

## Optimal production of mammalian cells in a semi-batch process: Dynamic optimization and nonlinear model predictive control

José Ramón Castellanos Castro\*, Alejandra Velasco-Pérez\*\*, y Héctor Puebla\*\*\*

\*Posgrado en Ingeniería de Procesos, Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco, Azcapotzalco Ciudad de México 02200, México (jr.castellanos@outlook.com).

\*\* Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana Orizaba, Orizaba, Veracruz, México (alvelasco@uv.mx).

\*\*\* Departamento de Energía, Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco, Azcapotzalco Ciudad de México 02200, México (hpuebla@azc.uam.mx)

---

**Abstract:** Animal cell culture processes have been established as a mature technology of great relevance within the biopharmaceutical industry. Most industrial bioreactor culture processes are operated by fed-batch or semi-batch. Due to their dynamic operation nature, perturbations, non-linearities and uncertainties, batch and semi-batch bioreactors present challenging problems in their operation. This paper proposes the dynamic optimization and the design and numerical implementation of a non-linear predictive model controller of a semi-batch bioprocess for the culture of CHO-type mammalian cells to optimize their productivity.

*Keywords:* Bioprocesses, mammalian cells, CHO cells, semi-batch.

---

### 1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas el estudio, diseño, optimización y control de bioprocesos ha sido pilar fundamental para el desarrollo de la industria química, farmacéutica y biotecnológica. El biorreactor se ha consolidado como el corazón y pieza clave de todo bioproceso mediante el cual se obtiene toda una gran variedad de productos de un alto valor agregado. Desde la simplicidad de los primeros procesos de fermentación para la obtención de bebidas hasta la gran complejidad de los procesos de cultivo de tejidos y células animales, el cultivo en biorreactores nos muestra la gran versatilidad y capacidad que tienen los bioprocesos para ir evolucionando y adaptarse de acuerdo a las necesidades y el desarrollo tecnológico de la sociedad (Doran, 2013).

En la actualidad, los procesos de cultivo de células animales se han consolidado como una tecnología madura y de gran relevancia dentro de la industria biofarmacéutica junto a los procesos convencionales que utilizan bacterias recombinantes. El cultivo de células animales se define y engloba desde el aislamiento de células que provienen de órganos o tejidos animales para posteriormente ser adaptadas en ambientes controlados como biorreactores para su división, crecimiento y diferenciación (Freshney, 2005). Dentro de la tecnología y uso de células animales, el cultivo de células animales de mamífero ha sido el de mayor relevancia y el mayormente usado en la industria, específicamente la línea celular de células de mamífero proveniente del ovario de hámster chino "CHO" (Chinese Hamster Ovarium).

La operación convencional desde hace muchos años para el cultivo de esta línea celular ha sido llevada a cabo mediante suspensiones celulares en medios líquidos dentro de biorreactores de tanque agitado. La gran mayoría de los procesos industriales de cultivo en biorreactores son operados por lote alimentado o semi-lote (Birol et al., 2002). En la operación semi-lote existe uno o más flujos de alimentación que se pueden dosificar de manera constante o intermitente durante el tiempo de operación de la biorreacción sin que existan flujos de salida. Existen numerosas ventajas de la operación de biorreactores semi-lote con respecto a biorreactores lote o continuos. En muchos casos la operación semi-lote es la mejor o la única alternativa debido a su efectividad sobreponiéndose a efectos indeseados como la inhibición por sustrato o la represión catabólica, además de permitir un mejor control en el crecimiento celular y alcanzar altas producciones de biomasa (Banga et al., 2003).

La complejidad inherente asociada a esta clase de procesos, así como la necesidad de mantener condiciones estrictas de operación han incentivado la tarea de desarrollar estrategias de optimización y control que puedan cumplir y mantener objetivos previamente establecidos de acuerdo con pureza, rendimientos y productividad. No obstante, existen una serie de problemáticas para llevar a cabo estas tareas, en particular los procesos de cultivo semi-lote presentan varias dificultades para su estudio y análisis desde el punto de vista de optimización y control por las siguientes razones:

- Los modelos contienen diversas fuentes de incertidumbre.
- Existe la presencia de perturbaciones externas.

- Los modelos del proceso presentan dinámicas no lineales.
- Existe la dificultad para realizar mediciones en tiempo real de variables importantes involucradas en el proceso.

Por estas razones existe un desarrollo, diseño y búsqueda constante de controladores cada vez más confiables y robustos que puedan llevar a cabo esta compleja tarea. (Pico et al., 2005).

En la industria química y biotecnológica existen un gran número de áreas de aplicación que requieren mejorar constantemente su desempeño como lo es el diseño de procesos, control y el modelado. Para esto, es necesario identificar los elementos principales de un proceso y como estos afectan el desempeño de este. La necesidad de un mecanismo eficiente y de un enfoque sistemático de toma de decisiones, derivó en el desarrollo de las estrategias de optimización y control de procesos. Existe una gran variedad de objetivos óptimos de control que son deseables de alcanzar en una biorreacción (Mears et al., 2017):

- Maximizar la concentración de un componente.
- Minimizar la formación de subproductos.
- Maximizar el rendimiento del proceso.
- Maximizar la productividad.
- Maximizar la concentración de biomasa.
- Minimizar la formación de inhibidores.

Se ha observado a lo largo de los años que en el caso de cultivos de células de mamífero CHO, es complicado mantener el número de células viables y altos valores de productividad, esto es debido a la formación de subproductos inhibidores del metabolismo celular. Los principales subproductos del metabolismo de las células de mamífero son el lactato y el amoníaco los cuales resultan del consumo de glucosa y glutamina que son las principales fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. Por esta razón es posible controlar la concentración y dosificación de estos sustratos mediante el flujo de alimentación y de esta manera inducir un cambio metabólico que resulte en células mejor adaptadas y que utilicen los nutrientes disponibles de manera más eficiente (Gambhir, 1999).

En la literatura diversos autores han abordado la optimización y control de biorreactores lote y semi-lote. Trabajos seminales incluyen los siguientes. Van Impe y Bastin (1995) proponen un esquema de control óptimo adaptable para procesos de fermentación semi-lote con múltiples sustratos. Smets et al. (2004) presenta un panorama del control óptimo adaptable de reactores químicos y biorreactores. En particular, se revisan las aportaciones que se basan en la derivación de secuencias de control óptimas aplicando el principio del mínimo de Pontryagin para procesos de producción en reactores semi-lote. Tebbani et al. (2008) presenta la optimización de un biorreactor semi-lote usando una combinación de técnicas de colocación y parametrización del problema de optimización resultante. Recientemente, Romoli et al. (2015) y Pantano et al. (2018) presentan esquemas de control basado en relaciones algebraicas

simples al utilizar un esquema de discretización completo que incorpora buenas propiedades de robustez al incluir una acción integral. Chang et al. (2016) aplican una estrategia de control de modo predictivo no-lineal (NMPC) para maximizar la producción de etanol en un biorreactor semi-lote usando modelos que consideran flujos metabólicos acoplados con los balances de masa macroscópicos.

En este trabajo se presenta la optimización dinámica o control óptimo basado en programación y el control de modo predictivo no lineal para maximizar la concentración de células viables (células vivas con capacidad de desarrollarse) de mamífero en biorreactores semi-lote. La contribución principal de este trabajo es la implementación del NMPC para el seguimiento del perfil óptimo en un caso de estudio de interés industrial actual, la producción de células mamíferas viables en biorreactores, que incluye la producción de vacunas anti-COVID.

Este trabajo se organiza como sigue. En la siguiente sección se describen los métodos de optimización dinámica y NMPC que se aplican al caso de estudio. El caso de estudio se presenta en la sección 3. En la sección 4 se aplican los métodos descritos y se discuten los resultados. Finalmente, se proporcionan las conclusiones principales de este trabajo.

## 2. METODOS

Con la finalidad de determinar el perfil óptimo para el proceso y debido a la naturaleza dinámica de procesos semi-lote, se considera un problema de optimización dinámica o control óptimo basado en programación. Debido a las perturbaciones e incertidumbres del modelo se considera además el control de modo predictivo no-lineal para garantizar el perfil óptimo de operación resultante de la optimización dinámica. El control NMPC combina la optimización dinámica, para el cálculo de secuencias de control óptimas, y el control retroalimentado. El NMPC proporciona buenas propiedades de robustez al actualizar continuamente la predicción del modelo, las mediciones disponibles, y la entrada de control. Además, es una técnica que es bien aceptada en procesos industriales al ser una evolución del MPC que surgió en la industria en los años 70s.

### 2.1 Optimización dinámica

La optimización dinámica consiste en la determinación de un conjunto de variables de decisión dependientes del tiempo que optimicen una función objetivo o perfil de desempeño, sujeto a un conjunto de restricciones dadas en un sistema de control de lazo abierto (Cizniar et al, 2018).

La optimización dinámica se puede utilizar para mejorar el diseño y la operación de los biorreactores lote y semi-lote, permitiendo obtener las condiciones óptimas de operación determinando el perfil de flujo de alimentación que garantice la maximización de una función objetivo durante el tiempo de

operación. Por esta razón la optimización dinámica es comúnmente llamada control óptimo.

Para el caso de estudio se plantea la maximización en la concentración de células viables en el biorreactor después de un tiempo de operación de 140 horas mediante la manipulación del flujo de alimentación de entrada. El problema de optimización dinámica para este caso de estudio se puede definir de la siguiente manera:

$$\max_{u(t)} X_V(t) \quad (1)$$

$$\frac{dX(t)}{dt} = f(X(t), u(t)) \quad (2)$$

$$X(t_0) = X_0 \quad (3)$$

$$X(t) \geq 0 \quad (4)$$

$$u(t)^L \leq u(t) \leq u(t)^U \quad (5)$$

Donde  $X$  es el vector de los estados o variables del sistema,  $u$  es el vector de las variables de control,  $X_v$  es la concentración de células viables,  $u^L$ ,  $u^U$  son los límites inferiores y superiores de la variable de control.

### 2.2 Control no lineal de modo predictivo (NMPC)

El control de modo predictivo basado en modelo no lineal (NMPC) es una estrategia de control en la que la entrada de la variable a controlar es determinada en tiempo real en cada instante de tiempo mediante la solución de un problema de optimización dinámica utilizando el actual estado (estimado) como valor inicial. La solución de la optimización conduce a un perfil óptimo de la entrada de control dentro de un horizonte de tiempo a futuro y del cual solo la primera parte es implementada hasta que la siguiente parte se encuentre disponible (Allgower et al., 1999).

Se planteó como objetivo, el control de la concentración de células viables ( $X_v$ ) durante la simulación de la operación de un biorreactor semi-lote a través del ajuste del flujo de alimentación hacia un perfil óptimo mediante la técnica de control predictivo basado en modelo no lineal (NMPC).

Los elementos principales del sistema de control son los siguientes:

- Variable a controlar: Conc. de células viables ( $y = X_v$ ).
- Variable a manipular: Flujo de alimentación ( $F = u$ ).
- Valor de referencia: Perfil óptimo de conc. de células viables ( $y_{ref}(t)$ ).

La ley de control utilizada en el algoritmo del NMPC consiste en la aplicación de un segmento de valores para la variable a manipular " $u$ " (6) definidos en un horizonte de control " $M$ " obtenidos mediante la resolución de un problema de optimización (7) dentro de un horizonte de predicción " $p$ ".

$$u = \{u_{k+1}, \dots, u_{k+p-1}\} \quad (6)$$

$$\min_{u(t)} \sum_{i=1}^p \|\alpha (y(t_{k+i}) - y_{ref}(t_{k+i}))\|^2 + \sum_{i=1}^M \|\beta \Delta u(t_{k+i-1})\|^2 \quad (7)$$

Donde  $u_k$  denota la secuencia de entradas de control óptimas,  $\alpha$  y  $\beta$  son las ponderaciones de penalización para los residuos al cuadrado tanto de la variable a controlar como de la señal de entrada respectivamente.

La función objetivo (7) se complementa con las restricciones dadas por (2)-(5) en forma discretizada en el tiempo. Los parámetros del controlador son el horizonte de predicción  $P$ , el horizonte de control  $M$ , el tiempo de muestreo  $T_s$  (relacionado al tiempo de procesamiento con  $t = kT_s$ ) y los factores de ponderación.

### 3. CASO DE ESTUDIO

El modelo para este caso de estudio es utilizado por (Craven et al., 2014) y describe el proceso para el cultivo de células de mamífero (CHO) para un biorreactor de tanque agitado, con aireación y operado de forma semi-lote.

$$\frac{dX_T}{dt} = \mu X_V - K_{LYSIS} X_D - X_T \left(\frac{F}{V}\right) \quad (8)$$

$$\frac{dX_V}{dt} = (\mu - k_d) X_V - X_V \left(\frac{F}{V}\right) \quad (9)$$

$$\frac{dX_D}{dt} = k_d X_V - K_{LYSIS} X_D - X_D \left(\frac{F}{V}\right) \quad (10)$$

$$\frac{dG}{dt} = \left(\frac{F}{V}\right) (S_G - G) + \left(-\frac{\mu}{Y_{X/G}} - m_G\right) X_V \quad (11)$$

$$\frac{dQ}{dt} = \left(\frac{F}{V}\right) (S_Q - Q) + \left(-\frac{\mu}{Y_{X/Q}} - m_Q\right) X_V - k_{d,Q} Q \quad (12)$$

$$\frac{dL}{dt} = -Y_{L/G} \left(-\frac{\mu}{Y_{X/G}} - m_G\right) X_V - \left(\frac{F}{V}\right) L \quad (13)$$

$$\frac{dA}{dt} = -Y_{A/Q} \left(-\frac{\mu}{Y_{X/Q}} - m_Q\right) X_V + k_{d,Q} Q - \left(\frac{F}{V}\right) A \quad (14)$$

$$\frac{dC_i}{dt} = q_i X_V - \left(\frac{F}{V}\right) C_i \quad (15)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (16)$$

El modelo consiste en nueve ecuaciones diferenciales no lineales. Es un modelo no estructurado, no segregado que contempla dos modelos cinéticos para el crecimiento y muerte celular.

Algunas otras consideraciones del modelo para el crecimiento de células de mamífero CHO son:

- Mezclado homogéneo en el biorreactor
- Control del pH óptimo.
- Control de la temperatura óptima.
- No hay déficit en el suministro de oxígeno

El modelo no contempla de forma explícita como variable algún producto, se correlaciona de manera empírica la concentración de células viables a la productividad.

Los modelos cinéticos que contempla el modelo se describen a continuación:

$$\mu = \frac{\mu_{max}(G)(Q)(C_i^* - C_i)}{C_i^*(K_G + G)(K_Q + Q)((L/K_L) + 1)((A/K_A) + 1)} \quad (17)$$

$$k_d = k_{d,max} \left( \frac{k_\mu}{\mu + k_\mu} \right) \quad (18)$$

Las variables de los estados consisten en la densidad celular total ( $X_T$ ), densidad de células viables  $X_v$ , densidad de células muertas ( $X_D$ ), concentración de glucosa ( $G$ ), concentración de glutamina ( $Q$ ), concentración de lactato ( $L$ ), concentración de amoníaco ( $A$ ) y concentración de un inhibidor desconocido ( $C_i$ ).  $S_G$  y  $S_Q$  son las concentraciones de glucosa y glutamina respectivamente en el flujo de entrada ( $F$ ).

#### 4. RESULTADOS NUMERICOS

En esta sección se presenta la aplicación de los metodos descritos en la sección 2 al caso de estudio presentado en la sección 3.

##### 4.1 Optimización dinámica

El problema de optimización se resuelve en Matlab usando el paquete Dynopt, el cual es adecuado para la solución de problemas de optimización restringidos usando algoritmos de programación no-lineal (NLP) (Cizniar et al., 2018). Dynopt utiliza el método de colocación ortogonal sobre elementos finitos para transformar el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias a algebraicas. Las ecuaciones resultantes se convierten a un problema NLP y se resuelven por un algoritmo de programación secuencial cuadrática

Las únicas restricciones al problema de optimización se aplicaron a las variables del sistema “ $X$ ” y a los límites de la variable de control “ $u$ ” (L/h).

$$X(t) \geq 0 \quad (19)$$

$$0 \leq u(t) \leq 0.01 \quad (20)$$

En la Figura 1 se muestra la gráfica del perfil de alimentación “ $u$ ” que maximiza numéricamente la concentración de células

viables bajo las condiciones del modelo y las restricciones establecidas. Se observa que mediante la técnica de optimización dinámica es posible alcanzar un máximo teórico de concentración de  $3.00 \times 10^9$  de Cel/L y durante la etapa final del proceso acercándose a  $2.0 \times 10^9$  Cel/L.

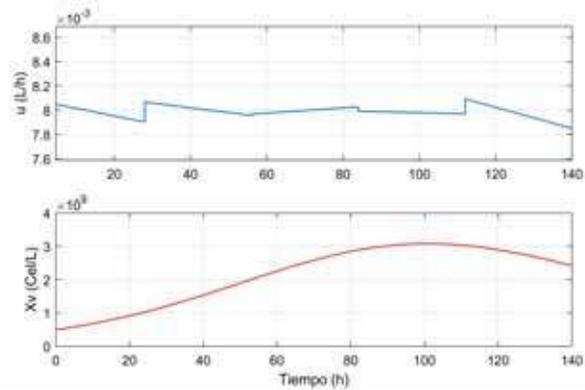


Fig. 1. Perfil óptimo de alimentación  $u$  y de  $X_v$ .

##### 4.2 Control no-lineal de modo predictivo.

Se plantea la implementación numérica de un controlador que pueda controlar la concentración de células viables hacia el valor óptimo de referencia “ $y_{ref}(t)$ ” obtenido previamente mediante la optimización dinámica del modelo. La simulación numérica del controlador aplicado al modelo se realizó en la plataforma MATLAB (R2017b).

Para implementar el algoritmo NMPC se usa la propuesta de transcripción directa que conduce a un problema de programación no-lineal (NLP) en cada intervalo de muestreo. La discretización de los perfiles de los estados y de la entrada de control se llevó a cabo por colocación ortogonal sobre elementos finitos usando polinomios de Legendre con tres puntos de colocación (Biegler, 2007; Piceno-Díaz et al., 2020). El problema de NLP resultante se programo en MATLAB (R2017b) usando la función *fmincon* con el método de optimización de punto interior.

Los valores para los principales parámetros de sintonizado del controlador se fijaron de acuerdo con una comparación de resultados entre varias simulaciones y eligiendo el conjunto de valores que mejor ajustaron al perfil óptimo de referencia deseado:  $p = 1$ ,  $M = 0.5$ ,  $\alpha = 60$ ,  $\beta = 1$ .

En la gráfica superior de la Figura 2 se muestra la comparación entre el perfil de referencia “ $y_{ref}(t)$ ” (Rojo) y el perfil resultante “ $y$ ” (Azul) a través de la implementación del control NMPC. El control NMPC cumple satisfactoriamente con el objetivo del problema de control de seguimiento hacia el valor de referencia durante todo el tiempo del proceso, siendo indistinguibles de manera gráfica ambos perfiles.

Analizando el comportamiento de los demás estados del sistema en las gráficas de las figuras 3 y 4, es posible observar

que maximizar la concentración de células viables conlleva a mantener bajos niveles de concentración de sustrato en el sistema tanto para glucosa como para la glutamina.

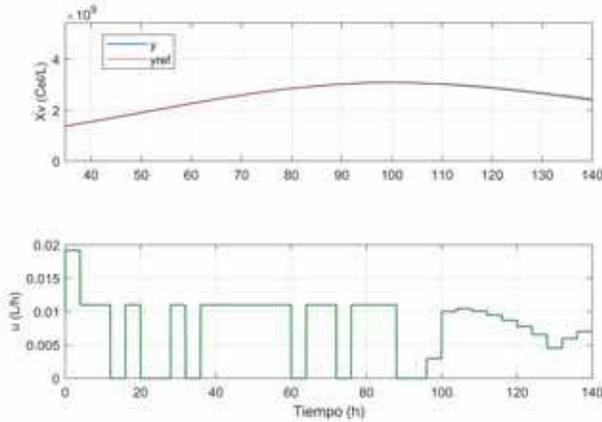


Fig. 2. Comparación del perfil de referencia “ $y_{ref}(t)$ ” contra el perfil “ $y$ ” obtenido con la implementación numérica del NMPC”.

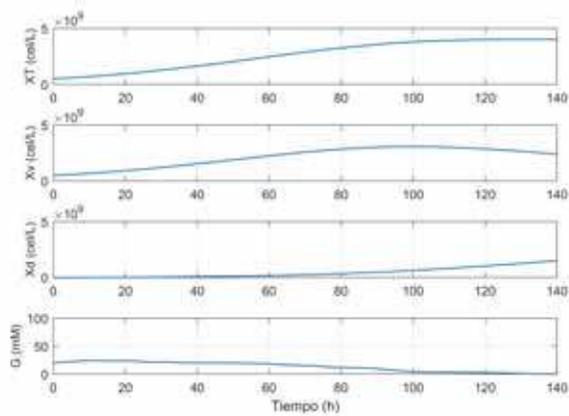


Figura 3. Estados del sistema,  $X_T$ ,  $X_v$ ,  $X_D$ ,  $G$  bajo la implementación del NMPC.

El mantener el sistema con bajas concentración de sustrato permite a las células producir y mantener una menor cantidad de metabolitos secundarios inhibidores como lo son el lactato y el amoníaco como se observa en la figura 4. Durante la simulación del proceso del cultivo y la implementación del control resulta en la adicción total de 1.1 L al medio de cultivo.

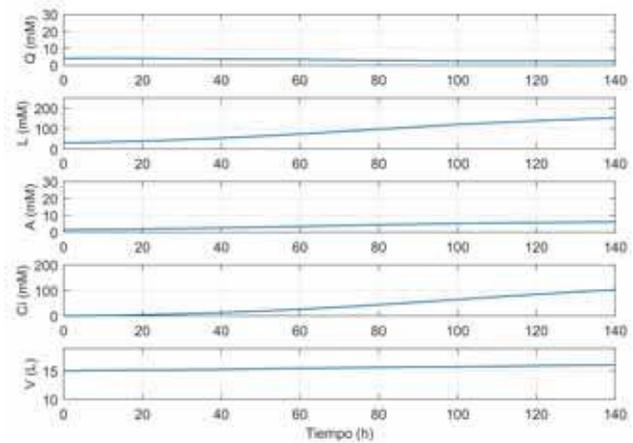


Figura 4. Estados del sistema,  $Q$ ,  $L$ ,  $A$ ,  $C_i$  y  $V$  bajo la implementación del NMPC.

Se debe notar que resultados previamente reportados por Craven et al. (2014), usando NMPC para el mismo caso de estudio, se enfocan en un problema de regulación de la concentración de glucosa y no se reporta la producción de células viables asociadas a la referencia correspondiente. Una ventaja de la configuración propuesta en este trabajo es considerar la naturaleza dinámica del proceso para fines de la optimización y control del proceso.

## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo se muestran los resultados de la aplicación de técnicas de optimización dinámica y control predictivo a un caso de estudio para el cultivo de células de mamífero tipo CHO. Se muestra que es posible maximizar teóricamente la concentración células viables para el caso de estudio presentado a través de métodos de optimización dinámica, así como también es posible numéricamente alcanzar el perfil de referencia óptimo deseado para el caso de estudio mediante control predictivo basado en modelo no lineal. A pesar de que el estudio se ha enfocado a un proceso de producción de células mamíferas viables, se espera que los métodos que se presentan se pueden extender a bioprocesos semi-lote similares. El diseño de control robusto NMPC para esta clase de procesos esta en desarrollo y será reportado más adelante.

## 7. REFERENCIAS

Allgower, F., Badgwell, T. A., Qin, J. S., Rawlings, J. B., and Wright S. J. (1999) Nonlinear predictive control an moving horizon estimation- An introductory overview. In P. M. Frank, editor, *Advances in Control, Highlights of ECC99*, pages 391-449. Springer.

- Banga, J. R., Balsa, C. E., Moles, C. G. and Alonso, A. A. (2003). Dynamic optimization of bioreactors: a review. *Proceedings-Indian national science academy part A*, 69(3/4), 257-266.
- Biegler, L. T. (2007). An overview of simultaneous strategies for dynamic optimization. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(11), 1043-1053.
- Biröl, G., Ündey, C. and Çinar, A. (2002) A modular simulation package for fed-batch fermentation: penicillin production. *Comput. Chem. Eng.* 26, 1553–1565.
- Chang, L., Liu, X. and Henson, M. A. (2016). Nonlinear model predictive control of fed-batch fermentations using dynamic flux balance models. *J. Process Cont.* 42, 137-149.
- Cizniar, M., Fikar, M. and Latifi, M., A. (2018) *MATLAB DYNAMIC OPTimisation Code (DYNOPT): USER'S GUIDE* Version 4.3.
- Craven, S., Whelan, J. and Glennon, B. (2014) Glucose concentration control of a fed-batch mammalian cell bio process using a nonlinear model predictive controller. *J. Process Cont.* 24, 344-357.
- Doran, P. M. (2013). *Bioprocess engineering principles*. Amsterdam: Academic Press.
- Gambhir, A. (1999). Alteration of cellular metabolism by consecutive fed-batch cultures of mammalian cells. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 805-810.
- Freshney, R. I. (2005) *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*. Ed. John Wiley. USA, 4-37.
- Pantano, M. N., Fernández, M. C., Serrano, M. E., Ortiz, O. A. and Scaglia, G. J. (2018). Tracking control of optimal profiles in a nonlinear fed-batch bioprocess under parametric uncertainty and process disturbances. *Ind. Eng. Chem. Res.* 57 (32), 11130-11140.
- Picó, J., Picó-Marco, E., Navarro, J. L. and DeBattista, H. (2006). Control of fed-batch bioreactors: part I. In *Nonlinear and adaptive control: tools and algorithms for the user*, 207-237.
- Piceno-Díaz, E.R., Ricardez-Sandoval, L.A., Gutierrez-Limon, M.A., Méndez-Acosta, H.O. and Puebla, H. (2020). Robust nonlinear model predictive control for two-stage anaerobic digesters. *Ind. Eng. Chem. Res.* 59 (52), 22559-22572.
- Mears, L., Stocks, S. M., Sin, G. and Gernaey, K. V. (2017). A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes. *J. Biotech.* 245, 34-46.
- Rómoli, S., Serrano, M. E., Ortiz, O. A., Vega, J. R. and Scaglia, G. J. E. (2015). Tracking control of concentration profiles in a fed-batch bioreactor using a linear algebra methodology. *ISA Trans.* 57, 162-171.
- Smets, I. Y., Claes, J. E., November, E. J., Bastin, G. P. and Van Impe, J. F. (2004). Optimal adaptive control of (bio) chemical reactors: past, present and future. *J. Process Cont.* 14 (7), 795-805.
- Tebbani, S., Dumur, D. and Hafidi, G. (2008). Open-loop optimization and trajectory tracking of a fed-batch bioreactor. *Chem. Eng. Process.* 47 (11), 1933-1941.