesure est modéré (Figure 7.6). Cependant, plus l'erreur augmente (Figure 7.7), plus la performance se dégrade.

Les résultats de plusieurs simulations sont présentées dans le Tableau 7-3.

Tableau 7-3 Comparaison des méthodes pour l'estimation d'un taux variable

% Erreur sur S	% Erreur sur X	RLS	EKF	Obs	Spline	Calcul direct
3	10	0.14	0.22	0.31	0.53	0.41
3	10	0.05	0.05	0.13	0.14	0.13
5	15	0.17	0.18	0.90	1.14	1.61
5	15	0.50	0.39	1.06	1.38	2.54
10	20	1.98	1.22	9.52	4.08	8.93
10	20	1.06	0.72	2.46	4.12	2.93

RLS : moindres carrés récursifs
EKF : Filtre de Kalman
Obs : Observateur-estimateur

De ces résultats, on tire des conclusions analogues à celles rapportées pour le Tableau 7-2, à savoir que le filtre de Kalman et les moindres carrés récursifs procurent les meilleurs estimés.

7.4 Performances de l'estimation des taux à partir de données expérimentales

Bien que les simulations effectuées tentent de refléter le mieux possible les conditions expérimentales, la prochaine étape consiste à valider l'approche sur de véritables données expérimentales. En cours de culture, plusieurs facteurs difficilement quantifiables peuvent venir s'ajouter à l'erreur de mesure : fluctuations du niveau dans le réacteur, dans le débit d'alimentation, au niveau de l'efficacité de rétention, dans la calibration des sondes, dans la composition du milieu (principalement dues au fait que ce milieu se dégrade dans le temps).

La Figure 7.8 présente les taux de consommation estimés au cours d'une perfusion effectuée à un taux d'alimentation de ½ volume/j. Les principaux nutriments (glucose et glutamine) et métabolites (lactate et ammoniac) y figurent. Les résultats obtenus par un filtre de Kalman fluctuent beaucoup

moins que ceux obtenus par calcul direct. En particulier, on note que l'approximation par différences finies introduit beaucoup d'erreur au moment où l'alimentation est débutée (vers 48 h).

Le taux réel étant bien sûr inconnu, on ne peut juger de l'exactitude de l'estimation. Cependant, on peut tout de même comparer les concentrations prédites par les taux estimés avec les valeurs mesurées expérimentalement (Figure 7.9). On observe que, dans l'ensemble, la technique du filtre de Kalman permet de décrire adéquatement les résultats expérimentaux. Elle constitue donc un outil valable pour estimer les profils de taux spécifiques nécessaires pour le calcul des flux métaboliques.

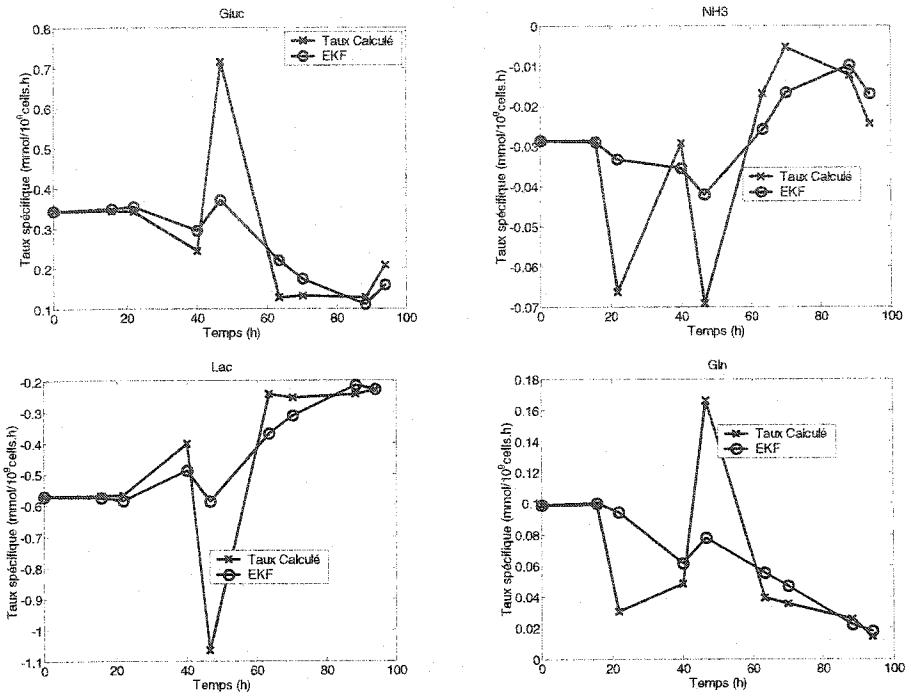


Figure 7.8 Comparaison entre les taux de consommation estimés par un filtre de Kalman et par calcul direct pour des données expérimentales.

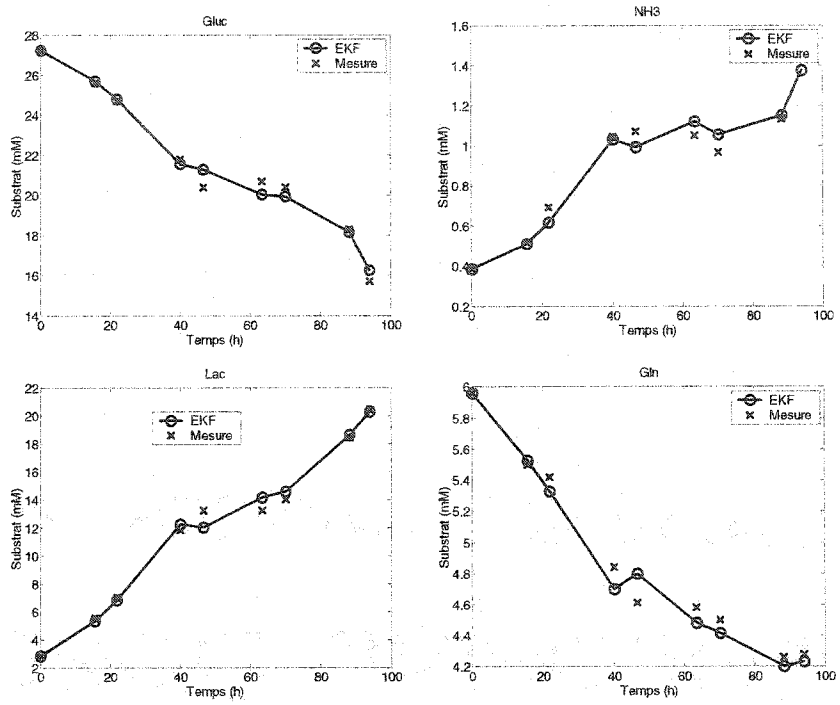


Figure 7.9 Comparaison entre les concentrations prédites par le filtre de Kalman et les mesures expérimentales.

7.5 Estimation en ligne du taux de croissance

7.5.1 Algorithme d'estimation

Pour le calcul des taux biosynthétiques, il est nécessaire de connaître le taux de croissance. Dans des bioréacteurs opérant en perfusion, la détermination du taux de croissance est particulièrement sujette à l'erreur puisque ce taux dépend de la concentration de cellules dans le réacteur, du taux de perfusion et de la quantité de cellules perdues dans la récolte (l'efficacité du filtre n'étant jamais de 100 %).

Une sonde montée sur le bioréacteur permet de suivre en ligne la capacitance d'une culture. Cette dernière est proportionnelle au biovolume de la culture (Zeiser et al. 2000). En assumant que le diamètre cellulaire ne varie pas, ce signal est également proportionnel à la concentration de cellules viables dans le bioréacteur.

À partir de cette mesure, on peut faire l'estimation en ligne du taux spécifique de croissance. En appliquant la méthode des moindres carrés récursifs (voir section 7.2.2) on a:

$$\hat{\mu}_t = \hat{\mu}_{t-1} + T\gamma_t X_{t-1}\left[X_t - X_{t-1} - T\hat{\mu}_{t-1}X_{t-1} + TD_{t-1}X_{Ht-1}\right]$$

où X est la concentration cellulaire, T la fréquence d'échantillonage (1 h) et γ la covariance. La covariance (γ) est mise-à-jour par le biais de l'équation suivante:

$$\gamma_t = \frac{\gamma_{t-1}}{\lambda_f + T^2 X_{t-1}{}^2 \gamma_{t-1}}$$

où λ_f est le facteur d'oubli (paramètre de réglage). La concentration de cellules dans la récolte (X_H) et le taux de perfusion (D) ne sont mesurés qu'à chaque nouvelle prise d'échantillon. Les valeurs de ces paramètres sont assumées constantes entre les mesures expérimentales. Les paramètres de la relation linéaire reliant la capacitance à la concentration de cellule sont re-calculés par régression linéaire à chaque nouveau compte cellulaire effectué. Cette procédure permet de calibrer en ligne la sonde de capacitance.

$$X = aC + b$$

7.5.2 Réglage et performance de l'estimateur

La Figure 7.10 présente le profil de mesure de la capacitance d'une culture durant la période de croissance jusqu'au moment de l'infection. À partir de ce

signal en ligne et des mesures hors-ligne de débit et de concentration cellulaire dans la récolte, on parvient à estimer en ligne le taux de croissance (Figure 7.11). Le début de la culture est marquée par une période de croissance faible (phase de latence), phénomène couramment observé lorsque les cultures sont inoculées à relativement basse concentration cellulaire (< $2x10^5$ cell/mL). Le taux de croissance va ensuite grimper et se stabiliser proche de 0.025 h^{-1} durant la phase exponentielle. Dans la Figure 7.11, on montre également l'effet du facteur d'oubli sur l'estimation. Lorsque ce dernier est fixé à 0.9, l'estimation devient très sensible au bruit de mesure et conduit à de larges fluctuations non désirables.

L'effet du second paramètre de réglage, la covariance initiale, est illustré dans la Figure 7.12. On constate qu'une valeur trop élevée rend la dynamique initiale beaucoup trop sensible, mais le comportement de l'estimateur va éventuellement se stabiliser. À l'inverse, une valeur trop faible a un effet encore plus nuisible puisque l'estimateur répond trop lentement en ne réagissant presque plus aux dynamiques du système.

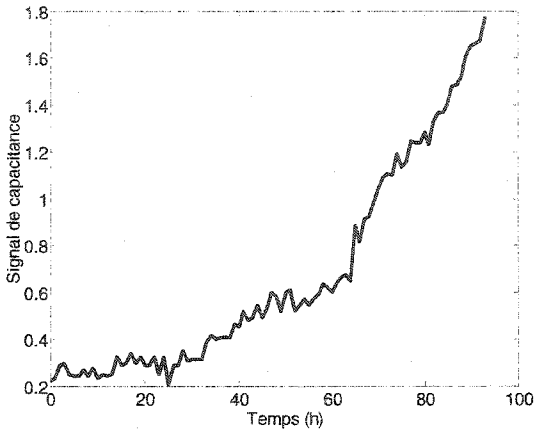


Figure 7.10 Signal brut de capacitance au cours de la phase de croissance d'une culture opérant en mode perfusion.

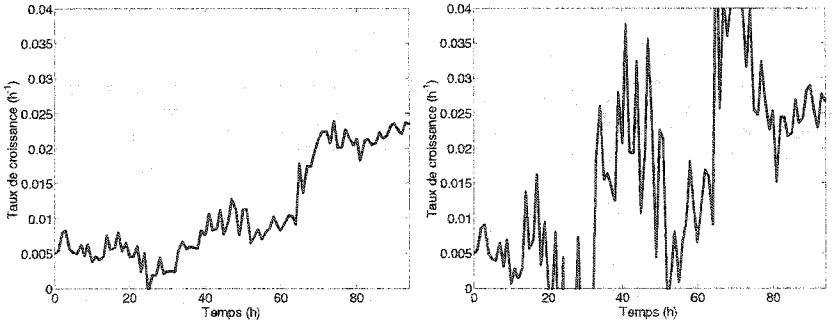


Figure 7.11 Influence du facteur d'oubli sur l'estimation en ligne du taux de croissance. Dans la figure de gauche, $\lambda_f = 0.99$ et dans celle de droite, $\lambda_f = 0.9$.

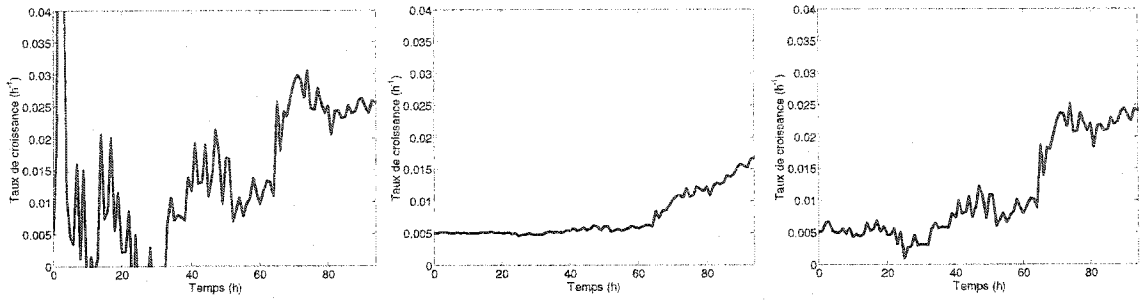


Figure 7.12 Influence de la covariance initiale sur l'estimation en ligne du taux spécifique de croissance.

À gauche, $\gamma_0 = 10$, au milieu $\gamma_0 = 0.01$ et à droite $\gamma_0 = 1$.

À partir du taux spécifique de croissance, on peut obtenir en ligne une estimation de la concentration cellulaire tel qu'illustré dans la Figure 7.13. À chaque nouvelle prise d'échantillon, un compte cellulaire au microscope est effectué et la prédiction s'en trouve ajustée.

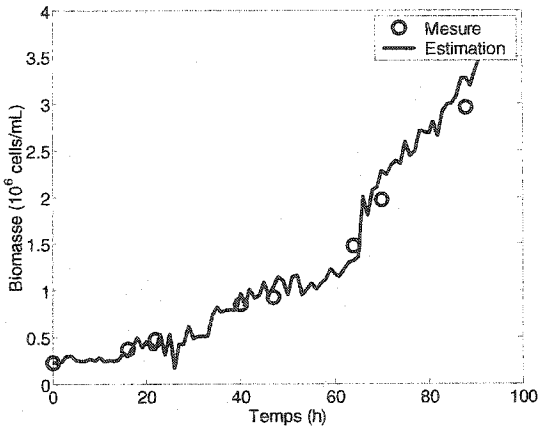


Figure 7.13 Prédiction de la concentration de cellules à partir de l'estimé en ligne du taux de croissance et comptes cellulaires effectués hors-ligne au microscope (cercle).

Le signal de capacitance peut-être passablement bruité à la source. Bien que l'estimateur possède une capacité inhérente pour filtrer, l'utilisation d'un pré-filtre passe bas (Butterworth 1er ordre) a été testée afin de réduire les

fluctuations observées lors de l'estimation des paramètres. Le signal ainsi filtré sert de nouvelle « entrée » pour l'algorithme d'estimation. Tel que montré à la Figure 7.14, cette procédure permet d'obtenir des profils beaucoup plus lisses pour le taux de croissance et la concentration dans le bioréacteur.

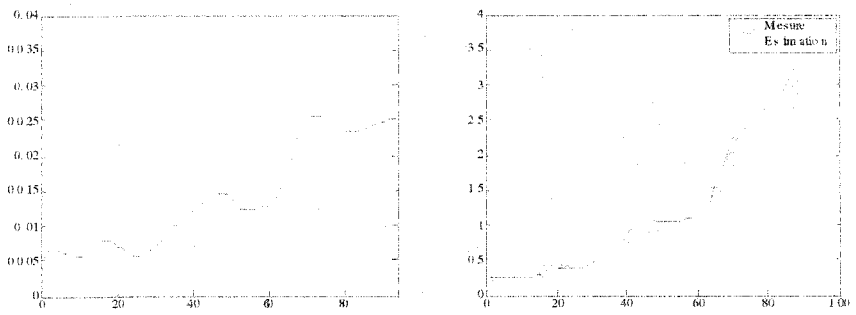


Figure 7.14 Estimation du taux de croissance et prédiction de la densité cellulaire après pré-filtrage du signal de capacitance.

CHAPITRE 8: SUIVI DE CULTURES PAR L'ESTIMATION EN TEMPS RÉEL DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES

8.1 Présentation de l'article

Cette section présente l'article intitulé ***Physiological state monitoring by real-time estimation of metabolic flux in perfusion cultures***. Cet article a été soumis à la revue ***Biotechnology progress***. Les résultats présentés dans le chapitre précédent ayant montré le lien intime entre la productivité des cellules et leur profil métabolique, dans cet article, on s'attarde à développer une approche permettant d'effectuer le suivi de l'état physiologique des cellules en cours de culture. Pour étendre la technique d'analyse des flux métaboliques à une application en temps réel, il a fallu développer des outils permettant d'estimer les différents taux spécifiques requis pour le calcul des flux intracellulaires.

Les taux biosynthétiques sont obtenus en assumant une composition cellulaire fixe et à partir d'un estimé du taux spécifique de croissance, ce dernier étant évalué par le biais d'une mesure en ligne de la capacitance. Les taux spécifiques

de consommation et de production sont quant à eux estimés en utilisant un filtre de Kalman et à partir de mesures de concentrations journalières.

La démarche élaborée permet de suivre l'évolution dans le temps des taux de réactions intracellulaires. Par exemple, durant la phase de croissance, on observe une diminution des flux glycolytiques à mesure que la densité cellulaire augmente. Cependant, durant les heures suivant l'infection, on assiste à l'augmentation progressive de la plupart des flux métaboliques.

Le suivi de certains flux clefs, comme le taux estimé de production d'ATP, permet une optimisation systématique du procédé en suggérant notamment le moment approprié pour procéder à l'infection d'une culture.

Enfin, il est démontré qu'il est possible de maintenir constant les taux intracellulaires en ajustant le taux de perfusion de façon à répondre aux besoins nutritionnels à mesure que la densité cellulaire augmente.

8.2 Physiological state monitoring by real-time estimation of metabolic flux in perfusion cultures

O. Henry[1,2], M. Perrier[2], A. Kamen[1]

[1]Institut de Recherche en Biotechnologie, CNRC, 6100 avenue Royalmount, Montréal, Québec H4P 2R2, Canada;

[2]École Polytechnique de Montréal, Campus de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

8.2.1 Abstract

Kinetics analysis based on extracellular measurements, although essential, only provide a partial information on the true physiological state of the cells during a culture. A better knowledge of the cell metabolism is essential for process optimization and the development of adequate control strategies. Metabolic flux analysis can provide such valuable information, by reflecting the cellular response to changes in culture environment or operating conditions. However, due to the complexity of animal cell systems, the number of measurements required is large and the results are often only obtained *a posteriori*. In this work,

an approach was developed to provide on-line estimates of the intracellular flux distribution of HEK-293 cells grown in perfusion cultures. The metabolic network employed comprised 46 components and 40 biochemical reactions. The specific uptake and production rates needed for the analysis were evaluated from daily nutrient and metabolite concentration measurements, using an extended Kalman-filter for noise reduction and rate estimation. Assuming a constant cellular composition, the biosynthetic reactions were determined from an on-line estimate of the specific growth rate. The later was evaluated from an online capacitance measurement using a recursive least-squares method. Results showed that the glycolytic fluxes decrease with culture time while there is a concomitant increase of pyruvate entrance into the TCA cycle. Following infection, the Krebs cycle activity is significantly increased, except for cultures infected at high cell density, marked by reduced metabolic fluxes. Based on these results, we demonstrate how real-time assessment of intracellular fluxes can be used for rapid process optimization. Finally, it is shown that by manipulating the perfusion rate, it is possible to operate a culture at high cell density while maintaining the cells in a similar physiological state.

8.2.2 Introduction

The design of efficient monitoring techniques and control strategies is instrumental for the rapid development and optimization of bioprocesses. For these methods to be truly effective in detecting the cellular response to environmental changes or operating conditions, they must be based on a profound knowledge of the cell metabolism. With proper assessment of the physiological state of the cells, the optimization can consist in selecting the appropriate operating conditions so as to maintain or drive the culture towards a desirable productive state (Konstantinov 1996; Konstantinov et Yoshida 1989).

To date, most of the on-line monitoring tools derive knowledge on the physiological state indirectly, from extracellular measurements. Cell concentration and viability (Ducommun et al. 2001; Konstantinov et al. 1994) and respiration (Behrendt et al. 1994; Eyer et al. 1995; Lovrecz et Gray 1994; Yoon et Konstantinov 1994; Zeiser et al. 1999; Zhou et Hu 1994) are the parameters commonly measured on-line to assess the physiological state of the cells in culture. Flow injection analysis techniques have also allowed real-time monitoring of various nutrient and metabolite concentrations, such as glucose

(Blankenstein et al. 1994; Ducommun et al. 2001; Male et al. 1997; Siegwart et al. 1999), glutamine (Blankenstein et al. 1994; van der Pol et al. 1994), lactate (Singhvi et al. 1996) and ammonia (Blankenstein et al. 1994) .

However useful for monitoring a production, these process variables only give an incomplete estimate of the metabolic state of the cells. To complement the information of extracellular measurements, intracellular data must be considered as well. This constitutes a challenging task, hampered by the lack of available measurements and the limited applicability of mathematical models, in turn due to the complexity of animal cell systems.

Advances in the development or application of techniques such as NMR (Bonarius et al. 2001; Mancuso et al. 1994; Martinelle et al. 1998; Paredes et al. 1998; Sharfstein et al. 1994; Zupke et Stephanopoulos 1994b), mass spectroscopy (Bonarius et al. 2001) and radioactive tracers (Fitzpatrick et al. 1993; Nadeau et al. 2002) have permitted the development of more accurate metabolic models.

Metabolic flux analysis is an approach that allows to take into account the intracellular reaction rates and has become an established tool to study the metabolism of cells. Flux analysis has been successfully applied to compare the

physiological response of cells under several conditions: comparing different medium (Nadeau et al. 2002), the addition of peptides (Nyberg et al. 1999), different feeding strategies (Nadeau et al. 2000b; Xie et Wang 1994a), under ammonia stress (Bonarius et al. 1998), under low dissolved oxygen (Zupke et al. 1995), the effect of osmotic pressure (Lin et al. 1999), the effect of oxidative or reductive stress (Bonarius 2000), addition of anti-apoptotic agent rapamycin (Balcarcel et Clark 2003), the influence of the dilution rate and the investigation of steady-state multiplicity (Europa et al. 2000; Follstad et al. 1999). Results from the later two studies suggest that depending on the feeding regime, cells can achieve a distinct metabolic state, characterized by different productivity.

From a monitoring point of view, metabolic flux analysis is attractive by the richness of information it can provide. A good illustration is provided by the online state recognition scheme proposed by Takiguchi et al (1997) to better control lysine production in a fermentation process. In their work, a small metabolic model comprising 11 biochemical reactions was used and the flux distribution was determined based on four measurements available on-line. However, to date, metabolic flux analysis applied to animal systems was mostly confined to a descriptive tool, for *a posteriori* assessment of cellular response to culture changes. This can be mainly attributed to the large number of

measurements required for the analysis (nutrients, metabolite products, cellular composition, etc).

An on-line assessment of the culture state can be particularly useful in the case of viral vector production, because to achieve a good volumetric productivity, the timing for infecting a culture is of critical importance. This is related to the observation that the productivity of infected batch cultures decreased significantly with increasing cell densities (Nadeau et Kamen 2003), due to an unknown limitation or inhibition. To overcome this limitation, cultures can be grown in a perfusion mode, whereby continuous supplementation of fresh media and concomitant removal of waste allow to increase the cell density at infection. To maximize the productivity, the appropriate process operating conditions must be determined, namely the perfusion and the cell concentration at the time of infection.

In the present work, metabolic flux analysis was used to get daily estimates of the intracellular fluxes, based on on-line and off-line measurements and assuming a constant cellular composition. The time course of metabolic fluxes in perfusion cultures operated at various flow rates was analyzed. Our results demonstrate that the knowledge of the intracellular flux distribution in relation

with culture operating conditions can provide a rational approach for process optimization.

8.2.3 Material and Methods

Cell line, medium and viral vector

Experiments were performed using the 293SF-3F6 cells derived from the human embryo kidney cells expressing the E1A and E1B proteins constitutively (Cote et al. 1998; Graham et al. 1977). Cells were maintained in T-flasks at 37°C and 5 % CO_2 atmosphere and subcultured twice a week at 1–2x10^5 cells/mL. After three months of maintenance, the cells were discarded and a new aliquot was thawed. Cells were grown in NSFM13, a low-protein serum-free proprietary medium formulation. Inocula were prepared in 0.5 – 2 L shake flasks and the cells were maintained in their exponential phase at a density lower than 1x10^6 cells/mL. For the infection, an adenovirus type 5 containing the Green Fluorescence Protein (GFP) under the control of the CMV promoter was used. Viral stock titres were 1.7x10^{10} IVP/Ll and aliquots were stored at –80 °C.

Bioreactor

The cultures were conducted in a controlled 3.5 L Chemap CF-3000 bioreactor (Mannedorf, Switzerland) equipped with 3 surface baffles. Agitation with two marine impellers was kept constant at 100 rpm and temperature was controlled at 37 °C by a water jacket. The pH (Ingold pH probe, Andover, MA) was maintained at 7.2 by addition of CO_2 or a 1 M NaOH solution. The culture was surface-aerated and the dissolved oxygen concentration was kept at 40 % of air saturation by controlling the fraction of nitrogen and oxygen in the gas inlet. Off-gas analysis was performed using a Servomex 1400 infrared analyser (Norwood, MA). The bioreactor was also equipped with dissolved CO_2 (YSI 8500 CO_2 monitor, Yellow Springs, OH) and biomass (Aber instruments Ltd., Aberystwyth, UK) probes. Data acquisition was performed using FIX MMI software (Intellution, Norwood, MA, USA). Cells were retained in the reactor using a BioSep 10L acoustic filter (Applikon Inc., Foster City, CA).

Analytical methods

During the cultivation period, samples were taken daily for off-line analysis. The cell concentration was determined by microscopic counting using a haemacytometer (Hausser Scientific, Horshaw, PA). Viability was assessed by dye exclusion method using erythrosine. Glucose, lactate and ammonia concentrations were measured using the Biolyzer (Kodak, New Haven, CT). Amino acids concentrations were analysed by HPLC (Kamen et al. 1991). The total virus particle titre was also assayed by HPLC as described in Klyushnichenko et al.(2000).

8.2.4 Real-Time metabolic flux estimation

For intracellular flux computation, the inputs to the metabolic model are specific consumption/production rates. The real-time determination of reliable specific rates is challenging for several reasons:

1) With the lack of reliable sensors, only few meaningful measurements are available on-line.

2) Off-line measurements of nutrient and metabolite concentration are usually sparse. This is mainly attributable to infrequent sampling for sterility concern.
3) The measurements are often corrupted by noise. Moreover, time-differentiation of concentrations data to calculate the specific rates will tend to amplify this noise.
4) Due to the inherent transient nature of batch, fed-batch and perfusion processes, the kinetic rates are expected to vary over the course of a culture as the cell concentration and the environmental conditions change in the culture.

The proposed approach to compute real-time estimates of metabolic fluxes is summarized in Figure 8.1. The specific rates are computed from available on-line measurements (qO2, qCO2, and capacitance), daily off-line measurements (cell concentration, glucose, lactate, ammonia and amino acids) and known parameters (cellular composition). The catabolic rates are estimated from concentration measurements using an extended Kalman filter for noise reduction. The capacitance signal is used to compute an on-line estimate of the growth rate, which in turn is used to evaluate the biosynthetic rates assuming a constant cellular composition (%protein, lipids, RNA/DNA), previously

determined for this cell line (Nadeau et al. 2002). The hypothesis that balanced-growth conditions prevail is verified each time by a data consistency analysis on the generated data. The following sections provide a detailed description of the computation methods involved.

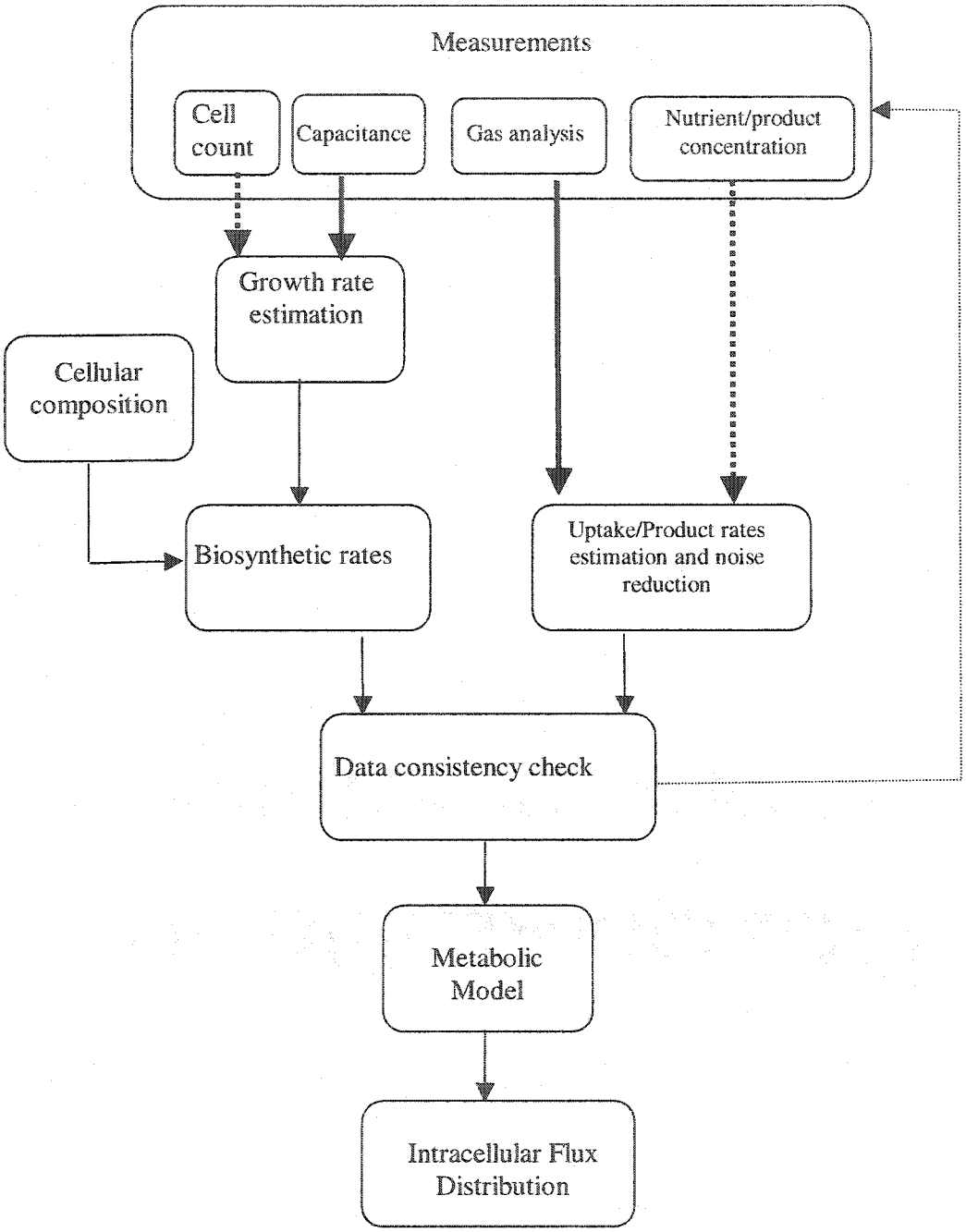


Figure 8.1 Scheme for real-time estimation of intracellular fluxes

Growth rate estimation

Cell concentration must be evaluated for the determination of any specific yield or metabolic rate. Moreover, a good estimation of the growth rate is required to evaluate the biosynthetic rates. From a mass balance on viable cells, we obtain the following equation for a bioreactor operated in perfusion mode:

$$\mu = \frac{1}{X}\left(\frac{dX}{dt} + DX_H\right)$$

where D is the perfusion rate, X the concentration inside the bioreactor and X_H the concentration of cells in the outflow. In perfusion cultures, growth rate determination is particularly subject to noise due to the imprecision of cell counting and fluctuations in cell retention efficiency. This was addressed by using a biomass probe allowing real-time monitoring of the culture capacitance. The later is proportional to the concentration of viable cells (Konstantinov et al. 1994; Zeiser et al. 2000). Based on this measurements, on-line estimation of the specific growth rate was performed using a discrete least-square estimator as described in (Bastin et Dochain 1990). The algorithm is given by:

$$\hat{\mu}_t = \hat{\mu}_{t-1} + \Delta t \gamma_t X_{t-1} \left[X_t - X_{t-1} - \Delta t \hat{\mu}_{t-1} X_{t-1} + \Delta t D_{t-1} X_{H\,t-1} \right]$$

where Δt is the sampling rate. The covariance (γ) is updated by the following equation:

$$\gamma_t = \frac{\gamma_{t-1}}{\lambda + T^2 X_{t-1}{}^2 \gamma_{t-1}}$$

The forgetting factor, λ, is a tuning parameter. Normally chosen close to unity, this parameter has the effect of causing old data values to be exponentially discounted over time. The concentration of cells in the harvest (X_H) and the dilution rate (D) were only re-evaluated at each sample and the values were assumed constant in between experimental measurements. The linear relation assumed between the capacitance signal (C_t) and the cell concentration was also updated at each off-line measurements by linear regression on current and previous data points. This procedure allowed to re-calibrate on-line the biomass monitor system.

$$X_t = aC_t + b$$

Nutrient uptake/Metabolite production rate estimation

In contrast with biomass, only few measurements of substrate and metabolite concentrations are available, typically once or twice a day. The specific uptake and production rates can be calculated using material balances around the bioreactor to yield the following equations:

$$(3)\ \frac{dS}{dt} = -q_S X + D(S_{in} - S)$$

$$(4)\ \frac{dP}{dt} = -q_P X + DP$$

where D is the perfusion rate, q_S and q_P are the specific consumption and production rates, S is the nutrient concentration in the reactor, S_{in} is the nutrient concentration in the feed and P is the metabolite concentration in the reactor.

Due to the large sampling rate, calculation using direct difference from current and past measurement is prone to error. Instead, an extended Kalman filter was employed for rate estimation and noise reduction. This technique has been

successfully applied to bioprocesses for estimation of unmeasured variables (Gee et Ramirez 1996; Pelletier et al. 1994).

In the "continuous-discrete" form of the filter, the correction is made only at discrete times (t_k). In between samples, the rate is assumed constant.

Prediction step:

$$\left.\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= qX + D(S_{in} - S) \\ \frac{dq}{dt} &= 0 \end{aligned}\right\} \; t_k \le t \le t_{k+1}$$

Whenever a new measurements is available, the predicted specific rate is corrected by a term proportional to the difference between the measured (S_M) and predicted (S) nutrient/product concentration according to the following equation.

Correction step:

$$\begin{bmatrix} S \\ q \end{bmatrix}_F = \begin{bmatrix} S_M \\ q \end{bmatrix} + K(t)\left[S_M - \hat{S}\right]$$

where K is the filter gain, which is optimized at each measurement time:

$$K = P(t)H^T(t)\left[H(t)P(t)H^T(t) + R\right]^{-1}$$

The error covariance is also updated according to:

$$P_F(t) = \left[I - K(t)H(t)\right]P(t)$$

The trade off between confidence in the measurements and confidence in the model is determined by the measurement error covariance (R) and the process model covariances (Q) as discussed in (Gee et Ramirez 1996).

Data consistency check

Prior to flux computation, the calculated rates can be tested for the presence of gross measurement errors. This is particularly useful to verify the assumption that the cellular composition may be considered constant. Following the methodology described by Bonarius et al. (1999), two elemental balances on

carbon and nitrogen are used for data consistency analysis. If a gross measurement error is detected, with two redundant equations, the source of error may sometimes be identified by a sequential elimination method, thus allowing to only re-measure the problematic variable. The consistency index (h) can be calculated as:

$$h = \varepsilon^T \varphi^{-1} \varepsilon$$

$$\varepsilon = A \cdot R$$

$$\varphi = A^T \psi A$$

where ψ is the variance-covariance matrix of the measurements contained in R and A is the matrix composition in carbon and nitrogen of the measured compounds. h follows a χ^2 distribution and the degree of freedom is determined by the number of redundant equations (Stephanopoulos et al. 1998). For 2 degrees of freedom, the value of the χ^2 distribution at a 90 % confidence interval is 4.61.

Metabolic flux calculation

For intracellular flux evaluation, the metabolic model developed by Nadeau et al. (2002) for HEK- 293 cells was employed. The reactions considered in this biochemical network are shown in Table I. The metabolic model involves 46 components and 40 fluxes, which include the catabolism pathways of glucose, glutamine and 18 amino acids. The pseudo-steady state assumption is invoked (Zupke et al. 1995) and intermediate metabolite production rates are set to be zero. Mass balances around a cell for each of the metabolites yield the following expression:

M.F = R

M contains the stoichiometric coefficients, F is the vector of 40 unknown metabolic fluxes and R is the vector of measured nutrient uptake and metabolite production rate. Evaluation of the metabolic flux vector F is performed using a weighted linear least-squares:

$$F = (M^T \psi^{-1} M) M^T \psi^{-1} R$$

where ψ is the variance-covariance matrix associated with the measured rate vector R.

Table I. Listing of biochemical reactions included in the metabolic network

1	Glc + ATP → Fruct6P
2	Fruct6P + ATP → 2 GAP
3	GAP → Pyr + 2 ATP + NADH + H^+
4	Pyr + NADH + H^+ → Lac
5	mPyr + CoA → ACCoA + NADH + CO_2 + H^+
6	Pyr + Glu → Ala + ∝KG
7	OAA + Glu → Asp + ∝KG
8	mGln + H_2O → mGlu + NH_3
9	2 Gln +5/4 Asp + Rib5P + ½ Gly + 27/4 ATP + 5/8 NADPH → ADN|ARN + ¾ NADH + ¾ Fum + 2 Glu
10	mMal + 2ATP → mPyr +CO_2 + NADPH + H^+
11	Asp + Gln + ATP → Asn + Glu
12	Glu + ATP + 2 NADPH +2 H^+→ Pro
13	2 Gly → Ser + NH_3
14	G6P + ATP → 1/3 Rib5P + 2/3 Xu5P + 2 NADPH + H^+ + CO_2
15	R5P + 2 Xu5P → 2 Fruct6P + GAP
16	2 (9 Cit + 17 ATP + 9 CoA + 16 NADPH) → AcOLE + 18 OAA
17	Extracellular Proteins → ΣAA
18	ΣAA→ Intracellular Proteins
19	Lys + 2 m∝KG + NADPH → 2 AcCoA + 2 CO_2 + 4 NADH + 3 H^+ + $FADH_2$ + 2 mGlu
20	Leu + m∝KG + ATP → 3 AcCoA + mGlu + CO_2 + NADH + H^+ + $FADH_2$
21	Ile + m∝KG + ATP → SuCoA + AcCoA + CO2 + 2 NADH + 2 H^+ + $FADH_2$ + mGlu
22	Thr → CO_2 + 2 NADH + 2 H^+ + $FADH_2$ + NH_3 + mPyr
23	Val + m∝KG + ATP → SuCoA + 3 NADH + H^+ + $FADH_2$ + 2CO_2 + mGlu
24	Met + Ser + 2 ATP → Cte + SucCoA + NADH + H^+ + CO_2 + NH_3
25	Phe + O_2 + NADPH + H^+ → Tyr
26	Tyr + m∝KG + 2O_2 → Fum + 2 AcCoA +m Glu
27	Arg + m∝KG → mGlu + NADH + H^+
28	His → mGlu + NH_3
29	mOAA + AcCoA → Cit
30	Cit → m∝KG + CO_2 + NAPH + H^+
31	m∝KG → SuCoA + NADH + H^+ + CO_2
32	SuCoA → Fum + ATP + $FADH_2$
33	Fum → mMal
34	mMal → mOAA + NADH + H^+
35	NADH + ½ O_2 → 3 ATP
36	Pyr → mPyr
37	Glu + mAsp → mGlu +Asp
38	Gln → mGln
39	mMal + ∝KG → Mal + m∝KG
40	mGlu + mOAA → mAsp + m∝KG

8.2.5 RESULTS AND DISCUSSION

Growth rate estimation

Figure 8.2 presents the estimation of the specific growth from raw capacitance signal for two perfusion experiments. The cultures were typically grown in batch mode for two days and the perfusion rate was initiated when the cell concentration reached approximately $1x10^6$ cells/mL. Both cultures shown in Figure 8.2 were seeded at low cell concentrations (< $2x10^5$ cells/mL) and, as a result, exhibited reduced initial growth rates and underwent a lag phase. The results demonstrate the ability of the estimator to track the changes in cellular growth as the cell entered exponential phase in a later stage (Figure 8.2E & F). Moreover, correction of the prediction at each new measurement provided good estimates of the cell concentrations inside the bioreactor (Figure 8.2B & C). Although the estimator has an inherent filtering capacity, a smoother signal (Figure 8.2F) can be obtained by using a low pass filter on the raw measurement. The filtered capacitance signal can then be used as the input for the estimation algorithm.

The culture capacitance signal being a function of the total biovolume rather than the cell concentration (Zeiser et al. 1999), it must be emphasized that this estimation technique is only valid if the average cell size remains constant. This is not the case upon infection as the cell volume can increase up to 50 %. This translates into an increase in capacitance, even though cellular growth stops shortly after infection. Therefore, growth rate estimates may only be obtained based on cell counts.

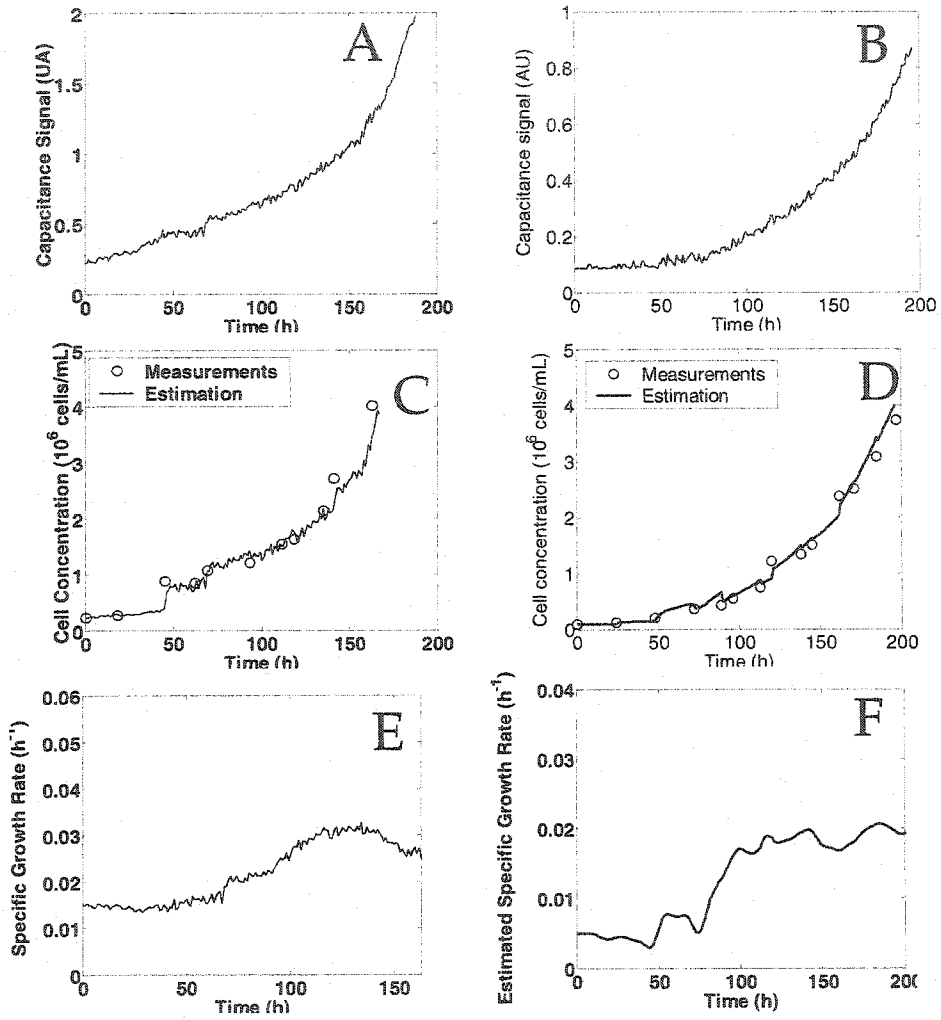


Figure 8.2 Real-time estimation of the specific growth rate (E & F) from on-line capacitance (A & B) and off-line cell count measurements (C & D).

Specific uptake/production rate estimation

The kinetic rates of nutrient consumption and metabolite production obtained on raw and filtered-data are compared in Figure 8.3. The calculated values, obtained by a direct difference between the current and previous measurements, are often very noisy. In particular, the onset of feeding at approximately 50 h introduced some errors in the rate evaluation and the use of an extended Kalman filter helped to attenuate this effect and provided smoother estimates.

In Figure 8.3, both the glucose uptake and the lactate production rate were found to decrease over time, even though the growth rate remained fairly similar (data not shown). Consequently, a maintenance energy model would not give a constant yield coefficient. Rather, the glucose uptake rate is likely a function of the residual concentration (Zeng et Deckwer 1995) or a function of the cell concentration in the culture (Portner et al. 1994). Portner et Schafer (1996) have shown that most of the models published in the literature have a limited applicability to describe experimental data outside the range of conditions in which they were identified. This is why a general structure was

assumed in this work, instead of a functional relationship such as the maintenance-energy model.

Following infection, a sharp increase in glucose uptake and lactate production rate is noted (Figure 8.3). These results are consistent with previous reports showing data from batch and fed-batch experiments (Garnier et al. 1994; Iyer et al. 1999; Nadeau et al. 2002; Xie et al. 2002a). The increase can be related to the increase in cell volume and mass, but also to an increased energy requirement for protein synthesis.

The filtered values were used as the input to the biochemical model for estimating the intracellular flux distribution in the metabolic pathway.

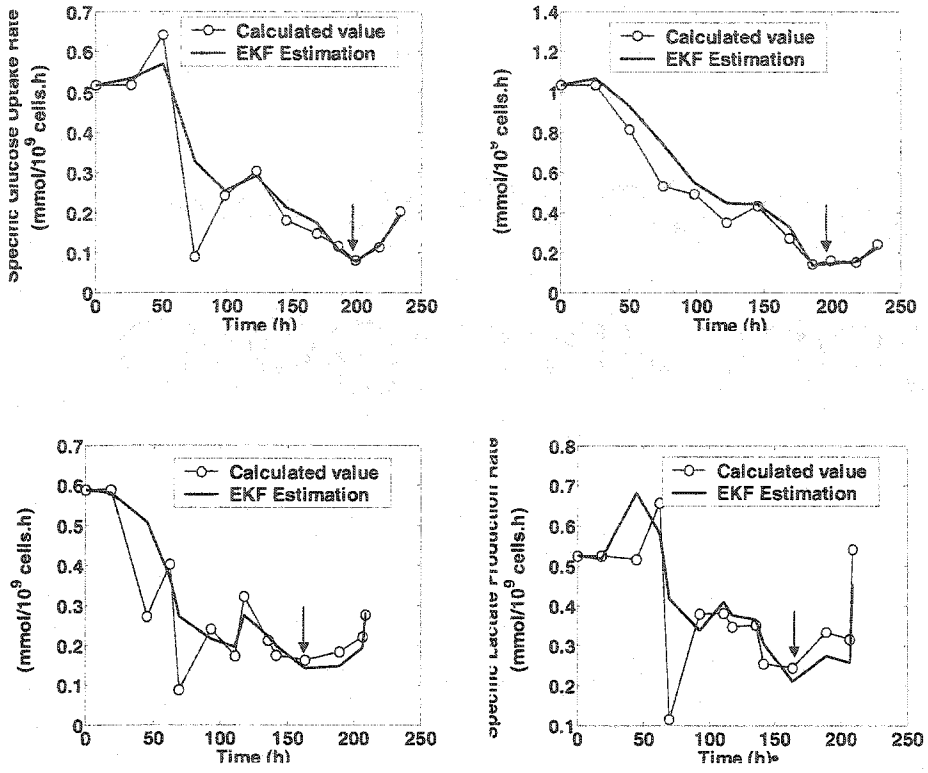


Figure 8.3 Specific glucose uptake and lactate production rates estimation using an extended Kalman filter for two perfusion cultures.

Arrow indicates infection. Calculated values based on a finite difference approximation between current and previous data are also shown. Arrows indicate the time at which the cultures were infected.

Data consistency

Prior to flux estimation, the generated data was tested for the presence of gross measurement errors. Figure 8.4 shows the time course of the calculated consistency index h (see Material and Methods) during two experiments, based on the estimated values obtained by the extended Kalman filter. In the first run, the h values were always below 4.61, which indicate that, at a confidence level of 90 %, no gross measurement errors were present in the data throughout the culture.

In the second experiment, the test failed for the first two measurements. Many factors could explain the discrepancy: the relative imprecision in off-gas measurement at the beginning of a culture, the greater uncertainty associated with low cell concentrations, or the presence of a lag phase. By looking at the residuals, one could determine that a C-containing nutrient was overestimated or the production of a C-containing metabolite was underestimated. Glucose and lactate account for the larger source/sink of carbon and an unlikely molar ratio lactate/glucose of 1 suggest that one these two measurements contained a flaw. Therefore, the flux calculated in that period may be erroneous. The test

also failed for the data points taken more than 30 hours post-infection. Beyond this point, it is likely that the cellular composition is significantly affected by the infection process, since this was a common trend observed for many data sets. However, throughout the growth phase, the assumption of balanced-growth was reasonable.

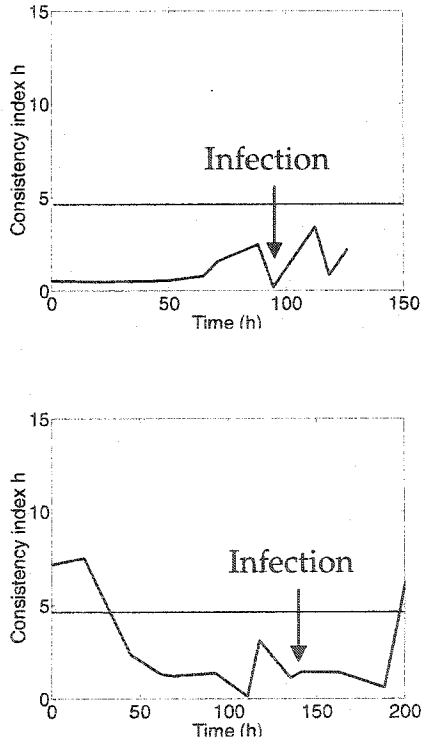


Figure 8.4 Time evolution of the consistency index, h, during two perfusion cultures.

The first run contained no gross measurement errors. In the second experiment, the data gathered in the early stages of the culture and the late phase of the infection did not pass the consistency test and may lead to wrong flux estimates.

Real-Time estimation of intracellular fluxes

Based on the online estimate of the specific growth rate and the determination of specific uptake/production rates, the 40 intracellular fluxes of the metabolic network were computed on a daily basis to follow the time evolution of metabolic rates.

Figure 8.5 presents the results obtained for two perfusions operated at a feed rate of 2 vol/d. One experiment was infected at low cell density ($2.4x10^6$ cells/mL) and the other one at $6x10^6$ cells/mL. The glycolytic fluxes closely followed the glucose uptake rate profiles and exhibited a decrease over time up to the infection time (Figure 8.5). In the early stages of the cultures, most of the pyruvate is converted into lactate and only a small percentage enters the Krebs cyle. With the decrease of glucose intake, there is a concomitant increase of the flux of pyruvate into the TCA cycle. With time, cells are shifting towards a more efficient utilization of glucose, perhaps to compensate for the reduction in ATP

produced by glycolysis. Similar trends have been noted for hybridoma cells grown in continuous bioreactors operated at low dilution rates (Europa et al. 2000; Follstad et al. 1999). However, in our experiment, the residual concentration of glucose was never limiting in the culture medium (data not shown), even at the highest cell concentration reached. As can be seen on Figure 8.5, the overall activity of the Krebs cycles is intimately linked with the entrance of pyruvate into the TCA. This activity was not correlated with growth rate which remained constant for both experiments.

Following infection, the whole cell metabolism experiences a drastic change. The increase glucose uptake rates are correlated with greater TCA activity. The later is also consistent with the increased respiration commonly reported in the literature as an indication of a successful infection (Garnier et al. 1994; Kussow et al. 1995).

In contrast, the culture infected at high cell density showed a continuing reduction in TCA fluxes after infection, and this was correlated with a very low productivity achieved in comparison with the perfusion at low cell density. The mechanisms responsible for the decrease of intracellular fluxes with increasing cell concentrations are unknown. It was hypothesized that autocrine

components might be responsible for changes in the metabolic activity (Shirai et al. 1992). The formation of large aggregates may also induce diffusion limitations and reduce the exposure of the cells to nutrients

In Figure 8.6, the same intracellular fluxes are shown for two perfusions operated at different flow rates (0.5 and 1 vol/d) and infected at different cell density ($2.1x10^6$ cells/mL and $4x10^6$ cells/mL). The flux distribution profiles are fairly similar, which demonstrate that a culture can be performed at higher cell concentrations while maintaining similar nutrient uptake and metabolite production rates profiles. This result suggests that by changing operating conditions, in this case the feed rate, a particular physiological state can be preserved.

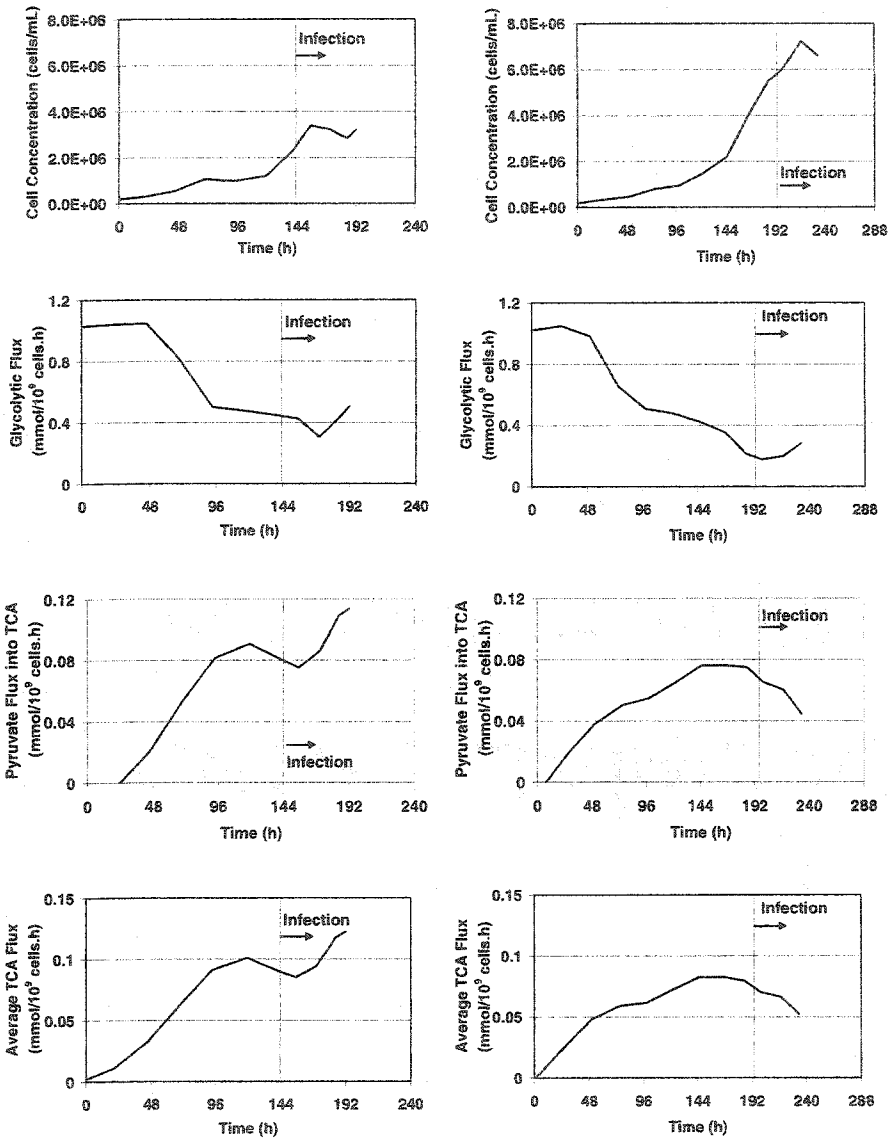


Figure 8.5 Estimated intracellular fluxes for two perfusion operated at 2 vol/d, but infected at low (2.4×10^6 cells/mL) and high cell density (6×10^6 cells/mL), respectively.

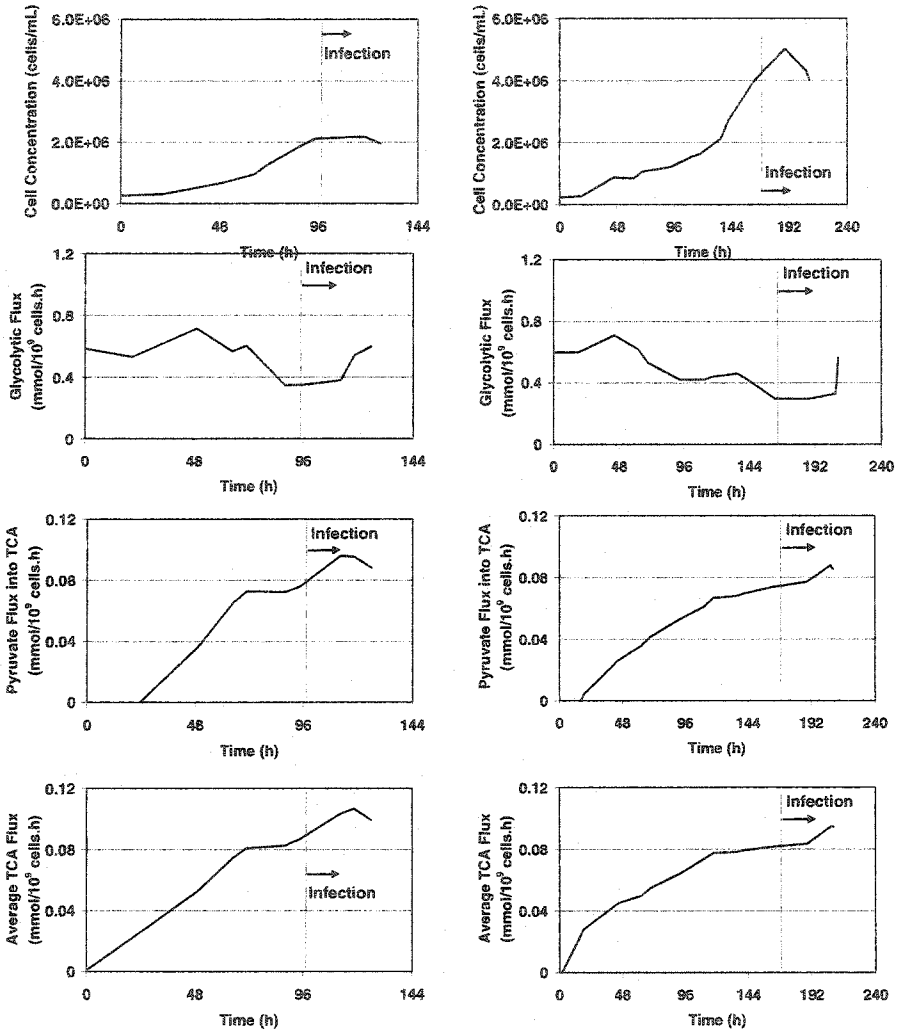


Figure 8.6 Estimated intracellular fluxes for two perfusions operated at 0.5 and 1 vol/d and infected at 2.1×10^6 and 4×10^6 cells/mL respectively.

Increasing the flow rate allowed to maintain the cells in similar states.

Real-Time flux estimation as an optimization tool

Under the assumption that the productivity of a culture is largely dependent on the physiological state of the cell at the time of infection, following intracellular fluxes in real-time may provide a decisive tool for rapid culture optimization. By establishing the distribution of intracellular fluxes that correspond to a desirable productive state, subsequent monitoring of metabolic rate can allow real-time decision making. The perfusion rate or any operating conditions can be changed with the goal to maintain or drive the culture towards the desired state.

In practice, it is more convenient to follow one variable that is representative of the whole state. The metabolic model allows for the estimation of the ATP flux. Because ATP is involved in many biochemical reactions, its production rate provides a good indication of the overall metabolism of the cells. Therefore, it can be used as an index to help optimize operating conditions. The approach is illustrated in Figure 8.7.

The perfusion A was operated at a feed rate 0.5 vol/d and the culture was infected at a cell density of $2.1x10^6$ cells/mL, when the estimated ATP flux was approximately 1.5 mmol/10^9 cells.h. Under these conditions, the experiment yielded a specific productivity of about 9000 VP/cell.

The perfusion B was operated at a feed rate of 1 vol/d. When a similar ATP flux was achieved, the corresponding cell density was two times greater ($4x10^6$ cells/mL). By infecting the culture in this state, a similar specific productivity was obtained and that translated into a 2-fold increase in product concentration.

Furthermore, by further increasing the flow rate to 2 vol/d and infecting at low cell density to alleviate any limitation or inhibition (experiment C), cells can be maintained in a state characterized by higher fluxes that will lead to greater productivity.

Conversely, letting the culture reach higher cell concentrations will cause the ATP flux to decrease over time. As shown in Figure 8.7, this production was marked by a significant reduction in specific productivity.

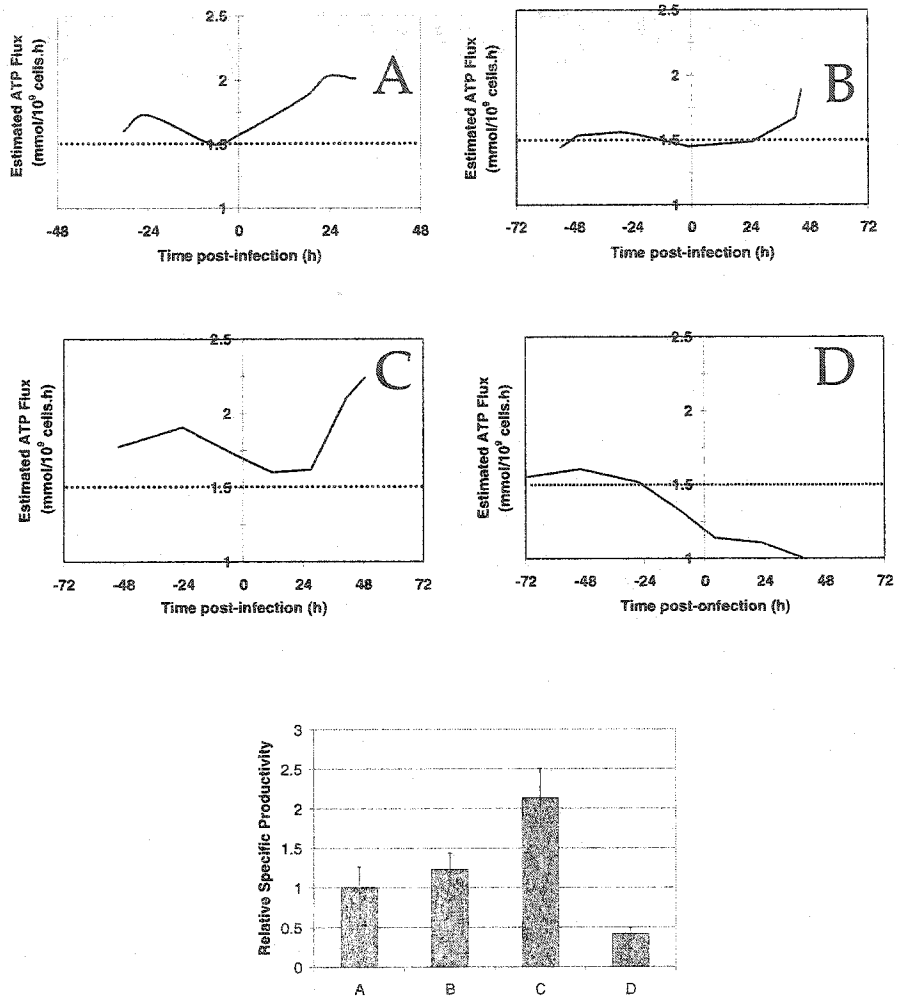


Figure 8.7 On-line optimization based on evaluation of the estimated ATP flux.

Cultures infected at similar ATP flux (A & B) exhibited similar productivity. In contrast, a culture showing a reduced ATP production rate led to a reduced specific product yield.

Physiological state control

Based on the aforementioned results, an experiment was conducted to assess if intracellular fluxes could be maintained throughout a culture by adjusting the perfusion rate with increasing cell concentrations. The perfusion rate profile is shown in Figure 8.8A, along with the cell density. The feed rate was adjusted daily to maintain a constant glucose concentration (Figure 8.8B), based on the latest estimate of the glucose consumption rate. With this feeding regime, the residual concentrations of glutamine (Figure 8.8B) and most other amino acids remained also fairly constant. In turn, the estimated intracellular fluxes were also very similar throughout the growth phase (Figure 8.8C and D).

To investigate how this would affect the specific productivity, cells were harvested from the bioreactor at different cell concentrations (Figure 8.8A), centrifuged, re-suspended in fresh medium at a density of $1x10^6$ cells/mL in two shake-flasks and infected at an MOI of 10. As shown in Figure 8.8E, no significant difference can be discerned in terms of productivity.

The bioreactor was also infected and achieved a higher specific yield (Figure 8.8E). The observed difference may be attributed to the favourable more controlled environment inside the bioreactor, but it is also likely that the batch cultures experienced a nutrient limitation. It was demonstrated that a second medium exchange post-infection yields greater productivity when 293 cells are infected at cell density greater than $1x10^6$ cells/mL (Garnier et al. 1994). In the perfusion experiment, maintaining the feed during the infection permitted to overcome this limitation.

These results demonstrate that successful infection at high cell density is feasible if the cells are maintained in a desirable state by manipulating the feed rate to meet the nutritional requirements of the cells.

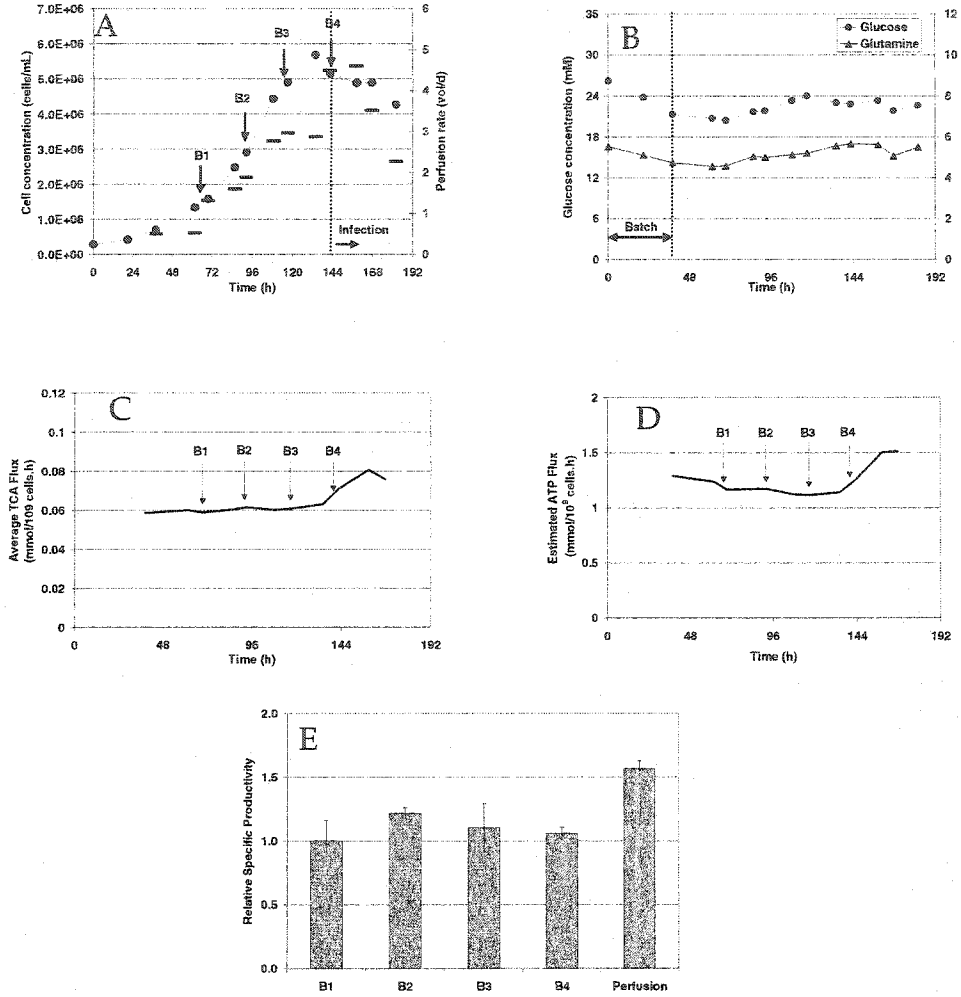


Figure 8.8 Physiological state control.

Daily adjustment of the feed rate during a perfusion culture allowed to maintain similar intracellular fluxes throughout growth. Cells were harvested at different time during the perfusion and infected in shake-flasks (B1, B2, B3 & B4) at a density of $1x10^6$ cells/mL. All the batch cultures exhibited similar productivity and a higher specific productivity was obtained in the perfusion. A) Growth profile and feeding regime B) Glucose and glutamine residual concentration profiles C) Krebs cycle activity D) Estimated ATP production rate E) Relative specific productivity of the batch and the perfusion experiments.

8.2.6 Conclusions

The intrinsic transient nature of batch, fed-batch and most perfusion processes is a key aspect to consider when trying to define the appropriate operating conditions. Cells are exposed to ever-changing environmental conditions (cell, nutrient, waste and product concentrations), which affect their metabolism and potentially their productivity.

The approach presented here could be used to monitor the status of a culture and help to establish the conditions favouring the growth or the productivity. Our results demonstrate the usefulness of the approach as a tool to optimize culture operation. However, further work is required to assess how this can be incorporated into a control scheme. In particular, a better understanding on the relationship between intracellular fluxes and environmental conditions is essential.

Acknowledgements

The authors thank Alice Bernier, Danielle Jacob and Louis Bisson for their contribution to this work. Financial support from the National Science and Engineering the Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds Québécois d'Aide à la Recherche (FCAR) is gratefully acknowledged.

8.2.7 References

Balcarcel RR, Clark LM. 2003. «Metabolic screening of mammalian cell cultures using well-plates». *Biotechnol. Prog.* 19:98-108.

Bastin G, Dochain D. 1990. *On-line estimation and adpative control of bioreactors.* Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers.

Behrendt U, Koch S, Gooch DD, Steegmans U, Comer MJ. 1994. «Mass Spectometry: A Tool for On-Line Monitoring of Animal Cell Cultures». *Cytotechnology* 14:157-165.

Blankenstein G, Spohn U, Preuschoff F, Thommes J, Kula MR. 1994. «Multi-channel flow injection analysis biosensor system for on-line monitoring

of glucose, lactate, glutamine, glutamate and ammonia in animal cell culture». *Biotechnol. Appl. Biochem.* 20:291-307.

Bonarius H, Houtman, J.H.M., Schmid, G., de Gooijer, C.D., Tramper, J. 2000. «Metabolic-Flux Analysis of Hybridoma Cells under Oxidative and Reductive Stress using Mass Balances». *Cytotechnol* 32:97-107.

Bonarius HPJ, Houtman JHM, de Gooijer CD, Tramper J, Schmid G. 1998. «Activity of Glutamate Dehydrogenase is increased in ammonia-stressed hybridoma cells». *Biotechnol. Bioeng.* 57:447-453.

Bonarius HPJ, Houtman JHM, Schmid G, de Gooijer CD, Tramper J. 1999. «Error analysis of metabolic-rate measurements in mamalian-cell culture by carbon and nitrogen balances». *Cytoechnol.* 29:167-175.

Bonarius HPJ, Ozemre A, Timmerarends B, Skrabal P, Tramper J, Schmid G, Heinzle E. 2001. «Metabolic-Flux Analysis of Continuously Cultured Hybridoma Cells Using13-CO2 Mass Spectrometry in Combination with 13C-Lactate Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Metabolite Balancing». *Biotech. Bioeng.* 74:528-538.

Cote J, Garnier A, Massie B, Kamen A. 1998. «Serum-free froduction of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells». *Biotechnol. Bioeng.* 59:567-575.

Ducommun P, Bolzonella I, Rhiel M, Pugeaud P, von Stockar U, Marison IW. 2001. «On-Line determination of animal cell concentration». *Biotechnol. bioeng.* 72:515-522.

Europa AF, Gambhir A, Fu P-C, Hu W-S. 2000. «Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells». *Biotechnol. Bioeng.* 67:25-34.

Eyer K, Oeggerli A, Heinzle E. 1995. «On-Line Gas Analysis in Animal Cell Cultivation: II. Methods for Oxygen Uptake Rate Estimation and its Application to Controlled Feeding of Glutamine». *Biotechnol. Bioeng.* 45:54-62.

Fitzpatrick L, Jenkins HA, Butler M. 1993. «Glucose and glutamine metabolism of a murine b-lymphocyte hybridoma grown in batch culture». *Appl. biochem. Biotechnol.* 43:93-116.

Follstad BD, Balcarcel RR, Stephanopoulos G, Wang DIC. 1999. «Metabolic Flux Analysis of Hybridoma Continuous Culture Steady State Multiplicity». *Biotechnol. Bioeng.* 63:675-683.

Garnier A, Cote J, Nadeau I, Kamen A, Massie B. 1994. «Scale-Up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells». *Cytotechnol.* 15:145-155.

Gee DA, Ramirez WF. 1996. «On-Line State Estimation and Paramter Identification for Batch Fermentation». *Biotechnol. Prog.* 12:132-140.

Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn MR. 1977. «Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5». *J. Gen. Virol.* 36:59-72.

Henry O, Dormond E, Perrier M, Kamen A. 2004. «Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures». *Biotechnol. Bioeng.* in press.

Iyer P, Ostrove JM, Vacante D. 1999. «Comparison of manufacturing techniques for adenovirus production». *Cytotechnol.* 30:169-172.

Kamen A, Tom R, Caron AW, Chavarie C, Massie B, Archambault J. 1991. «Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor». *Biotechnol. Bioeng.* 38:619-628.

Klyushnichenko V, Bernier A, Kamen A, Harmsen E. 2000. «Improved HPLC method in the analysis of adenovirus particles». *J. of Chromatogr B.* 755:27-36.

Konstantinov K. 1996. «Monitoring and Control of the Physiological State of Cell Cultures». *Biotechnol. Bioeng.* 52:271-289.

Konstantinov K, Chuppa S, Sajan E, Tsai Y, Yoon S, Golini F. 1994. «Real-time biomass concentration monitoring in animal cell cultures». *Trends Biotechnol* 12(324-333).

Konstantinov K, Yoshida T. 1989. «Physiological state control of fermentation processes». *Biotechnol. Bioeng.* 33:1145-1156.

Kussow CM, Weichang Z, Gryte DM, Hu W-S. 1995. «Monitoring of mammalian cell growth and virus production process using on-line oxygen uptake rate measurement». *Enzyme Microb. Technol.* 17:779-783.

Lin J, Takagi M, Qu Y, Gao Y, Yoshida T. 1999. «Metabolic flux change in hybridoma cells under high osmotic pressure». *J. Biosci. Bioeng.* 87:255-257.

Lovrecz G, Gray P. 1994. «Use of On-Line Gas Analysis to Monitor Recombinant Mammalian Cell Cultures». *Cytotechnology* 14:167-175.

Male KB, Gartu PO, Kamen A, Luong JHT. 1997. «On-Line Monitoring of glucose in Mammalian Cell Culture Using a Flow Injection Analysis (FIA) Mediated Biosensor». *Biotechnol. Bioeng.*` 55:497-504.

Mancuso A, Sharfstein ST, Tucker S, Clark DS, blanch HW. 1994. «Examination of primary metabolic pathways in a murine hybridoma with carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy». *Biotechnol. Bioeng.* 44:563-585.

Martinelle K, Doverskog M, Jacobsson U, Chapman BE, Kuchel PW. 1998. «Elevated glutamate dehydrogenase flux in glucose-deprived hybridoma and myeloma cells: evidence from 1H/15N NMR». *Biotechnol. Bioeng.* 60:508-517.

Nadeau I, Gilbert PA, Jacob D, Perrier M, Kamen A. 2002. «Low-protein medium affects the 293SF central metabolism during growth and infection with adenovirus». *Biotechnol. Bioeng.* 77:91-104.

Nadeau I, Kamen A. 2003. «Production of adenovirus vector for gene therapy». *Biotechnol. Adv.* 20:475-489.

Nadeau I, Sabatie J, Koehl M, Perrier M, Kamen A. 2000. «Human 293 Cell Metabolism in Low Glutamine-supplied Culture: Interpretation of

Metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis». *Metab. Eng.* 2:277-292.

Nyberg GB, Balcarcel RR, Follstad BD, Stephanopoulos G, Wang DIC. 1999. «Metabolism of Peptide amino Acids by chinese Hamster Ovary Cells Grown in a Complex Medium». *Biotechnol. Bioeng.* 62:324-335.

Paredes C, Sanfeliu A, Cardenas F, Cairo JJ, godia F. 1998. «Estimation of the intracellular fluxes for a hybridoma cell line by material balances». *Enz. Microbio. technol.* 23(187-198).

Pelletier F, Fonteix C, Lourenco da Silva A, Marc A, Engasser J-M. 1994. «Software Sensors for the Monitoring of Perfusion Cultures: Evaluation of the Hybridoma Density and the Medium Composition from Glucose Concentration Measurements». *Cytotechnol.* 15:291-299.

Portner r, Bohmann A, Ludemann I, Markl H. 1994. «Estimation of specific glucose uptake rates in cultures of hybridoma cells». *J. of. Biotechnol.* 34:237-246.

Portner R, Schafer T. 1996. «Modelling Hybridoma Cell Growth and Metabolism - a Comparison of Selected Models and Data». *J. of Biotechnol.* 49:119-135.

Sharfstein ST, Tucker S, Mancuso A, Blanch HW, Clark DS. 1994. «Quantitative in vivo nuclear magnetic resonance studies of hybridoma metabolism». *Biotechnol. Bioeng.* 43:1059-1074.

Shirai Y, Hashimot K, Takamatsu H. 1992. «Growth kinetics of hybridoma cells in high density culture». *J. Ferm. Bioeng.* 73(2):159-165.

Siegwart P, Cote J, Male K, Luong JHT, Perrier M, Kamen A. 1999. «Adaptive control at low glucose concentration of HEK-293 cell serum-free cultures». *Biotechnol. Prog.* 15:608-616.

Singhvi R, Markusen JF, Ky B, Horvath BJ, Aunins JG. 1996. «Assessment of virus infection in cultured cells using metabolic monitoring». *Cytotechnol* 22:79-85.

Stephanopoulos G, Nielsen J, Aristidou A. 1998. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. San Diego: Academic Press.

Takiguchi N, Shimizu H, Shioya S. 1997. «An On-Line Physiological State Recognition System for the Lysine Fermentation Process Based on a Metabolic Reaction Model». *Biotechnol. Bioeng.* 55:177-181.

van der Pol J, Spohn U, Eberhardt R, Gaetgens J, Biselli M, Wandrey C, Tramper J. 1994. «On-line monitoring of an animal cell culture with multi-channel flow injection analysis». *J. Biotechnol.* 37:253-264.

Xie L, Pilbrough W, Metallo C, Zhong T, Pikus L, Leung J, Aunins JG, Zhou W. 2002. «Serum-free suspension cultivation of PER.C6 cells and recombinant adenovirus production under different pH conditions». *Biotechnol. Bioeng.* 80:569-579.

Xie L, Wang DIC. 1994. «Applications of Improved Stoichiometric Model in Medium Design and Fed-Batch Cultivation of animal Cells in Bioreactor». *Cytotechnol.* 15:17-29.

Yoon S-J, Konstantinov KB. 1994. «Continuous, Real-Time Monitoring of the Oxygen Uptake Rate (OUR) in Animal Cell Bioreactors». *Biotechnol. Bioeng.* 44:983-990.

Zeiser A, Bedard C, Voyer R, Jardin B, Tom R, Kamen A. 1999. «On-line monitoring of the progress of infection in Sf-9 insect cell cultures using relative permittivity measurements». *Biotechnol. Bioeng.* 63:122-126.

Zeiser A, Elias C, Voyer R, Jardin B, Kamen A. 2000. «On-line monitoring of physiological parameters of insect cell cultures during the growth and infection process». *Biotechnol. Prog.* 16:803-808.

Zeng AP, Deckwer WD. 1995. «Mathematical modeling and analysis of glucose and glutamine utilization and regulation in cultures of continuous mammalian cells». *Biotechnol. Bioeng.* 47:334-346.

Zhou W, Hu W-H. 1994. «On-Line Characterization of a Hybridoma Cell Culture Process». *Biotechnol. Bioeng.* 44.

Zupke C, Sinskey AJ, Stephanopoulos G. 1995. «Intracellular Flux Analysis Applied to the Effect of Dissolved Oxygen on Hybridomas». *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:27-36.

Zupke C, Stephanopoulos G. 1994. «Modeling of Isotope Distributions and Intracellular Fluxes in Metabolic Networks Using Atom Mapping Matrices». *Biotechnol. Prog.* 10:489-498.

CHAPITRE 9: DISCUSSION GÉNÉRALE

Le recensement de la littérature a permis de mettre en évidence le peu d'informations disponibles quant à l'optimisation et au suivi de la production de vecteurs adénoviraux. Or, afin de déterminer les conditions de cultures assurant une productivité maximale, il est primordial de connaître et de comprendre les effets des principales variables opératoires sur les cinétiques de production.

Pris dans leur ensemble, les résultats obtenus au cours de ce travail confirment l'influence de l'état physiologique des cellules sur la productivité des cultures. Ceci découle en premier lieu de l'observation que les niveaux de production sont largement fonction des conditions opératoires. En effet, il a été constaté que, pour un même taux d'alimentation, la productivité spécifique diminue avec l'augmentation de la densité cellulaire. En outre, il s'avère possible d'atteindre des niveaux de production similaires à plus haute concentration cellulaire à condition d'augmenter le taux de perfusion.

L'analyse des flux métaboliques a permis de révéler les effets des conditions opéatoires sur le métabolisme cellulaire et l'impact sur la productivité spécifique des cellules. Ainsi, les cultures présentant une activité métabolique élevée au moment de l'infection conduisent à des niveaux de production généralement plus élevés. C'est notamment le cas des cultures infectées à basse densité cellulaire et/ou haut à taux d'alimentation. A l'inverse, à plus haute densité cellulaire et/ou à plus bas taux de perfusion, on constate des flux intracellulaires plus faibles et une réduction significative du rendement en produits.

En outre, même opérées sous différentes conditions, des cultures présentant des flux intracellulaires similaires donnent lieu à des productivités similaires. Ces résultats suggèrent qu'il serait possible de moduler l'état physiologique en manipulant une variable du procédé (par exemple, le taux d'alimentation). Ceci a été démontré expérimentalement avec une culture opérée en ajustant le taux d'alimentation, de façon à maintenir des flux intracellulaires relativement constants à mesure que la concentration cellulaire augmentait. Des cellules infectées à divers moments au cours de la culture ont alors présenté des productivités similaires.

Ces considérations ont des implications directes sur l'optimisation d'un procédé. Mais pour être exploitable à cette fin, la distribution des flux intracellulaires doit être disponible en cours de culture et c'est pourquoi une part importante du travail a porté sur l'extension de la technique d'analyses des flux métaboliques permettant l'estimation en temps réel de l'état physiologique des cellules. Aucune approche de ce genre n'a été recensée dans la littérature en ce qui a trait aux cultures de cellules animales.

CONCLUSION

L'importance des vecteurs adénoviraux comme outil thérapeutique n'est plus à démontrer. Par contre, si l'utilisation de vecteurs adenoviraux fait l'objet d'une littérature innombrable, paradoxalement, la production d'adénovirus est, elle, relativement peu documentée. Les applications thérapeutiques requérant toutes des quantités importantes de vecteurs, la génération de stocks viraux suffisants s'avère un prérequis incontournable qui passe par le développement de méthodes de production efficaces.

Dans le développment d'un bioprocédé pour la production de vecteurs adénoviraux, l'un des principaux défis à surmonter est la baisse marquée de productivité des cultures effectuées à hautes densités cellulaires. En conséquence, les rendements obtenus en cultures par les méthodes traditionnelles sont bien en-deça de ceux attendus d'après les expériences en flacons à l'échelle du laboratoire.

Contribution à l'avancement des connaissances

L'un des objectifs de cette thèse était de caractériser la production de vecteurs viraux dans des cultures opérant en perfusion. Par l'ajout en continu de milieu frais, ce mode d'opération permet d'éliminer les limitations nutritionnelles et prévient l'accumulation d'inhibiteurs par une dilution constante de la culture. Par contre, ces caractéristiques avantageuses se font au prix d'une complexité d'opération accrue. Les paramètres clefs à déterminer sont notamment le taux de perfusion, ainsi que les moments opportuns pour infecter et récolter une culture. Ces paramètres ont fait l'objet de la première partie de cette thèse.

Les expériences menées ont permis d'établir qu'avec un taux de perfusion de deux volumes/j, il est possible d'infecter une culture jusqu'à des concentrations de $3x10^6$ cellules/mL, tout en maintenant une production spécifique similaire à celle d'une infection à faible densité cellulaire (0.5 à $1x10^6$ cellules/mL). Ceci a permis d'atteindre des concentrations de l'ordre de $5x10^{10}$ VP/mL, ce qui correspond à un accroissement net de la productivité volumétrique d'un facteur cinq par rapport au mode cuvée avec changement de milieu à l'infection.

Ces travaux ont également permis de démontrer la valeur d'un certain nombre de variables directement accessibles en ligne. Ainsi, la respiration cellulaire de même que la variation du biovolume des cultures sont deux paramètres relativement simples à mesurer et à superviser en ligne et qui permettent une appréciation qualitative du processus d'infection. En outre, comme le virus produit est instable dans le bioréacteur, l'utilisation d'une sonde à fluorescence dans le bioréacteur s'avère un atout inestimable pour estimer le temps opportun pour procéder à la récolte du bioréacteur.

Cependant, tous ces outils sont insuffisants pour déduire quantitativement et *a priori* le rendement d'une production. Des études antérieures et la littérature suggérant un lien intime entre la productivité des cellules et leur métabolisme, la deuxième partie du de cette thèse a donc été consacrée à l'étude de ce lien. A partir d'un modèle biochimique pré-établi, l'analyse des flux métaboliques a été employée pour mettre en lumière les caractéristiques importantes du métabolisme cellulaire, en relation avec les conditions environnementales et opératoires.

Dans un premier temps, les résultats ont permis de démontrer que l'état physiologique des cellules au moment de l'infection s'avère un facteur

déterminant pour la productivité des cultures. Ainsi, de bonnes productions spécifiques ont été atteintes pour des cultures présentant des valeurs élevées pour les principaux flux (glycolytiques, cycle de Krebs). On constate également une augmentation significative de ces flux durant les 24 heures suivant l'infection.

A l'inverse, une culture opérée sous des conditions similaires mais infectée à plus haute densité se caractérise par une activité métabolique réduite et donne lieu à un piètre rendement.

Les travaux ont cependant montré qu'il est possible de contrer cet effet de la densité cellulaire en modifiant le régime d'alimentation. Ainsi, en doublant le taux de perfusion (1 volume/j versus 0.5 volume/j), il est possible d'obtenir un profil de flux métaboliques similaire pour une densité d'infection deux fois plus élevée ($4x10^6$ cellules/mL vs $2x10^6$ cellules/mL). Ce faisant, on se trouve à maintenir la production spécifique et cela se traduit par une concentration finale deux fois plus élevée.

L'analyse a permis également de conclure que la glutamine et les autres acides aminés semblent ne pas jouer un rôle aussi prépondérant, ou du moins leur

influence est noyée dans le bruit de mesure, aucune différence notoire n'ayant été notée en pré et en post-infection.

Pour optimiser l'opération d'un bioréacteur, il importe de connaître l'effet des différentes variables sur le métabolisme des cellules et, préférablement, ceci doit pouvoir se faire en ligne afin d'accélérer le développement du procédé. Traditionnellement, le suivi et le contrôle des bioprocédés reposent sur des variables facilement mesurables telles le pH, la concentration de certains nutriments ou la consommation d'oxygène. Bien qu'utiles, ces variables ne procurent qu'une indication partielle sur le métabolisme des cellules.

Les résultats confirmant l'importance de l'état physiologique et laissant entrevoir qu'on puisse moduler ce dernier par le taux de perfusion, un autre objectif de cette thèse était de concevoir une approche permettant d'estimer en ligne les flux intracellulaires. Cette contribution est originale dans la mesure où elle n'a été appliquée que pour des modèles métaboliques très simples dans le cas des cultures microbiennes et jamais pour des cellules animales.

L'approche proposée repose sur l'estimation du taux de croissance à partir d'une mesure en-ligne de la capacitance, ce qui permet d'évaluer les taux

biosynthétiques à partir de la composition de la cellule. Les taux de consommation et de production sont estimés grâce à un filtre de Kalman et à partir de mesures journalières des concentrations de nutriments et de métabolites extracellulaires.

Connaissant la distribution des flux métaboliques en cours de culture, on est plus à même d'évaluer en détail l'état physiologique des cellules. Ceci est d'autant plus important que les résultats ont montré que le métabolisme cellulaire est modifié à mesure que les conditions changent dans le bioréacteur. Le taux de production d'ATP s'avèrant un bon indicateur qui reflète l'activité métabolique globale des cellules, il est suggéré d'utiliser ce paramètre comme critère afin de déterminer le moment opportun pour procéder à l'infection.

Les résultats obtenus démontrent également qu'en ajustant le taux d'alimentation, il est possible de maintenir les cellules dans un certain état physiologique (caractérisé par des flux constants) et ce, même pour des densités cellulaires accrues.

Perspectives, contraintes et nouvelles voies de recherche

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse ouvrent la voie vers une nouvelle approche du contrôle des bioprocédés. En effet, jusqu'à ce jour, la plupart des stratégies visaient à manipuler certaines variables (débits, pressions, etc) de façon à maintenir un environnement constant autour des cellules. Désormais, en connaissant en ligne l'état physiologique des cellules, cela laisse envisager la possibilite de manipuler le milieu de façon à maintenir un état physiologique propice à la croissance et à la production.

Même si l'analyse des flux métaboliques permet de mettre en évidence les effets des conditions environnementales et opératoires sur le métabolisme des cellules, plusieurs travaux sont encore nécessaires pour établir des relations de causalité et véritablement contrôler la réponse physiologique des cellules. Seulement alors pourra-t-on concevoir et implanter une véritable stratégie de contrôle.

L'approche développée ici est générique et pourrait s'appliquer pour tout autre type de cellules ou tout autre produit d'intérêt (par exemple pour étudier la production d'anticorps avec des cellules hybridomes). Les principales limitations de la démarche sont liées à la disponibilité de l'information au sujet de la lignée cellulaire employée. En effet, l'implantation d'une telle stratégie présuppose que les voies métaboliques et la composition de la cellule soient connues au préalable. Or, l'élaboration d'un modèle suffisamment fiable demande beaucoup de temps ce qui peut aller à l'encontre du bénéfice recherché, à savoir le développement accéléré d'un bioprocédé.

Cependant, avec le perfectionnement et le raffinement des techniques de mesures et d'analyse, on assiste à un intérêt croissant pour l'approche intracellulaire, ce qui se traduit par la multiplication des modèles métaboliques, désormais disponibles pour une multitude de cellules mammifères (hybridomes, CHO, HEK-293, Hepatocytes, etc).

Bien que l'analyse des flux génère beaucoup d'informations, la finesse de celles-ci peut être un aspect assez contraignant pour mesurer la réponse physiologique. En effet, certains flux étant très faibles, il devient impossible d'observer des tendances en regard de la grandeur des incertitudes en jeu. C'est une caractéristique inhérente aux bioprocédés, mais qu'il faut réduire au maximum pour améliorer l'analyse des flux intracellulaires. L'erreur associée à l'évaluation des flux est attribuable à celle des mesures, mais également liée à l'exactitude du modèle métabolique. Une recommandation importante est donc d'augmenter à la fois le nombre et la qualité des mesures. L'emploi de cultures opérant en continu est particulièrement souhaitable pour l'identification des principaux paramètres cinétiques et de la composition de la cellule. Une plus grande précision sur les flux exige également une consolidation du modèle métabolique. Cela peut se faire entre autres par le biais de mesures obtenues par différentes techniques : résonance magnétique, spectroscopie de masse, etc. Ces mesures permettrait de poser des contraintes supplémentaires et augmenterait le nombre de mesures redondantes disponibles pour l'analyse et la détection des erreurs.

REFERENCES

ANDREWS GF. 1993. «The yield equations on the modeling and control of bioprocesses». *Biotechnol. Bioeng.* 42:549-556.

BALCARCEL RR, CLARK LM. 2003. «Metabolic screening of mammalian cell cultures using well-plates». *Biotechnol. Prog.* 19:98-108.

BANIK G, HEATH CA. 1995. «Hybridoma growth and antibody production as a function of cell density and specific growth rate in perfusion culture». *Biotechnol. Bioeng.* 48:289-300.

BASTIN G, DOCHAIN D. 1990. *On-line estimation and adpative control of bioreactors*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers.

BEHRENDT U, KOCH S, GOOCH DD, STEEGMANS U, COMER MJ. 1994. «Mass Spectometry: A Tool for On-Line Monitoring of Animal Cell Cultures». *Cytotechnology* 14:157-165.

BIBILA TA, ROBINSON DK. 1995. «In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production». *Biotechnol. Prog.* 11:1-13.

BLANKENSTEIN G, SPOHN U, PREUSCHOFF F, THOMMES J, KULA MR. 1994. «Multi-channel flow injection analysis biosensor system for on-line monitoring of glucose, lactate, glutamine, glutamate and ammonia in animal cell culture». *Biotechnol. Appl. Biochem.* 20:291-307.

BONARIUS H, HOUTMAN, J.H.M., SCHMID, G., De GOOIJER, C.D., TRAMPER, J. 2000. «Metabolic-Flux Analysis of Hybridoma Cells under Oxidative and Reductive Stress using Mass Balances». *Cytotechnol* 32:97-107.

BONARIUS HPJ, de GOOIJER CD, TRAMPER J, SCHMID G. 1995. «Determination of the respiration quotient in mammalian cell culture in bicarbonate buffered media». *Biotechnol. Bioeng.* 45:524-535.

BONARIUS HPJ, HATZIMANIKATIS V, MEESTERS KPH, De GOOIJER CD, SCHMID G, TRAMPER J. 1996. «Metabolic FLux Analysis of Hybridoma Cells in Different Culture Media Using Mass Balances». *Biotechnol. Bioeng.* 50:299-318.

BONARIUS HPJ, HOUTMAN JHM, de GOOIJER CD, TRAMPER J, SCHMID G. 1998. «Activity of Glutamate Dehydrogenase is increased in ammonia-stressed hybridoma cells». *Biotechnol. Bioeng.* 57:447-453.

BONARIUS HPJ, HOUTMAN JHM, SCHMID G, De GOOIJER CD, TRAMPER J. 1999. «Error analysis of metabolic-rate measurements in mamalian-cell culture by carbon and nitrogen balances». *Cytoechnol.* 29:167-175.

BONARIUS HPJ, OZEMRE A, TIMMERARENDS B, SKRABAL P, TRAMPER J, SCHMID G, HEINZLE E. 2001. «Metabolic-Flux Analysis of Continuously Cultured Hybridoma Cells Using13-CO2 Mass Spectrometry in Combination with 13C-Lactate Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Metabolite Balancing». *Biotech. Bioeng.* 74:528-538.

CHAN C, BERTHIAUME F, LEE K, YARMUSH ML. 2003. «Metabolic flux analysis of cultured hepatocytes exposed to plasma». *Biotechnol. Bioeng.* 81:33-49.

CHICO E, JAGER V. 2000. «Perfusion Culture of Baculovirus-Infected BTI-Tn-5B1-4 Insect Cells: a Method to Restore Cell Specific b-Trace Glycoprotein Productivity at High Cell Density». *Biotechnol. bioeng.* 70:574-586.

CHU L, ROBINSON DK. 2001. «Industrial choices for protein production by large-scale cell culture». *Curr. Opin. Biotechnol* 12:180-187.

CLAES JE, VAN IMPE JF. 1999. «On-line estimation of the specific growth rate based on viable biomass measurements: experimental validation». *Bioproces Engineering* 21:389-395.

COTE J, BOURGET L, GARNIER A, KAMEN A. 1997. «Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by GFP-expression monitoring». *Biotechnol. Prog.* 13:709-714.

COTE J, GARNIER A, MASSIE B, KAMEN A. 1998. «Serum-free froduction of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells». *Biotechnol. Bioeng.* 59:567-575.

De TREMBLAY M, PERRIER M, CHAVARIE C, ARCHAMBAULT J. 1993. «Fed-Batch Culture of Hybridoma Cells:Comparison of Optimal Control Approach and Closed Loop Strategies». *Bioprocess Engineering* 9:13-21.

DUCOMMUN P, BOLZONELLA I, RHIEL M, PUGEAUD P, VON STOCKAR U, MARISON IW. 2001. «On-Line determination of animal cell concentration». *Biotechnol. bioeng.* 72:515-522.

ESTLER MU. 1995. «Recursive On-Line Estimation of the specific Growth rate from Off-Gas Analysis for the Adaptive Control of Fed-Batch Processes». *Bioprocess Engineering* 12:205-207.

EUROPA AF, GAMBHIR A, FU P-C, HU W-S. 2000. «Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells». *Biotechnol. Bioeng.* 67:25-34.

EYER K, OEGGERLI A, HEINZLE E. 1995. «On-Line Gas Analysis in Animal Cell Cultivation: II. Methods for Oxygen Uptake Rate Estimation and its

Application to Controlled Feeding of Glutamine». *Biotechnol. Bioeng.* 45:54-62.

FIKE R, KUBIAK J, PRICE P, JAYME D. 1993. «Feeding Strategies for Enhanced Hybridoma Productivity: Automated Concentrate Supplementation». *BioPharm* October`:49-54.

FITZPATRICK L, JENKINS HA, BUTLER M. 1993. «Glucose and glutamine metabolism of a murine b-lymphocyte hybridoma grown in batch culture». *Appl. biochem. Biotechnol.* 43:93-116.

FOLLSTAD BD, BALCARCEL RR, STEPHANOPOULOS G, WANG DIC. 1999. «Metabolic Flux Analysis of Hybridoma Continuous Culture Steady State Multiplicity». *Biotechnol. Bioeng.* 63:675-683.

FRAME KK, HU WS. 1991. «Kinetic Study of Hybridoma Cell Growth in Continuous Culture: II. Behavior of Producers and Comparison to Nonproducers.». *Biotechnol. Bioeng.* 38:1020-1028.

FRAZZATI-GALLINA NM, PAOLI RL, MOURAO-FUCHES RM, JORGE SAC, PEREIRA CA. 2001. «Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers». *J. of Biotechnol.* 92:67-72.

GAERTNER JG, DHURJATI P. 1993. «Fractional Factorial Study of Hybridoma Behavior. 1. Kinetics of Growth and Antibody Production.». *Biotechnol. Prog.* 1993:309-316.

GARNIER A, COTE J, NADEAU I, KAMEN A, MASSIE B. 1994. «Scale-Up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells». *Cytotechnol.* 15:145-155.

GEE DA, RAMIREZ WF. 1996. «On-Line State Estimation and Paramter Identification for Batch Fermentation». *Biotechnol. Prog.* 12:132-140.

GILBERT P-A, GARNIER A, JACOB D, KAMEN A. 2000. «On-line measurement of Green Fluorescent Protein (GFP) Fluorescence for the Monitoring of Recombinant Adenovirus Production». *Biotechnol. Lett.* 22:561-567.

GORENFLO V, ANGEPAT S, BOWEN BD, PIRET JM. 2003. «Optimization of an acoustic cell filter with a novel air-backflush system». *Biotechnol. Prog.* 19:30-36.

GORENFLO VM, SMITH L, DEDINSKY B, PERSSON B, PIRET JM. 2002. «Scale-up and optimization of an acoustic filter for 200 L/day perfusion of CHO cell culture». *Biotechnol. Bioeng.* 80:438-444.

GRAHAM FL, SMILEY J, RUSSEL WC, NAIRN MR. 1977. «Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5». *J. Gen. Virol.* 36:59-72.

GUDI RD, SHAH SL, GRAY MR. 1994. «Multi-rate state and parameter estimation in an antibiotic fermentation with delayed measurements». *Biotechnol. bioeng.* 44:1271-1278.

HASSEL T, GLEAVE S, BUTLER M. 1990. «Growth inhibition in animal cell culture». *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30:29-40.

HILLER GW, AESCHLIMANN AD, CLARCK DS, BLANCH HW. 1991. «A Kinetic Analysis of Hybridoma Growth and Metabolism in Continuous Suspension Culture on Serum-Free Medium». *Biotech. Bioeng.* 38:733-741.

HITZMANN B, BROXTERMANN O, CHA JL, SOBIEH O, STARK E, SCHEPER T. 2000. «The control of glucose concentration during yeast fed-batch cultivation using fast measurement complemented by an extended Kalman filter». *Bioprocess Engineering* 23:337-341.

HSIA T. 1977. *System identification*: Lexington Books.

IYER P, OSTROVE JM, VACANTE D. 1999. «Comparison of manufacturing techniques for adenovirus production». *Cytotechnol.* 30:169-172.

JARDON M, GARNIER A. 2003. «pH, pCO2 and Temperature Effect on r-Adenovirus Production». *Biotechnol. Prog.* 19:202-208.

JENKINS HA, BUTLER M, DICKSON AJ. 1992. «Characterization of glutamine metabolism in two related murine hybridomas». *J. biotechnol.* 23:167-182.

KALLEL H, JOUINI A, MAJOUL S, ROUROU S. 2002. «Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells». *J. of biotechnol.* 95:195-204.

KAMEN A, BEDARD C, TOM R, PERRET S, JARDIN B. 1996. «Online monitoring of respiration in recombinant baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures». *Biotechnol. Bioeng.* 50:36-48.

KAMEN A, TOM R, CARON AW, CHAVARIE C, MASSIE B, ARCHAMBAULT J. 1991. «Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor». *Biotechnol. Bioeng.* 38:619-628.

KLYUSHNICHENKO V, BERNIER A, KAMEN A, HARMSEN E. 2000. «Improved HPLC method in the analysis of adenovirus particles». *J. of Chromatogr B.* 755:27-36.

KONSTANTINOV K. 1996. «Monitoring and Control of the Physiological State of Cell Cultures». *Biotechnol. Bioeng.* 52:271-289.

KONSTANTINOV K, CHUPPA S, SAJAN E, TSAI Y, YOON S, GOLINI F. 1994. «Real-time biomass concentration monitoring in animal cell cultures». *Trends Biotechnol* 12(324-333).

KONSTANTINOV K, YOSHIDA T. 1989. «Physiological state control of fermentation processes». *Biotechnol. Bioeng.* 33:1145-1156.

KONSTANTINOV KB, TSAI Y-S, MOLES D, MATANGUIHAN R. 1996. «Control of Long-Term Perfusion Chinese Hamster Ovary Cell Culture by Glucose Auxostat». *Biotechnol. Prog.* 12:100-109.

KUROKAWA H, PARK YS, LIJIMA S, KOBAYASHI T. 1993. «Kinetic study of hybridoma metabolism and antibody production in continuous culture USING SERUM-FREE MEDIUM». *J. FERMENTATION BIOENG.* 76(2):128-133.

KUSSOW CM, WEICHANG Z, GRYTE DM, HU W-S. 1995. «Monitoring of mammalian cell growth and virus production process using on-line oxygen uptake rate measurement». *Enzyme Microb. Technol.* 17:779-783.

KYUNG Y-S, PESHWA MV, GRYTE DM, HU W-H. 1994. «High Density Culture of Mammalian Cells with Dynamic Perfusion Based on On-Line Oxygen Uptake Rate Measurements». *Cytotechnology* 14:183-190.

LEE YY, YAP MGS, HU WS, WONG KTK. 2003. «Low-glutamine fed-batch cultures of 293-HEK serum-free suspension cells for adenovirus PRODUCTION». *BIOTECHNOL. PROG.* 19:501-509.

LIN J, TAKAGI M, QU Y, GAO Y, YOSHIDA T. 1999. «Metabolic flux change in hybridoma cells under high osmotic pressure». *J. Biosci. Bioeng.* 87:255-257.

LJUNGGREN J, HAGGSTROM L. 1994. «Catabolic Control of Hybridoma Cells by glucose and Glutamine Limited Fed Batch Cultures». *Biotechnol. Bioeng.* 44:808-818.

LOVRECZ G, GRAY P. 1994. «Use of On-Line Gas Analysis to Monitor Recombinant Mammalian Cell Cultures». *Cytotechnology* 14:167-175.

MALE KB, GARTU PO, KAMEN A, LUONG JHT. 1997. «On-Line Monitoring of glucose in Mammalian Cell Culture Using a Flow Injection Analysis (FIA) Mediated Biosensor». *Biotechnol. Bioeng.*` 55:497-504.

MANCUSO A, SHARFSTEIN ST, TUCKER S, CLARK DS, BLANCH HW. 1994. «Examination of primary metabolic pathways in a murine hybridoma with carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy». *Biotechnol. BIOENG.* 44:563-585.

MARTINELLE K, DOVERSKOG M, JACOBSSON U, CHAPMAN BE, KUCHEL PW. 1998. «Elevated glutamate dehydrogenase flux in glucose-deprived hybridoma and myeloma cells: evidence from 1H/15N NMR». *Biotechnol. Bioeng.* 60:508-517.

MERCILLE S, JOHNSON M, LANTHIER S, KAMEN AA, MASSIE B. 2000. «Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates». *Biotechnol. Bioeng.* 67:435-450.

MERTEN OW. 2000. «Constructive improvements of the ultrasonic separation device ADI 1015». *Cytotechnol.* 34:175-179.

MERTEN OW, MANUGUERRA JC, HANNOUN C, VAN DER WELF S. 1999. «Production of influenza virus in serum-free mammalian cell cultures».*Inactivated influenza vaccines prepared in cell cultures.* Brown F, Robertson JS, Schild GC, Wood JM. Basel: Karger. p 23-27.

MITTEREDER N, MARCH KL, TRAPNELL BC. 1996. «Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy». *J. of Virology* 70(11):7498-7509.

MONICA TJ, MONTGOMERY T, AYALA JL, SCHOOFS GM, WHITELEY EM, ROTH G, GARBUTT JJ, HARVEY S, CASTILLO FJ. 2000. «Monitoring

Adenovirus Infection with On-line and Off-line Methods». *Biotech. Progr.* 16(5):866-871.

NADEAU I, GARNIER A, COTE J, MASSIE B, CHAVARIE C, KAMEN A. 1996. «Production with the human adenovirus/293S expression system using fed-batch strategies». *Biotechnol. Bioeng.* 51:613-623.

NADEAU I, GILBERT PA, JACOB D, PERRIER M, KAMEN A. 2002. «Low-protein medium affects the 293SF central metabolism during growth and infection with adenovirus». *Biotechnol. Bioeng.* 77:91-104.

NADEAU I, JACOB D, PERRIER M, KAMEN A. 2000a. «293 SF Metabolic Flux Analysis during Cell Growth and Infection with an Adenoviral Vector».

NADEAU I, KAMEN A. 2003. «Production of adenovirus vector for gene THERAPY». *BIOTECHNOL. ADV.* 20:475-489.

NADEAU I, SABATIE J, KOEHL M, PERRIER M, KAMEN A. 2000b. «Human 293 Cell Metabolism in Low Glutamine-supplied Culture: Interpretation of Metabolic Changes through Metabolic Flux Analysis». *Metab. Eng.* 2:277-292.

NEELEMAN R, VAN DEN END EJ, VAN BOXTEL AJB. 2000. «Estimation of the respiration quotient in a bicarbonate buffered batch cell cultivation». *J. biotechnol.* 80:85-95.

NYBERG GB, BALCARCEL RR, FOLLSTAD BD, STEPHANOPOULOS G, WANG DIC. 1999. «Metabolism of Peptide amino Acids by chinese Hamster Ovary Cells Grown in a Complex Medium». *Biotechnol. Bioeng.* 62:324-335.

OMASA T, HIGASHIYAMA K, SHIOYA S, SUGA K. 1992. «Effects of Lactate Concentration on Hybridoma Culture in Lactate-Controlled Fed-Batch Operation». *Biotechnol. Bioeng.* 39:55-564.

OZTURK SS, RILEY MR, PALSSON BO. 1992. «Effects of Ammonia and Lactate on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody Production». *Biotechnol. Bioeng.* 39:418-431.

PAREDES C, SANFELIU A, CARDENAS F, CAIRO JJ, GODIA F. 1998. «Estimation of the intracellular fluxes for a hybridoma cell line by material balances». *Enz. Microbio. technol.* 23(187-198).

PELLETIER F, FONTEIX C, LOURENCO DA SILVA A, MARC A, ENGASSER J-M. 1994. «Software Sensors for the Monitoring of Perfusion Cultures: Evaluation of the Hybridoma Density and the Medium Composition from Glucose Concentration Measurements». *Cytotechnol.* 15:291-299.

PERRIN P, MADHUSUDANA S, GONTIER-JALLET C, PETRES S, TORDO N, MERTEN O-W. 1995. «An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 cell suspension culture process: use of serum-free medium and perfusion-reactor system». *Vaccine* 13(13):1244-1250.

PORTNER R, BOHMANN A, LUDEMANN I, MARKL H. 1994. «Estimation of specific glucose uptake rates in cultures of hybridoma cells». *J. of. Biotechnol.* 34:237-246.

PORTNER R, SCHAFER T. 1996. «Modelling Hybridoma Cell Growth and Metabolism - a Comparison of Selected Models and Data». *J. of Biotechnol.* 49:119-135.

SCHOOFS G, MONICA TJ, AYALA J, HOWTITZ J, MONTGOMERY T, ROTH G, CASTILLO FJ. 1998. «A High-Yielding Serum-Free, Suspension culture Process to Manufacture Recombinant Adenoviral Vectors for Gene Therapy». *Cytotechnology* 28:81-89.

SHARFSTEIN ST, TUCKER S, MANCUSO A, BLANCH HW, CLARK DS. 1994. «Quantitative in vivo nuclear magnetic resonance studies of hybridoma metabolism». *Biotechnol. Bioeng.* 43:1059-1074.

SHIRAI Y, HASHIMOT K, TAKAMATSU H. 1992. «Growth kinetics of hybridoma cells in high density culture». *J. Ferm. Bioeng.* 73(2):159-165.

SIEGWART P, COTE J, MALE K, LUONG JHT, PERRIER M, KAMEN A. 1999. «Adaptive control at low glucose concentration of HEK-293 cell serum-free cultures». *Biotechnol. Prog.* 15:608-616.

SINGH V. 1996. «On-line measurement of oxygen uptake rate in cell culture using the dynamic method». *Biotechnol. bioeng.* 52:443-448.

SINGHVI R, MARKUSEN JF, KY B, HORVATH BJ, AUNINS JG. 1996. «Assessment of virus infection in cultured cells using metabolic monitoring». *Cytotechnol* 22:79-85.

STEPHANOPOULOS G, NIELSEN J, ARISTIDOU A. 1998. *Metabolic engineering: principles and methodologies.* San Diego: Academic Press.

STEPHANOPOULOS G, SAN KY. 1984a. « Studies on on-line bioreactor identification. I. Theory». *Biotechnol. Bioeng.* 26:1176-1188.

STEPHANOPOULOS G, SAN KY. 1984b. «Studies on on-line bioreactor identification. II. Numerical and experimental Results». *Biotechnol. Bioeng.* 26:1189-1197.

TAKIGUCHI N, SHIMIZU H, SHIOYA S. 1997. «An On-Line Physiological State Recognition System for the Lysine Fermentation Process Based on a Metabolic Reaction Model». *Biotechnol. Bioeng.* 55:177-181.

TATIRAJU S, SOROUSH M, MUTHARASAN R. 1999. «Multi-rate nonlinear state and parameter estimation in a bioreactor». *Biotechnol. bioeng.* 63:22-32.

TRAMPLER F, SONDERHOFF SA, PHYLIS WSP, KILBURN DG, PIRET JM. 1994. «Acoustic cell filter for high density perfusion culture of hybridoma cells». *Bio/Technology* 12(March):281-284.

TZIAMPAZIS E, SAMBANIS A. 1994. «Modelling of cell culture processes». *Cytotechnology* 14:191-204.

VAN DER HEIJDEN RTJM, HELLINGA C, LUYBEN KCAM, HONDERD G. 1989. «State estimators for the on-line estimation of non-measurable process variables». *Trends Biotechnol.* 7:205-209.

VAN DER POL J, SPOHN U, EBERHARDT R, GAETGENS J, BISELLI M, WANDREY C, TRAMPER J. 1994. «On-line monitoring of an animal cell culture with multi-channel flow injection analysis». *J. Biotechnol.* 37:253-264.

VELLEKAMP G, PORTER FW, SUTJIPTO S, CUTLER C, BONDOC L, LIU, Y-H., WYLIE D, CANNON-CARLSON S, TANG JT, FREI A, VOLOCH M. 2001. «Empty capsids in column-purified recombinant adenovirus preparations». *Hum Gene Ther* 12:1923-1936.

VOISARD D, MEUWLY F, RUFFIEUX P-A, BAER G, KADOURI A. 2003. «Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian Cells». *Biotechnol. Bioeng.* 82:751-765.

WILLIAMS D, YOUSEFPOUR P, WELLINGTON EMH. 1986. «On-line adaptive control of a fed-batch fermentation of saccharomyces cerevesiae». *Biotechnol. Bioeng.* 28:631-645.

WONG K, GUARDIA MJ, LEE S, HU WS. 1999. «Adenovirus vector production in 293 fed-batch cultures».*Animal cell technology: products from cells, cells as*

products. Bernard A, Griffiths B, Noé W, Wurm F. Dordrecht: Kluwer Academic. p 367-369.

XIE L, PILBROUGH W, METALLO C, ZHONG T, PIKUS L, LEUNG J, AUNINS JG, ZHOU W. 2002a. «Serum-free suspension cultivation of PER.C6 cells and recombinant adenovirus production under different pH conditions». *Biotechnol. Bioeng.* 80:569-579.

XIE L, PILBROUGH W, METALLO C, ZHONG T, PIKUS L, LEUNG J, AUNINS JG, ZHOU W. 2002b. «Serum-Free Suspension Cultivation of PERC6 Cells and Recombinant Adenovirus Production Under different pH Conditions». *Biotechnol. bioeng.* 80:569-579.

XIE L, WANG D. 1996a. «Material balance studies on animal cell metabolism using a stoechiometrically based reaction network». *Biotechnol. Bioeng.* 52:579-590.

XIE L, WANG DIC. 1994a. «Applications of Improved Stoichiometric Model in Medium Design and Fed-Batch Cultivation of animal Cells in Bioreactor». *Cytotechnol.* 15:17-29.

XIE L, WANG DIC. 1994b. «Stoichiometric Analysis of Animal Cell Growth and its Application in Medium Design». *Biotechnol. Bioeng.* 43:1164-1174.

XIE L, WANG DIC. 1996b. «Energy Metabolism and ATP Balance in Animal Cell Cultivation Using a Stoichiometrically Based Reaction Network». *Biotechnol. Bioeng.* 52:591-601.

YOON S-J, KONSTANTINOV KB. 1994. «Continuous, Real-Time Monitoring of the Oxygen Uptake Rate (OUR) in Animal Cell Bioreactors». *Biotechnol. Bioeng.* 44:983-990.

ZEISER A, BEDARD C, VOYER R, JARDIN B, TOM R, KAMEN A. 1999. «On-line monitoring of the progress of infection in Sf-9 insect cell cultures using relative permittivity measurements». *Biotechnol. Bioeng.* 63:122-126.

ZEISER A, ELIAS C, VOYER R, JARDIN B, KAMEN A. 2000. «On-line monitoring of physiological parameters of insect cell cultures during the growth and infection process». *Biotechnol. Prog.* 16:803-808.

ZENG AP, DECKWER WD. 1995. «Mathematical modeling and analysis of glucose and glutamine utilization and regulation in cultures of continuous mammalian cells». *Biotechnol. Bioeng.* 47:334-346.

ZHANG J, COLLINS A, CHEN M, KNYAZEV I, GENTZ R. 1998. «High-density perfusion culture of insect cells with a biosep ultrasonic filter». *Biotechnol. Bioeng.* 59:351-369.

ZHOU W, HU W-H. 1994. «On-Line Characterization of a Hybridoma Cell Culture Process». *Biotechnol. Bioeng.* 44.

ZUPKE C, SINSKEY AJ, STEPHANOPOULOS G. 1995. «Intracellular Flux Analysis Applied to the Effect of Dissolved Oxygen on Hybridomas». *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:27-36.

ZUPKE C, STEPHANOPOULOS G. 1994a. «Intracellular flux analysis in hybridomas using mass balances and in vitro 13C NMR». *Biotechnol. Bioeng.* 45:292-303.

ZUPKE C, STEPHANOPOULOS G. 1994b. «Modeling of Isotope Distributions and Intracellular Fluxes in Metabolic Networks Using Atom Mapping Matrices». *Biotechnol. Prog.* 10:489-498.