

## Modelación Metabólica de Células CHO

Patricio Núñez

### 1. Introducción

Las células mamíferas son preferidas como sistemas de expresión de varios biofármacos (t-PA, EPO), debido a que, al ser proteínas recombinantes, se necesitan de modificaciones postraduccionales complejas (plegamientos, glicosilaciones) que sean compatibles con seres humanos. Para esto, se utilizan células animales, que generan modificaciones compatibles con los humanos.

De las células mamíferas, la línea celular CHO son las mas estudiadas, debido a que las glicosilaciones capaces de realizar son las mas compatibles con los seres humanos, en comparación a bacterias, células de insecto[1]. Así, el 60-70% de los biofármacos recombinantes son producidos en células CHO [2]. Sin embargo, aun presenta problemas en sus cultivos, tales como velocidad de crecimiento, tiempos de cultivo y productividad [3].

El metabolismo de las células CHO esta descrito por altos consumos de glucosa y glutamina, en conjunto con altas productividades de lactato y amonio [4]–[6]. Estas ultimas dos son conocidos inhibidores del crecimiento celular y de la producción de proteínas, y pueden afectar negativamente los patrones de glicosilacion de las proteínas [7]. Normalmente, en condiciones de hipoxia, el flujo de carbono a nivel de piruvato puede ser derivado a producción de lactato, debido a la neutralidad redox. Sin embargo, en líneas celulares mamíferas, se ve acumulación de lactato independientemente de los niveles de oxígeno, denominado “Efecto Warburg” [8]. Altas concentraciones de glucosa en el medio aumentaran el consumo de glucosa, y, en consecuencia, la producción de lactato [9], [10]. De igual manera, la glutaminólisis juega un papel central en la generación de energía de la célula. Street et al. [11] muestra que todo el amonio producido por células CHO viene de la glutaminólisis. Además, se necesita suplementar a las células de aminoácidos esenciales en el medio, para su utilización en la síntesis de proteínas y crecimiento celular [2].

### 2. Metodología

Para este trabajo, la modelación metabólica se realiza utilizando análisis de flujos metabólicos (FBA de su sigla en inglés). Esta consta de una modelación estequiométrica de las reacciones llevadas a cabo al interior de la célula, considerando reacciones de intercambio, en la cual se calculan los fluxes con el objetivo de maximizar la reacción de biomasa, sujeta a restricciones. Estas restricciones son generalmente de carácter biológico, expresadas como consumos/producciones máximas/mínimas de metabolitos, para que se cumplan los balances de masa de estos.

Se genera la matriz estequiométrica de reacciones  $S$ , el vector de fluxes  $v$ . Sea  $v_b$  el flux de biomasa, se tiene el problema de programación lineal (LP):

$$\max_v v_b$$

$$s.t.: S * v = 0$$

$$Limite inferior \leq v \leq Limite superior$$

## Tarea 1 EIB-827 Modelamiento Metabólico del Metabolismo Microbiano

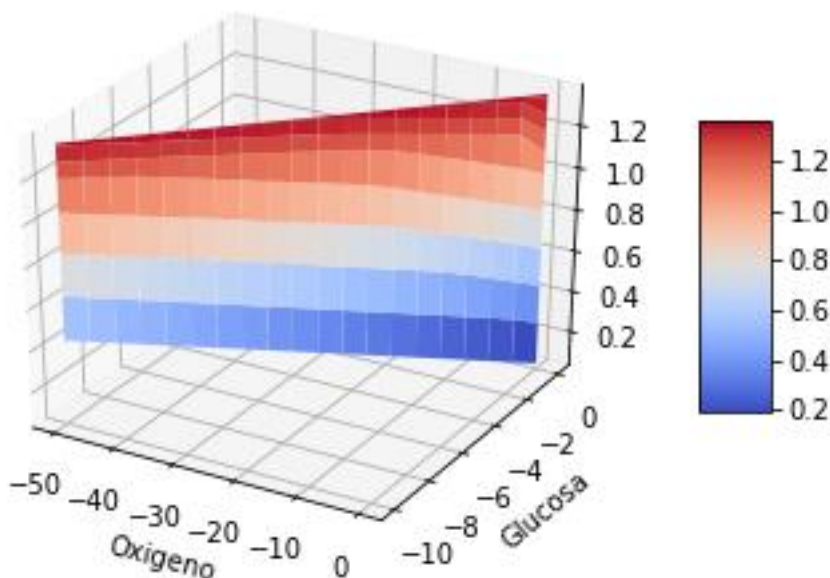
En el caso que el balance de masa tenga rangos de trabajo, la restricción  $S * v$  será una desigualdad, considerando los valores máximos y/o mínimos de los componentes del vector  $v$ , según los balances de masa correspondientes.

Para este trabajo se descargó el modelo iMM1415 [12], modelo de ratón (*mus musculus*) generado a partir del modelo de genoma humano Recon1, el cual considera 1374 genes, 3716 reacciones, 2775 metabolitos en 8 compartimentos (Citosol, Espacio Extracelular, Aparato de Golgi, Mitocondria, Lisosoma, Núcleo, Retículo Endoplasmático y Peroxisoma/Glioxisoma).

### 3. Resultados

Se realizó un script en Python que modificara los valores de los fluxes de intercambio de glucosa y oxígeno, fijando los límites superiores de ambos en cero, y los límites inferiores en -10 y -50 respectivamente. Esto, debido a que al ser reacciones de consumo, los fluxes se vuelven negativos.

Una vez fijados los límites, se realiza el cálculo de la envolvente de producción para 2 reacciones (intercambio de glucosa y oxígeno), fijando como objetivo el cálculo del flux de biomasa.



Se obtiene como valor máximo de  $\mu = 1,36343 \text{ h}^{-1}$ , el cual se mantiene constante, independiente de la concentración de glucosa, a valores de flux de consumo de oxígeno mayores a  $19 \text{ [mM/h]}$ . Como valor mínimo se obtiene  $\mu = 0,058667 \text{ h}^{-1}$ , el cual se obtiene cuando ambos fluxes son 0.

### 4. Discusión

Que el modelo entregue resultado aun cuando glucosa y oxígeno están en cero puede ser causa de la presencia de otras fuentes de carbono alternativas, así como la utilización de rutas anaeróbicas, presentes en el modelo.

## Tarea 1 EIB-827 Modelamiento Metabólico del Metabolismo Microbiano

El modelo muestra cambios al valor del flux de biomasa a medida que se cambia las concentraciones de los fluxes de glucosa y oxígeno. Sin embargo, los valores que se obtienen son lejos de los reportados experimentalmente ( $0,023\ h^{-1}$  [13]). Esta diferencia considerable se debe a que el modelo está basado en células ratón, mientras que las células CHO son una línea inmortalizada procedentes de ratón. Esto diferencia a las células en aspectos como: metabolitos presentes en medios de cultivo comerciales, reacciones de subsistemas no presentes en células CHO, etc.

Como solución a esta problemática, se plantea la eliminación (o igualar los límites superiores e inferiores a cero) de las reacciones que no se expresen en células CHO, en comparación a las de células de ratón.

### 5. Referencias

- [1] M. J. Betenbaugh, N. Tomiya, S. Narang, J. T. A. Hsu, and Y. C. Lee, "Biosynthesis of human-type N-glycans in heterologous systems," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 14, no. 5, pp. 601–606, 2004.
- [2] W. S. Ahn and M. R. Antoniewicz, "Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures," *Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 1, pp. 61–74, 2012.
- [3] S. Fischer, R. Handrick, and K. Otte, *The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives*, vol. 33, no. 8. Elsevier B.V., 2015.
- [4] M. Schneider, I. W. Marison, and U. Von Stockar, "The importance of ammonia in mammalian cell culture," *J. Biotechnol.*, vol. 46, no. 3, pp. 161–185, 1996.
- [5] J.-Y. Liu and L. Cui, "Rigid-flexible coupling dynamics analysis for flexible beam with large deformation and applied with thermal load," *Zhendong Gongcheng Xuebao/Journal Vib. Eng.*, vol. 22, no. 1, pp. 688–691, 2009.
- [6] J. O. R. C. Neermann and R. O. L. A. N. D. Wagner, "Comparative Analysis of Glucose and Glutamine Metabolism in Transformed Mammalian Cell Lines , Insect and Primary Liver Cells," vol. 169, pp. 152–169, 1996.
- [7] S. S. Ozturk, M. R. Riley, and B. Palsson, "Effects of Ammonia and Lactate on Hybridoma Growth , Metabolism , and Antibody Production," 1991.
- [8] O. Warburg, "On the origin of Cancer Cells," *Science (80- )*, vol. 123, no. May, pp. 309–314, 1956.
- [9] T. J. Wheeler and P. C. Hinkle, "The {Glucose} {Transporter} of {Mammalian} {Cells}," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 47, no. 1, pp. 503–517, 1985.
- [10] J. Ljunggren and L. Haggstrom, "Glucose and Glutamine Limited Fed," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 44, pp. 808–818, 1994.
- [11] J. C. Street, a M. Delort, P. S. Braddock, and K. M. Brindle, "A  $1H/15N$  n.m.r. study of nitrogen metabolism in cultured mammalian cells," *Biochem. J.*, vol. 291, no. 2, pp. 485–492, 1993.
- [12] M. I. Sigurdsson, N. Jamshidi, E. Steingrimsson, I. Thiele, and B. T. Palsson, "A detailed genome-wide reconstruction of mouse metabolism based on human Recon 1," *BMC Syst. Biol.*, vol. 4, no. 1, p. 140, 2010.

*Tarea 1 EIB-827 Modelamiento Metabólico del Metabolismo Microbiano*

- [13] S. K. Yoon, J. Y. Song, and G. M. Lee, "Effect of Low Culture Temperature on Specific Productivity , Transcription Level , and Heterogeneity of Erythropoietin in Chinese Hamster Ovary Cells," 2003.